
Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz
Fachbereich Gartenbau
Universität Hannover



**Molekulare Charakterisierung von *Beet mild yellowing virus* (BMVYV)
und *Beet chlorosis virus* (BChV) sowie Selektion von BMVYV
*Amplicon-transgenen Nicotiana benthamiana***

Vom Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Gartenbauwissenschaften
-Dr. rer. hort.-

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Ing.agr. Dirk Stephan
geboren am 23.12.1971 in Karlsruhe

Angefertigt am
Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

Hannover, Februar 2005

Referent: Prof. Dr. Edgar Maiß

Ko-Referent: Prof. Dr. Günter Adam

Tag der Promotion: 04.02.2005

Zusammenfassung

Die beiden *Beta vulgaris* infizierenden Poleroviren *Beet mild yellowing virus* (BMV) und *Beet chlorosis virus* (BChV) sind Auslöser der Vergilbungs- und Chlorosekrankheit an Zuckerrüben. Wie alle Mitglieder der Familie *Luteoviridae* sind BMV und BChV vornehmlich auf das vaskuläre Gewebe ihrer Wirtspflanzen beschränkt und werden persistent durch Aphiden übertragen.

Für die molekulare Charakterisierung wurden die Gesamtnukleotidsequenzen der beiden deutschen Polerovirus-Isolate BMV-IPP und BChV-IPP bestimmt und in ein phylogenetisches System eingeordnet. Für eine molekulare und biologische Charakterisierung wurden BMV (BMV_{fl}) und BChV (BChV_{fl}) *full-length* cDNA-Klone und BMV/BChV Viruschimären hergestellt. Hierfür wurden vier (BMV_{fl}) bzw. sechs (BChV_{fl}) cDNA Teilfragmente zu einem *full-length* Klon unter Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors und Ribozyms zusammengeführt. Nach Integration in den modifizierten binären Vektor pBIN19 und Elektroporation in die *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme ATHV und LBA4404 erfolgten die Agroinfektionstestungen.

Nach der Selektion eines infektiösen (BMV_{fl}) wurden durch Agroinfektion in *B. vulgaris*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *Capsella bursa-pastoris* und *Lamium purpureum* erfolgreich systemische Infektionen etabliert. Die Agroinfektion führte dabei nicht zu einer Erweiterung des in der Literatur beschriebenen und nach BMV-Blattlausübertragung ermittelten BMV-Wirtspflanzenspektrums. Durch immunologische Untersuchung des agroinokulierten Pflanzengewebes konnte gezeigt werden, dass in *N. tabacum* cv. 'Xanthi', *N. occidentalis* und *Chenopodium capitatum* eine lokale Virusinfektion nachweisbar war, diese Pflanzenarten aber nicht systemisch mit BMV infiziert werden konnten. Nach Markierung des infektiösen BMV_{fl} mit dem *Green fluorescent protein* (GFP) konnte im agroinokulierten Epidermisgewebe von *N. benthamiana* in Einzelzellen eine deutliche GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Außerhalb des agroinokulierten Bereichs war keine GFP-Fluoreszenz nachweisbar und es konnte keine systemische Ausbreitung der GFP-markierten BMV_{fl} nachgewiesen werden. Obwohl im agroinokulierten Bereich durch Nachweis von Hüllprotein eine BMV-Replikation gezeigt werden konnte, verhinderte wahrscheinlich die Integration des *gfp*-Gens in den BMV_{fl} eine systemische Ausbreitung.

Der infektiöse BMV_{fl} wurde als *Amplicon* durch *A. tumefaciens* vermittelte Blattscheibentransformation in das Genom von *N. benthamiana* integriert. Nach der Gewebekultur und Selbstung der Mutterpflanzen konnten mehrere BMV *Amplicon*-transgene T₁- und T₂-Linien selektiert werden in denen eine Expression des BMV_{fl} als Transgen nachweisbar war. Die Untersuchung der homozygoten BMV *Amplicon*-

transgenen Linie 220.02.13 zeigte, dass jede Pflanze dieser Linie BMVYV-infiziert war. Durch *Tissue print immuno assay* von Pflanzen dieser Linie wurde nachgewiesen, dass in einem Großteil des nicht vaskulären Gewebes kein BMVYV nachweisbar war obwohl jede Zelle die Möglichkeit besitzt, den BMVYV_{fl} als Transgen zu exprimieren. Nach Ko-Infektion von BMVYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen mit *Potato virus Y* (PVY), *Beet yellows virus* (BYV) oder *Pea enation mosaic virus-1/-2* (PEMV-1/-2) konnte eine Erhöhung des BMVYV-Virustiters in der Blattlamina festgestellt werden. Obwohl in Ko-infizierten transgenen Pflanzen auch eine erhöhte Anzahl von BMVYV-infizierten Mesophyllzellen nachweisbar war, konnte im Großteil der Zellen weiterhin keine BMVYV-Infektion nachgewiesen werden. Dies gibt erste Hinweise, dass ein durch das *Amplicon* induzierter starker RNA-*Silencing* Mechanismus die Akkumulation von BMVYV unterbindet. Durch Ko-infizierte Viren wie PVY und BYV, die einen Suppressor des RNA-*Silencing* besitzen, kann ein post-transkriptionelles *Gene Silencing* in einigen Zellen unterdrückt werden und führt somit zu einer erhöhten Anzahl von BMVYV-infizierten Mesophyllzellen. Da jedoch im Großteil des Gewebes weiterhin keine BMVYV-Akkumulation nachweisbar war, lag in diesen Geweben eine andere Form des RNA-*Silencing*, möglicherweise transkriptionelles *Gene Silencing* (TGS), vor. Ein TGS kann von den Suppressoren der Ko-infizierten Viren nicht unterdrückt werden.

Obwohl für das PEMV-2 bisher kein Suppressor des RNA-*Silencing* beschrieben wurde, konnten in Ko-infizierten *Amplicon*-transgenen Pflanzen ähnliche synergistische Effekte auf den BMVYV-Virustiter und die Anzahl BMVYV-infizierter Mesophyllzellen beobachtet werden, wie sie bei PVY oder BYV festgestellt wurden. Es konnte auch gezeigt werden, dass PEMV-2 eine mechanische Übertragung des BMVYV vermittelt. Neben einer bisher unbekanntenen Suppressorfunktion eines PEMV-2 Proteins, ist vermutlich der Mechanismus, der die mechanische Übertragung des BMVYV ermöglicht, an einer Erhöhung des BMVYV-Virustiters in *Amplicon*-transgenen Pflanzen verantwortlich.

Nach Agroinfektion von BChV_{fl} oder BMVYV/BChV Viruschimären konnten keine infektiösen Klone selektiert werden. Eine mögliche Beteiligung von nicht kompatiblen 3'-terminalen Nukleotidsequenzen am Ausbleiben der Infektiosität wird diskutiert.

Schlagworte: *Beet mild yellowing virus* (BMVYV), *Amplicon*, full-length clone, Agroinfektion

Abstract

The *Beta vulgaris* infecting Poleroviruses *Beet mild yellowing virus* (BMV) and *Beet chlorosis virus* (BChV) are causers of the yellowing disease in sugar beets. Like all members of the family *Luteoviridae* BMV and BChV are primarily limited to the vascular tissues of their hosts and transmitted by aphids in a persistent manner.

A molecular characterisation of the total nucleotide sequences of the two German Polerovirus isolates BMV-IPP and BChV-IPP was done and the viruses were included in a phylogenetic system. For a molecular and biological characterisation BMV (BMV_{fl}) and BChV (BChV_{fl}) full-length cDNA clones and BMV/BChV chimeras were constructed. For that, four (BMV_{fl}) or six (BChV_{fl}) cDNA fragments, respectively, were combined to form full-length clones under the control of the CaMV 35S-promoter and a ribozyme. After integration of the full-length clones into the modified binary vector pBIN19 and transfer by electroporation to the *Agrobacterium tumefaciens* strains ATHV and LBA4404 inoculation of plants was done by agroinfection.

After selection of an infectious BMV_{fl} systemic infections were successfully established in *B. vulgaris*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *Capsella bursa-pastoris* and *Lamium purpureum* by use of agroinfection. Thereby agroinfection did not lead to an extension of the BMV host plant spectrum compared to the previously described spectrum in the literature mainly determined after BMV transmission by aphids. The immunological investigation of the agroinoculated plant tissue in *N. tabacum* cv. 'Xanthi', *N. occidentalis* and *Chenopodium capitatum* revealed a local virus infection. However, in these plant species no systemic BMV infection could be detected. After labelling of the infectious BMV_{fl} with the *Green fluorescent protein* (GFP) a clear GFP-fluorescence could be detected in agroinoculated epidermal cells of *N. benthamiana*. However, the fluorescence was limited to a few cells within the agroinoculated tissue and no systemic movement of the GFP or the GFP-labelled BMV_{fl} was observed. Although within the primary agroinfected cells a BMV replication was shown by detection of the coat protein, the integration of the *gfp*-gene into the BMV_{fl} presumably prevented a systemic movement.

By *A. tumefaciens* mediated leaf-disc transformation the infectious BMV_{fl} was introduced into the genome of *N. benthamiana* to gain BMV amplicon transgenic plants. After tissue culture and selfing of the plants several BMV amplicon transgenic T₁ and T₂-lines were selected in which the expression of the BMV_{fl} could be detected. In one plant line, the homozygous BMV amplicon transgenic line 220.02.13, all plants were shown to be BMV infected. When plants of this line were tested by tissue print immuno assay it was shown that in the majority of non vascular tissues no BMV

infection was present, even though each plant cell in amplicon transgenic plants possess the potential to express the BMYV_{fl} transgene. After co-infection of BMYV amplicon transgenic plants with *Potato virus Y* (PVY), *Beet yellows virus* (BYV) or *Pea enation mosaic virus 1/2* (PEMV-1/2) an increase of the BMYV virus titer in the leaf lamina was observed. Although in co-infected transgenic plants an increased number of BMYV infected epidermal cells was detected, the majority was free of BMYV infections. This gives a first indication that a strong RNA silencing mechanism induced by the amplicon prevents the accumulation of BMYV. By co-infecting viruses such as PVY and BYV, which possess a suppressor of RNA silencing, post-transcriptional gene silencing in some cells can be suppressed and thus leads to an increased number of BMYV infected epidermal cells. However, since in the majority of the tissues no BMYV accumulation was detected, another form of RNA silencing, such as transcriptional gene silencing (TGS), could be present in most parts of the tissue. A TGS cannot be suppressed by the suppressors of the co-infecting viruses. Although for the PEMV-2 no suppressor of RNA silencing was described so far, similar synergistic effects on the BMYV virus titer and the number of BMYV infected epidermal cells were found in amplicon transgenic plants as were observed in PVY or BYV co-infected plants. It was shown that PEMV-2 mediated a mechanical transmission of BMYV. Beside an unknown suppressor function of PEMV-2, the mechanism, which mediates the mechanical transmission of BMYV, is probably responsible for an increase of the BMYV virustiter in amplicon transgenic plants.

After agroinfection of BChV_{fl} or BMYV/BChV chimeras no infectious virus was detected. A possible participation on the infectivity of none compatible 3'-terminal nucleotide sequences is discussed.

Key words: *Beet mild yellowing virus* (BMYV), Amplicon, full-length clone, agroinfection

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vergilbungsviren an <i>Beta vulgaris</i>	3
1.1.1	<i>Beet mild yellowing virus</i> (BMV).....	7
1.1.2	<i>Beet chlorosis virus</i> (BChV).....	11
1.1.3	<i>Beet yellows virus</i> (BYV)	13
1.2	Virusausbreitung in der Pflanze und Phloemlimitierung von Luteoviren	15
1.3	Herstellung poleroviraler <i>full-length</i> cDNA Klone und Testung der Infektiosität durch Agroinfektion.....	18
1.4	<i>Pea enation mosaic virus-1/-2</i> (PEMV-1/-2).....	23
1.5	<i>Potato virus Y</i> (PVY)	27
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Chemikalien.....	33
2.1.2	Bakterienstämme.....	35
2.1.3	Virus-Isolate.....	36
2.1.4	Pflanzenmaterial.....	36
2.1.5	Plasmide und Nukleinsäuren.....	37
2.1.6	Synthetische Oligonukleotide	37
2.1.6.1	Verwendete Oligonukleotide.....	38
2.1.7	Enzyme.....	42
2.1.7.1	Restriktionsenzyme	42
2.1.7.2	DNA/RNA/Protein modifizierende Enzyme.....	43
2.1.8	Medien und Medienzusätze.....	44
2.1.8.1	Medienbestandteile	44
2.1.8.2	Medienzusammensetzung.....	45
2.1.9	Antiseren	48
2.1.10	Geräte.....	48
2.1.11	Sonstige Materialien	49
2.1.12	Software	49
2.2	Methoden	50
2.2.1	Anzucht der Versuchspflanzen.....	50
2.2.2	Inokulation von Pflanzen mit Viren	50
2.2.2.1	Mechanische Virusübertragung.....	50
2.2.2.2	Vektorielle Virusübertragung	50
2.2.3	Serologische Nachweisverfahren.....	51

2.2.3.1	DAS-ELISA.....	51
2.2.3.2	<i>Tissue-Print-Immuno-Assay</i> (TPIA).....	53
2.2.3.3	Nachweis von BMVYV-Hüllprotein durch Western-Blot Analyse	55
2.2.3.4	Gesamtprotein-Extraktion aus Pflanzen	55
2.2.3.5	Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	56
2.2.3.6	Western-Blot von Proteingelen.....	57
2.2.3.7	ISEM.....	58
2.2.4	Phenol/Chloroform-Reinigung	59
2.2.5	Nukleinsäurefällung mit Ethanol.....	59
2.2.6	Isolierung von Nukleinsäure aus pflanzlichem Gewebe	60
2.2.6.1	Gesamtnukleinsäure-Extraktion aus Pflanzen.....	60
2.2.6.2	Gesamt-DNA Extraktion aus Pflanzen mit dem DNeasy® Plant Kit...60	
2.2.6.3	Gesamt-RNA Extraktion aus Pflanzen	61
2.2.7	Reverse Transkription	63
2.2.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	64
2.2.9	Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden	67
2.2.10	Klonierung von DNA in <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	68
2.2.10.1	Restriktionsverdau von DNA.....	68
2.2.10.2	Auffüllreaktion durch DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment	69
2.2.10.3	Dephosphorylierung von DNA-Proben	69
2.2.10.4	Herstellung des λ - <i>Pst</i> I-Größenstandards	70
2.2.10.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	71
2.2.10.6	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	72
2.2.10.7	Qiaquick® PCR Purification Kit	73
2.2.10.8	Ligation von DNA-Fragmenten	73
2.2.10.9	Transformation von <i>E.coli</i>	74
2.2.10.10	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> durch Elektroporation.....	75
2.2.11	Selektion transformierter Bakterienzellen.....	77
2.2.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	78
2.2.13	Qiaprep® Miniprep Kit	80
2.2.14	Auftragssequenzierung von Plasmid-DNA	81
2.2.15	Herstellung von Dauerkulturen	82
2.2.16	Herstellung viraler <i>full-length</i> Klone.....	82
2.2.17	Transformation von <i>N. benthamiana</i>	83
2.2.17.1	Selektion von transgenen <i>N. benthamiana</i>	87
2.2.18	Southern-Blot und Hybridisierung pflanzlicher DNA.....	87

2.2.18.1	Southern-Blot und Fixierung durch UV-crosslinking	88
2.2.18.2	Herstellung einer DIG-PCR Sonde	89
2.2.18.3	Prähybridisierung und Hybridisierung	90
2.2.19	Agroinfektion	92
2.2.19.1	Herstellung der Inokulationssuspension	92
2.2.19.2	Methode A: Agroinfektion mittels Blattverletzung	93
2.2.19.3	Methode B: Agroinfektion mittels Injektion	93
2.2.20	Konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM)	93
2.2.21	Statistische Auswertungen	94
2.2.21.1	Wilcoxon-Test für paarige/verbundene Stichproben	94
2.2.21.2	U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney	95
2.2.21.3	Chi-Quadrat-Test	95
3	Ergebnisse	96
3.1	Blattlausübertragung von BMVYV und BChV mittels <i>Myzus persicae</i>	96
3.2	Herstellung von BMVYV und BChV <i>full-length</i> Klonen	99
3.2.1	Klonierung eines BMVYV <i>full-length</i> Klon (BMVYV _{fl})	99
3.2.2	Klonierung eines BChV <i>full-length</i> Klon (BChV _{fl})	103
3.3	Sequenzanalyse des BMVYV-IPP und des BChV-IPP	106
3.4	BMVYV _{fl} -Agroinokulationen zur Testung der Infektiosität	111
3.4.1	Optimierung der Agroinokulationsmethode	112
3.4.2	Vergleich zwischen ATHV und LBA4404 als BMVYV _{fl} Wirtsbakterien ..	113
3.4.3	Mutagenese des BMVYV _{fl} zur Deletion von 5'-Fremdnukleotiden	114
3.5	Blattlausübertragung des BMVYV _{fl}	117
3.6	Wirtspflanzen diagnose des BMVYV _{fl} mittels Agroinfektion	118
3.7	Markierung des BMVYV _{fl} mit dem <i>Green fluorescent protein</i> (GFP)	123
3.7.1	Klonierung des 5'P0-BMVYV _{fl} GFP	124
3.7.2	Klonierung des 3'REP-BMVYV _{fl} GFP	125
3.8	Infektionstestungen mit den GFP-markierten BMVYV _{fl}	126
3.9	Herstellung und Selektion von BMVYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> Linien	130
3.9.1	Genetische Analyse der BMVYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> T ₁ - und T ₂ -Linien	131
3.9.1.1	Analyse der BMVYV _{fl} -Expression in transgenen T ₁ -Pflanzen	131
3.9.1.2	Segregationsanalyse von BMVYV <i>Amplicon</i> -transgenen T ₁ - und T ₂ -Pflanzen	132
3.9.1.3	Southern-Blot Analyse zur Ermittlung der Anzahl von T-DNA Insertionen in BMVYV <i>Amplicon</i> -transgenen Linien	134

3.9.2	Vergleich des Virustiter der BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> -Linien 220.01 und 220.02.13.....	138
3.10	Lokalisierung von BMYV-infizierten Zellen in BMYV <i>Amplicon</i> - transgenen, -agroinfizierten und Blattlaus infizierten <i>N. benthamiana</i>	139
3.11	Ko-Infektion von BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2.....	141
3.11.1	Ko-Infektion der Linie 220.01 mit PVY oder BYV.....	141
3.11.2	Ko-Infektion der Linie 220.02.13 mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2.....	143
3.11.3	Mechanische Übertragung des BMYV _{fi}	152
3.12	Infektionstestungen mit dem BChV _{fi}	153
3.12.1	Mutagenese des BChV _{fi} zur Integration von 5'-Fremdnukleotiden.....	155
3.12.2	Infektionstestungen mit dem AscIBChV _{fi}	155
3.12.3	Infektionstestungen mit BChV _{fi} /BMYV _{fi} -Mischproben.....	157
3.13	Phylogenetischer Vergleich des BMYV-IPP und BChV-IPP.....	158
3.14	Klonierung von BMYV _{fi} -BChV _{fi} Viruschimären.....	161
3.14.1	Infektionstestungen des BCBM _{Chi}	165
3.14.2	Infektionstestungen des BMBC _{Chi}	166
4	Diskussion.....	168
4.1	Sequenzbestimmung und Phylogenie der Polerovirusisolate BMYV-IPP und BChV-IPP	168
4.2	Infektionstestungen des BMYV-IPP <i>full-length</i> Klons.....	173
4.3	Agroinfektion als artifizielle Virusübertragung und Determination des Wirtspflanzenspektrums	174
4.4	Markierung des BMYV _{fi} mit dem <i>Green fluorescent protein</i> (GFP)	180
4.5	Charakterisierung von BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i>	184
4.6	Ko-Infektion von BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2	189
4.7	Infektionstestungen mit BChV-IPP <i>full-length</i> Klonen	196
4.8	Infektionstestungen mit BMYV-BChV Viruschimären.....	198
4.9	Abschlussbetrachtung und Ausblick.....	201
5	Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit	204
6	Abbildungsverzeichnis	205
7	Tabellenverzeichnis	208
8	Literaturverzeichnis	212
9	Anhang.....	250
9.1	Nukleotidsequenzen von BMYV-IPP und BChV-IPP.....	250
9.2	Sequenzvergleiche und BMYV Wirtspflanzenspektrum.....	258

9.3	Auflistung festgestellter Virustiter und statistische Auswertungen.....	261
9.3.1	Vergleich der BMYV _{fl} -transgenen Linien 220.01. und 220.02.13.....	261
9.3.2	Ko-Inokulation der Linie 220.01 mit PVY oder BYV.....	262
9.3.3	Ko-Inokulation der Linie 220.02.13 mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2....	264
9.4	Klonierungsstrategien, Vektorherstellung und Längenstandard.....	274

Abkürzungen

~	cirka
%	Prozent
α	Alpha
A	Adenin
abs.	absolut
Amp ^R	Resistenzgen gegen Ampicillin
as	antisense
ATP	Adenosin-Triphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
β	Beta
b	Basen
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
©	Copyright
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
Camp ^R	Resistenzgen gegen Chloramphenicol
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CP	<i>coat protein</i> (Hüllprotein)
cv.	cultivar
d.h.	das heißt
DAS-ELISA	Double-Antibody-Sandwich ELISA
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DIG	Digoxigenin
DIG-35S	Digoxigenin markierte PCR Sonde zum Nachweis des CaMV 35S Promotors
DIG- <i>nptII</i>	Digoxigenin markierte PCR Sonde zum Nachweis des <i>nptII</i> -Gens aus Bin19
DIG-UTP	Digoxigenin-11-dUTP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskop
<i>et al.</i>	et alii
Fa.	Firma
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,8m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green-fluorescent-protein</i>
H ₂ O _{bidest/dest}	bidestilliertes/destilliertes Wasser
ha	Hektar
Hrsg.	Herausgeber
ICTV	<i>International Committee of Taxonomy of Viruses</i>
kb	Kilobasen
klx	Kilolux
Kn ^R	Resistenzgen gegen Kanamycin
l	Liter
λ	Lambda
LM	low melting
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Min.	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker in Plasmiden
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> der Vereinigten Staaten von Amerika
n.d.	nicht durchgeführt
ng	Nanogramm
ncr	non-coding region
nos	Nopalin Synthetase
npt II	Neomycin Phototransferase II, vermittelt Kn ^R
npt III	Neomycin Phototransferase III
nt	Nukleotid
OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pers. Komm.	persönliche Kommunikation
pH	negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Wasserstoff-Ionen in einer wässrigen Lösung
ori	Origin of replication
RE	Restriktionsendonuklease
rgsCaM	<i>regulator of gene silencing-calmodulin-like protein</i>
RISC	RNA-induzierter <i>Silencing</i> Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RTD	<i>read through domain</i>
s	sense
Sek.	Sekunden
Std.	Stunden
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet ^R	Resistenzgen gegen Tetracyclin
TPIA	Tissue-Print-Immuno-Assay
U	<i>units</i> (Einheiten)
UpM	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett

V	Volt
VPg	viral kodiertes Genom-assoziiertes Protein
z.B.	zum Beispiel

Virusabkürzungen

BChV	<i>Beet chlorosis virus</i>
BMV	<i>Beet mild yellowing virus</i>
BtMV	<i>Beet mosaic virus</i>
BWYV	<i>Beet western yellows virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
BYV	<i>Beet yellows virus</i>
CABYV	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
PEMV-1/-2	<i>Pea enation mosaic virus-1/-2</i>
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
BMV _{fl}	<i>Beet mild yellowing virus full-length cDNA Klon</i>
BChV _{fl}	<i>Beet chlorosis virus full-length cDNA Klon</i>

Pflanzennamen

<i>B. vulgaris</i>	<i>Beta vulgaris</i>
<i>B. napus</i>	<i>Brassica napus</i>
<i>C. bursa-pastoris</i>	<i>Capselle bursa-pastoris</i>
<i>C. capitatum</i>	<i>Chenopodium capitatum</i>
<i>C. foliosum</i>	<i>Chenopodium foliosum</i>
<i>C. quinoa</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>L. purpureum</i>	<i>Lamium purpureum</i>
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. clevelandii</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i>
<i>N. edwardsonii</i>	<i>Nicotiana edwardsonii</i>
<i>N. glutinosa</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i>
<i>N. rustica</i>	<i>Nicotiana rustica</i>
<i>N. occidentalis</i>	<i>Nicotiana occidentalis</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>

1 Einleitung

Die Charakterisierung von Pflanzenviren ist eine Grundvoraussetzung für ihre Bekämpfung. Sie beinhaltet sowohl die Beschreibung der Virus-Pflanzen Interaktion (z.B. Wirtspflanzenspektrum, Gewebespezifität und Symptombildung), der Virus-Vektor Interaktion und Möglichkeit der Übertragung, als auch die molekulare Charakterisierung des Virus. Durch die Bestimmung der Nukleotidsequenz und des resultierenden Genomaufbaus können mögliche Proteinprodukte analysiert und ihre putative Funktion bestimmt werden. Solche Charakterisierungskriterien ermöglichen die Einordnung eines Virus in ein phylogenetisches System und einen Vergleich mit anderen Pflanzenviren.

Für eine Charakterisierung ist es von grossem Vorteil, ein biologisch aktives Abbild des Virus, einen viralen *full-length* Klon, untersuchen zu können. Solch eine genetische Kopie ermöglicht kontrollierte Veränderungen am viralen Genom und die Analyse von resultierenden Konsequenzen. Des Weiteren können durch verschiedene Inokulationsmethoden mit *full-length* Klonen in Pflanzen Virusinfektionen etabliert werden ohne auf natürliche Virusvektoren wie Blattläuse angewiesen zu sein.

In dieser Arbeit sollten ein deutsches *Beet mild yellowing virus*-Isolat (BMV-IPP) und ein *Beet chlorosis virus*-Isolat (BChV-IPP) durch Erstellung von infektiösen cDNA *full-length* Klonen biologisch und molekular charakterisiert werden. Durch die Determination der Nukleotidsequenz von beiden Virusisolaten sollte durch Sequenzvergleiche eine phylogenetische Beziehung zu anderen Pflanzenviren ermittelt werden. Nach der Herstellung von *full-length* cDNA-Klonen beider Viren erfolgte die Testung der Infektiosität durch die Methode der Agroinfektion. Die Etablierung eines effizienten Agroinfektionssystems von Pflanzen mit poleroviralen *full-length* cDNA-Klonen ermöglichte die Untersuchung einer möglichen Erweiterung des Wirtspflanzenspektrums durch diese artifizielle Infektion im Vergleich zu dem natürlichen Übertragungsweg mittels Blattläusen. Durch die Methode der Agroinfektion können dabei durch Untersuchung des inokulierten Pflanzengewebes auch Wirtspflanzen, die nur lokal und nicht systemisch infiziert werden, von Nicht-Wirten abgegrenzt werden.

Die phylogenetisch nahe Verwandtschaft der beiden *Beta vulgaris* infizierenden Pleroviren BMV und BChV ist durch eine hohe Sequenzhomologie im 3'-Bereich und eine geringe Homologie im 5'-Bereich der beiden viralen Genome geprägt. Da beide Viren Unterschiede in ihrem Wirtspflanzenspektrum zeigen (Hauser *et al.*, 2002), sollte durch die Herstellung von Viruschimären der Genombereich determiniert werden, der an dieser Wirtspflanzenspezifität beteiligt ist.

Durch Herstellung von BMVYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen und einem Vergleich mit Pflanzen, die durch Agroinfektion oder Blattläuse virusinfiziert werden, sollte die Gewebespezifität von Poleroviren untersucht werden. In solchen *Amplicon*-transgenen Pflanzen, nachfolgend auch BMVYV_{fl}-transgene Pflanzen genannt, wird der virale *full-length* cDNA Klon des BMVYV unter Kontrolle eines Promotors, der die Expression von viralen RNA-Transkripten bewirkt, als Transgen in das pflanzliche Genom integriert. Von besonderem Interesse ist hierbei die natürliche Beschränkung von Poleroviren auf das vaskuläre Gewebe ihrer Wirtspflanzen. Die Phloemlimitierung von Poleroviren kann sowohl in suboptimalen Replikationsmöglichkeiten in Zellen ausserhalb des Phloems oder der aktiven Unterdrückung der Replikation durch pflanzliche Abwehrmechanismen wie RNA-*silencing*, als auch in einem Fehlen der Möglichkeit einer nicht-vaskulären Zell-zu-Zell Ausbreitung begründet sein. In *Amplicon*-transgenen Pflanzen besteht die theoretische Möglichkeit, dass eine polerovirale Akkumulation auch in nicht-vaskulären Gewebebereichen stattfinden kann, ohne dass eine Zell-zu-Zell Ausbreitung notwendig ist. In diesen transgenen Pflanzen sollte durch Mischinfektionen untersucht werden, ob ein Einfluss von Viren, die durch Suppressoren den pflanzlichen RNA-*silencing* Mechanismus unterdrücken können oder Viren, die möglicherweise eine polerovirale Zell-zu-Zell Bewegung in nicht-vaskulärem Gewebe komplementieren, auf die Phloemlimitierung von BMVYV nachweisbar ist.

Durch Markierung von infektiösen *full-length* Klonen mit dem *Green-fluorescent-protein* (GFP) können infizierte Gewebetypen detailliert bestimmt und eine Virusausbreitung in mischinfizierten und nicht-mischinfizierten Pflanzen vom Ort der Inokulation verfolgt werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit gliedert sich in folgende Bereiche:

- Bestimmung der Nukleotidsequenz der beiden deutschen *B. vulgaris* infizierenden Polerovirus-Isolate BMVYV-IPP und BChV-IPP und Integration in ein phylogenetisches System.
- Herstellung von BMVYV-IPP und BChV-IPP *full-length* Klonen und Etablierung eines effizienten Agroinfektionssystems.
- Vergleich des durch artifizielle Übertragung (Agroinfektion) und mittels natürlicher Übertragung (Blattläuse) festgestellten Wirtspflanzenspektrums.
- Markierung von infektiösen BMVYV-IPP *full-length* Klonen mit dem *Green-fluorescent-protein* (GFP) und Determination von infizierten Zelltypen.
- Selektion von BMVYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen zur Untersuchung der Virusbeschränkung auf vaskuläres Pflanzengewebe und Einfluss von viralen

Mischinfektionen mit dem *Potato virus Y* (PVY), dem *Beet yellows virus* (BYV) oder dem *Pea enation mosaic virus-1/2* (PEMV-1/2) auf die Gewebespezifität.

- Herstellung einer BMVY-BChV Viruschimäre zur Determination des Genombereichs, der an der Wirtspflanzenspezifität beteiligt ist.

In den nachfolgenden Kapiteln wird der wissenschaftliche Stand der bearbeiteten Themenbereiche definiert und die in diese Arbeit einbezogenen Pflanzenviren vorgestellt. Hierbei werden die als Auslöser der 'virösen Vergilbung' an *B. vulgaris* beschriebenen Viren BMVY, BChV und BYV zuerst gemeinsam als Vergilbungsviren und anschliessend separat eingehender beschrieben.

1.1 Vergilbungsviren an *Beta vulgaris*

Das Krankheitsbild der 'virösen Vergilbung' an *B. vulgaris* ist eine der wichtigsten ertragsreduzierenden Erkrankungen an Zuckerrüben und seine Bekämpfung und Kontrolle erfordert seit über 60 Jahren einen grossen Einsatz an wissenschaftlicher und züchterischer Forschungsleistung (Duffus, 1973; Smith, 2001; Stevens *et al.*, 2004). Der Begriff 'viröse Vergilbung' wurde erstmals von Petherbridge & Stirrup (1935; '*virus yellows*') verwendet, um ein viröses Krankheitsbild an *B. vulgaris* in England zu beschreiben, das zu einer Vergilbung von Rübenblättern führte. Im Jahr 1936 konnte von Roland gezeigt werden, dass der Auslöser der 'virösen Vergilbung' durch Blattläuse übertragen wird. In England wurde durch Watson (1940) das Krankheitsbild an *B. vulgaris* untersucht und als *Sugar beet yellows virus* (SBYV; später als *Beet yellows virus* (BYV)) bezeichnet. In den Vereinigten Staaten ist eine BYV-Infektion an *B. vulgaris* erstmals im Jahre 1951 durch Coons & Kotila mit Hilfe eines BYV Antiserums aus den Niederlanden nachgewiesen worden.

Durch Clinch & Loughnane (1948) wurde ein irisches Vergilbungsvirus (Irish mild yellows) an Zuckerrüben beschrieben, das nach serologischen Untersuchungen als nicht mit BYV verwandt eingestuft wurde (Watson, 1951). Im selben Jahr vermutete Watson erstmals, dass das Krankheitsbild der 'virösen Vergilbung' durch einen Komplex von Vergilbungsviren hervorgerufen wird. Nach Blattlausübertragungsversuchen in den Jahren 1955-1957 von Zuckerrübenblättern mit Vergilbungssymptomen konnte durch Russel (1958) neben BYV ein zweites Vergilbungsvirus identifiziert werden. Während man an BYV-infizierten *B. vulgaris* Pflanzen Vergilbungen an den älteren Blättern und Adernaufhellungen an den jüngsten Blättern beobachtete, verursachte das zweite Virus, als *Sugar beet mild yellowing virus* bezeichnet (SBMYV, später *Beet mild yellowing virus* (BMVYV) genannt), nur milde Vergilbungen an den älteren Blättern, aber keine Adernaufhellungen. In den Vereinigten Staaten ist durch Costa *et al.* (1959) erstmals ein Virus (*Malva yellows*

virus) beschrieben worden, das in den westlichen Zuckerrübenanbaugebieten der Vereinigten Staaten milde Vergilbungen an *B. vulgaris* hervorruft. Die Verbreitung eines Vergilbungsvirus (Radish yellows virus), das in den Vereinigten Staaten häufiger als BYV nachgewiesen werden konnte, ist von Duffus (1960) berichtet worden. Das Radish yellows virus wurde später aufgrund seines häufigen Vorkommens und der Relevanz als Krankheit im Zuckerrübenanbau als *Beet western yellows virus* (BWYV) beschrieben (Duffus, 1961).

Im Jahr 1994 berichteten Stevens *et al.* von einem weiteren Zuckerrüben-infizierenden Polerovirus in Europa. Aufgrund serologischer und biologischer Untersuchungen wurde dieses Virus als zweiter BMYV Sero- und Biotyp eingeordnet. Zur gleichen Zeit wurde von einem neuen, mit dem BWYV verwandten, blattlausübertragbaren Vergilbungsvirus in den USA berichtet (Liu *et al.*, 1999). Dieses, aufgrund seiner Symptomausbildung an *B. vulgaris* als *Beet chlorosis virus* (BChV) bezeichnete Virus, wurde hauptsächlich in den Zuckerrübenanbaugebieten von Kalifornien, Nebraska, Colorado und Texas nachgewiesen (Liu *et al.*, 1999). Nach molekularen, serologischen und biologischen Untersuchungen wurde BChV als eigenständige Virusspezies innerhalb des Genus *Polerovirus* vorgeschlagen (Hauser *et al.*, 2000a, 2002).

Nach Stevens *et al.* (2004) zählen das *Beet yellows virus* (BYV; Familie *Closteroviridae*; Genus *Closterovirus*) und die Poleroviren (Familie *Luteoviridae*) *Beet mild yellowing virus* (BMYV) und *Beet chlorosis virus* (BChV) heute in Europa zu den wichtigsten Vergilbungsviren an *B. vulgaris*. Das Potyvirus (Familie *Potyviridae*) *Beet mosaic virus* (BtMV) kann ein Teil dieses Komplexes sein, seine Rolle als Auslöser der virösen Vergilbung ist aber noch unklar (Wisler & Duffus, 2000). Die amerikanischen Isolate des *Beet western yellows virus* (BWYV; Familie *Luteoviridae*; Genus *Polerovirus*) werden als Auslöser der virösen Vergilbung an *B. vulgaris* in den Vereinigten Staaten beschrieben (Duffus, 1960, 1961, 1964; Duffus & Russell, 1970; Duffus, 1973; Hampton *et al.*, 1998; de Koeijer & van der Werf, 1999; Wisler & Duffus, 2000; Lewellen *et al.*, 1999; Lewellen, 2004a, 2004b). Durch Hauser *et al.* (2000a, 2000b, 2002) wurden zwei amerikanische, rübeninfizierende BWYV-Isolate aufgrund von biologischen, serologischen und molekularen Untersuchungen als BChV-Isolate identifiziert. Bisher konnte nur mit dem umfassend charakterisierten französischen BWYV-FL1 Isolat (Veidt *et al.*, 1992) in seltenen Fällen eine Infektion in *B. vulgaris* detektiert werden (Hauser *et al.*, 2000a, 2002). Mit anderen europäischen BWYV-Isolaten können keine Infektionen in *B. vulgaris* etabliert werden (Duffus & Russell, 1975; Smith & Hinckes, 1985; Stevens *et al.*, 1994; Graichen & Rabenstein, 1996). Durch molekularbiologische Untersuchungen von weiteren amerikanischen BWYV-Isolaten muss gezeigt werden, ob es weitere *B. vulgaris* infizierende BWYV-Isolate

gibt, die sich in die von Hauser *et al.* (2000a, 2002) postulierte neue Klassifizierung der rübeninfizierenden Poleroviren (BMYV und BChV) und dem nicht rübeninfizierenden *Brassica yellows virus* (BrYV; syn. BWYV und *Turnip yellows virus* (TuYV)) einordnen lassen. Erste Sequenzuntersuchungen an amerikanischen BWYV-Isolaten lassen vermuten, dass sich diese Isolate hinreichend von BMYV, BChV und BrYV unterscheiden, um eine neue Poleroviruspezies zu postulieren (Mark Stevens, pers. Komm.).

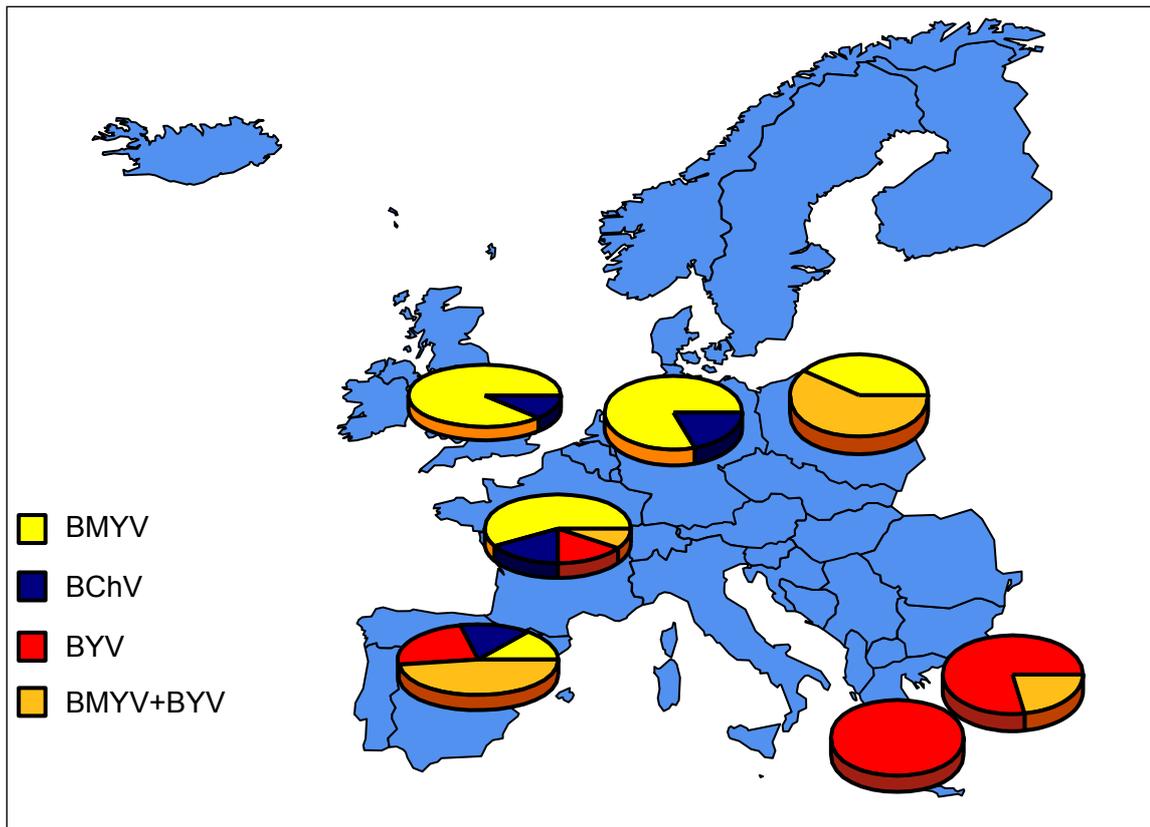


Abbildung 1.1: Durch ELISA und RT-PCR festgestellte Verbreitung von Vergilbungsviren in Spanien, Frankreich, England, Deutschland, Niederlande, Polen, Türkei und Griechenland im Jahr 1996 durch Testung von 200 *B. vulgaris* Blattproben (zur Verfügung gestellt von Mark Stevens, IACR-Broom's Barn, UK).

In ganz Europa sind Vergilbungsviren in den Zuckerrübenanbaugebieten verbreitet (Cariolle, 1990; Stevens, *et al.*, 1997). Bei Untersuchungen von *B. vulgaris* Blattproben aus verschiedenen europäischen Ländern (Abbildung 1.1) konnte eine Dominanz des BMYV und BChV in Nord-West Europa festgestellt werden, während in den mediterranen Regionen hauptsächlich BYV-Infektionen vorherrschen.

Die geographische Verteilung der verschiedenen Vergilbungsviren spiegelt unterschiedliche Anbaupraktiken und Klimaunterschiede wider, die grossen Einfluss auf Blattlausvektoren und Wildpflanzen als Virusquelle haben (Stevens *et. al*, 1997).

Sowohl milde Winter, die für grössere Blattlauspopulationen im nachfolgenden Anbaujahr verantwortlich sind, als auch überwinterte virusinfizierte Wildpflanzen in den Anbaugebieten, haben entscheidenden Einfluss auf den Infektionsdruck im Zuckerrübenbestand (Smith, 1989; Stevens *et al.*, 1994). Von virusinfizierten Wildpflanzen werden durch geflügelte Blattläuse Primärinfektionen in *B. vulgaris* etabliert (Smith, 1989). Von diesen primär infizierten Pflanzen erfolgt meist durch ungeflügelte Blattläuse eine weitere Ausbreitung der Viren im Bestand, was im Spätsommer zu typischen vergilbten Teilbeständen auf der Anbaufläche führt (Hull, 1963). Die in Europa vorkommenden Vergilbungsviren BMV, BChV und BYV variieren in ihrer Pathogenität und in ihrem Effekt auf den Zuckerertrag von *B. vulgaris* (Russell, 1962; Björling & Möllerström, 1974; Björling, 1976; Smith, 1989; Smith & Hallsworth, 1990; Heijbroek, 1990; de Koeijer & van der Werf, 1999; Stevens *et al.* 2004). Insbesondere wenn Jungpflanzen im Frühjahr mit Vergilbungsviren infiziert werden, können Reduktionen des Zuckergehalts von bis zu 40% festgestellt werden, während Infektionen zu einem späteren Zeitpunkt geringere Ertragseinbußen zur Folge haben (Smith & Hallsworth, 1990; Clover, *et al.*, 1999; Lewellen *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 2004). Zusätzlich zu der Erntereduktion durch die Virose wird an infizierten Pflanzen auch ein Ertragsverlust durch Folgebefall mit den phytopathogenen Pilzen *Alternaria tenuis* (Alternaria-Blattbräune) oder *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattflecken) beobachtet (Heiling *et al.*, 1956; Russell, 1960).

In verschiedenen Zuchtprogrammen wird versucht *B. vulgaris*-Sorten mit erhöhter Resistenz gegen Vergilbungsviren zu selektieren (Lewellen *et al.*, 2004a, 2004b); kommerziell sind derzeit aber noch keine resistenten Sorten erhältlich (Stevens *et al.*, 2004).

Da die Virose selbst nicht bekämpft werden können, erfolgt die Kontrolle der Viren im Rübenbestand weitgehend durch die Reduktion des Blattlausbefalls durch Insektizidbehandlung. Die Kosten für den Insektizideinsatz im Zuckerrübenanbau in Deutschland betragen im Jahr 2003 für 445.000 ha Anbaufläche € 13 Mio. (Jahresbericht 2003/2004 Industrieverband Agrar e.V.). In Mittel- und Nordeuropa dominiert der Einsatz des Wirkstoffes Imidacloprid (Neonikotinoid), der durch pilliertes Zuckerrübensaatgut ausgebracht wird. Im Jahr 2002 wurden in Deutschland 99% der Bestände, in England und Frankreich 72%, in Belgien 80%, in Finnland 44%, in Spanien 81% und in der Türkei 76% mit Imidacloprid (Gaucho[®], seit 2002 Imprimo[®] oder Akteur[®], Bayer Crop Science) behandelt (Dewar *et al.*, 2003). Der Einsatz von pilliertem Saatgut verhindert dabei bis zu acht Wochen nach Aussaat die schnelle Verbreitung der Vergilbungsviren durch flügellose Blattläuse im Jungpflanzenbestand (Westwood *et al.*, 1998, Dewar *et al.*, 2003). Auch wenn die Insektizidbehandlung die

Anzahl infizierter Rübenpflanzen um bis zu 20% reduziert und den Zuckerertrag um bis zu 24% erhöht, können dennoch 20-30% Pflanzen mit Vergilbungsviren infiziert werden (Dewar *et al.*, 2003) und als Virusquelle nach Abschwächung der Insektizidwirkung dienen (Stevens *et al.*, 2004). Die abnehmende Wirkung von Imidacloprid nach acht bis zehn Wochen findet in den meisten kommerziellen Zuckerrübenanbaugebieten zu einem Zeitpunkt statt, in dem sich die Physiologie der Pflanzen durch Umwandlung von Nährstoff benötigenden Blättern (*sink*) zu Nährstoff liefernden Blättern (*source*) ändert, und die vermehrte Einlagerung von Zucker in die Rübe beginnt (Dewar *et al.*, 2003). Diese Pflanzen werden in geringerem Umfang von Blattläusen besiedelt (Kift *et al.*, 1996). Die Verschlechterung der Zuckerrübe als eine passende Wirtspflanze im Verlauf der Vegetationsperiode scheint bei *Myzus persicae* mit dunklen Ablagerungen im Magen der Blattläuse verbunden zu sein, die ihren frühzeitigen Tod verursachen und somit die natürliche Übertragung von Vergilbungsviren vermindert. Solche Ablagerungen werden häufiger bei Blattläusen gefunden, die sich vorwiegend an älteren Pflanzen ernähren (Williams *et al.*, 1997).

Während der grossflächig verbreitete Einsatz von Imidacloprid derzeit noch die Ertragsverluste durch Vergilbungsviren im Zuckerrübenanbau vermindert, wurden in England und Griechenland *Myzus persicae* Klone entdeckt, die eine Toleranz gegenüber Imidacloprid und allen anderen getesteten Neonikotinoiden aufweisen (Smith *et al.*, 1990; Denholm *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2003). Die Ausbreitung solcher Toleranzen oder die Entwicklung von Resistenzen, wie sie bereits gegen Insektizide mit Wirkstoffen wie Pyrethroide (Devonshire *et al.*, 1986; Martinez-Torres *et al.*, 1999) oder Pirimicarb und Triazamat (Foster *et al.*, 1997; Moores *et al.*, 1994) nachgewiesen wurden, verdeutlichen die Notwendigkeit von Züchtungsprogrammen mit dem Ziel, virusresistente Sorten zu selektieren. Dies ist von besonderem Interesse, da trotz Insektizidbehandlung bis zu 30% des Bestandes durch einfliegende Blattläuse mit Vergilbungsviren infiziert werden können.

1.1.1 Beet mild yellowing virus (BMV)

Das *Beet mild yellowing virus* (BMV) aus der Familie der Luteoviren (Genus *Polerovirus*) wurde erstmals von Russell (1958) als ein *B. vulgaris* infizierendes Vergilbungsvirus in England beschrieben. BMV wird durch verschiedene Blattläuse (Hauptvektor *Myzus persicae*) zirkulativ nichtpropagativ übertragen (Russell, 1962; Björling & Nilsson, 1966). Das BMV-Wirtspflanzenspektrum umfasst Pflanzenarten aus den Familien der *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Asteraceae* und *Portulacaceae* (Hauser *et al.*, 2002). Eine Infektion führt, insbesondere an älteren Blättern, meist zu deutlichen Vergilbungssymptomen. In infizierten Pflanzen sind Luteoviren hauptsächlich auf das vaskuläre Pflanzengewebe beschränkt (Miller *et al.*,

1995). Auf dem einzelsträngigen, sinnpositiven BMV-Genom sind mindestens sechs offene Leseraster lokalisiert (Abbildung 1.2), wobei die im 5'-Genombereich arrangierten ORF0-2 durch eine nicht-kodierende Region von den ORF3-5 im 3'-Genombereich getrennt sind (Guilley *et al.*, 1995). Während die im 5'-Genombereich vorliegenden ORFs bei Luteoviren von genomischer RNA translatiert werden, erfolgt die Translation der ORFs im 3'-Genombereich von subgenomischer RNA (Mayo & Miller, 1999). Die Poleroviren PLRV und CABYV (Ashoub *et al.*, 1998), sowie das Luteovirus BYDV-PAV (Dinesh-Kumar *et al.*, 1992) besitzen eine zweite subgenomische RNA (sgRNA2), auf der die zwei kleinen ORF6 und ORF7 lokalisiert sind. Für BWYV und BMV wurde ein ORF7, der dem 3'-terminalen Bereich des ORF5 entspricht, durch Computeranalyse postuliert (Ashoub *et al.*, 1998).

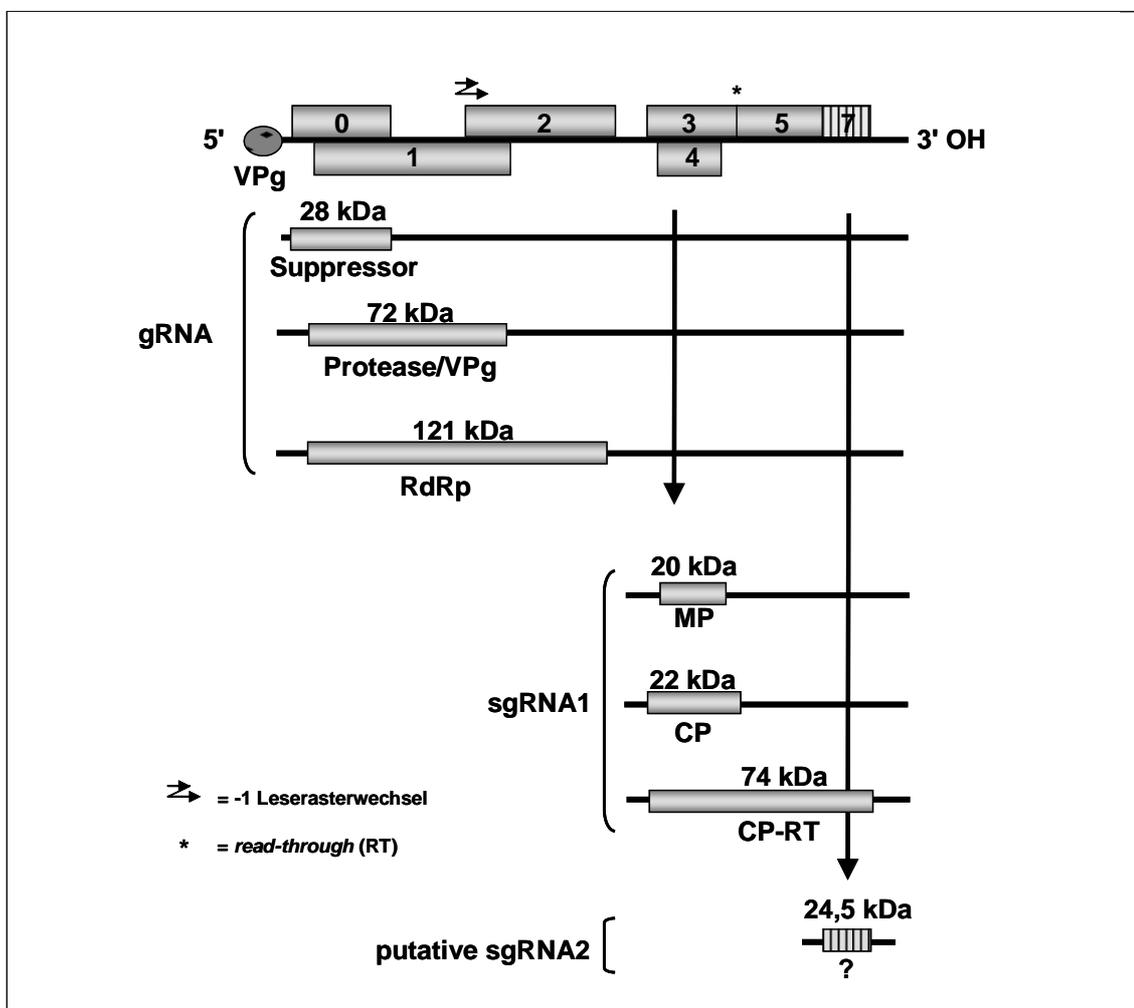


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Genomorganisation von BMV mit Angabe der ORFs und putativen Translationsprodukten, die von genomischer (gRNA) und subgenomischer RNA (sgRNA) translatiert werden können. Ein auf einer putativen BMV sgRNA2 lokalisierter BMV-ORF7 im 3'-terminalen Bereich des ORF5 wurde nach Computeranalyse von Ashoub *et al.* (1998) postuliert.

Das einzige bisher komplett sequenzierte englische BMVYV-Isolat BMVYV-2ITB (GenBank X83110) besitzt eine Genomlänge von 5722 nt und zeigt hohe Homologien in putativen Aminosäuresequenzen, die von ORFs im 3'-Genombereich kodiert werden, zu BWYV (Guilley *et al.*, 1995) und BChV (Hauser *et al.*, 2000a, 2002). Dagegen können nur geringe Sequenzübereinstimmungen im 5'-Genombereich festgestellt werden. Eine Ausnahme ist dabei die Homologie im 5'-Genombereich des BMVYV-2ITB und des CABYV (Guilley *et al.*, 1995). Dies führt zu der Annahme, dass BMVYV und CABYV einen gemeinsamen Ursprung für die Gene im 5'-Genombereich besitzen, während der 3'-Genombereich möglicherweise den gleichen Ursprung besitzt wie bei BWYV oder BChV (Guilley *et al.*, 1995; Mayo & D'Arcy, 1999; Hauser *et al.*, 2002).

Über die Funktionen der putativen BMVYV Proteine P0-P5 liegen bisher keine spezifischen Untersuchungen vor. Aufgrund von Versuchen mit *full-length* Klonen anderer Polero- und Luteoviren kann aber auf eine mögliche Funktion geschlossen werden. Der ORF0 ist der am geringsten konservierte kodierende Bereich innerhalb des Genus *Polerovirus* (Guilley *et al.*, 1995; Hauser *et al.*, 2000a, 2002) und ist bei Spezies des Genus *Luteovirus* nicht vorhanden (Mayo & Ziegler-Graff, 1996). Auch wenn das ORF0 Proteinprodukt P0 noch nicht in infizierten Pflanzen nachgewiesen werden konnte, führt eine Unterbindung der P0-Expression von PLRV und BWYV zu einer starken Reduzierung oder einer Verhinderung der RNA-Akkumulation (Ziegler-Graff *et al.*, 1996; van der Wilk *et al.*, 1997; Sadowy *et al.*, 2001a). Durch Pfeffer *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass das P0 von PLRV, BWYV und CABYV die Aktivität eines Suppressors des RNA-*silencing* besitzt. Die Vermutung von Mayo *et al.* (1989) und Veidt *et al.* (1992), dass das P0 eine Rolle bei der Wirtspflanzenspezifität spielt, ist bisher nicht bestätigt worden. Bei transgenen Kartoffelpflanzen, die das P0 des PLRV exprimieren, können typische Blattrollsymptome festgestellt werden (van der Wilk *et al.*, 1997). Der ORF1 und ORF2 sind die einzigen funktionellen Gene, die für eine BWYV-RNA Replikation in Protoplasten notwendig sind (Reutenauer *et al.*, 1993).

Der ORF2 kodiert zusammen mit dem ORF1 durch einen seltenen (1:100) ribosomalen -1 Leserahmenwechsel das P1-P2 Fusionsprotein von Luteoviren, welches in dem durch den ORF2 kodierten Bereich, das Aminosäuremotiv einer putativen RNA-abhängigen RNA Polymerase enthält (Prüfer *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1995; Mayo & Ziegler-Graff, 1996). Das P1 von Poleroviren zeigt Aminosäuremotive einer Chymotrypsin-ähnlichen Serin-Protease und kodiert für das proteolytisch prozessierte VPg (van der Wilk *et al.*, 1997; Prüfer *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Sadowy *et al.*, 2001 b). Innerhalb der P1 kodierenden Region des PLRV befindet sich in einem anderen Leseraster eine interne ribosomale Erkennungssequenz (IRES), die zu der Translation

des für die Replikation notwendigen 5 kDa-Proteins Rap1 führt (Jaag *et al.*, 2003). Das Rap1 ist möglicherweise ein integraler Teil des PLRV-Replikationssprozesses.

Das Hüllprotein (CP) von Poleroviren wird durch die Proteine P3 und das *read through* Fusionsprotein P3-P5 (CP-RT) gebildet (Veidt *et al.*, 1988). Die beiden Hüllproteine bilden isometrische BMVYV-Viruspartikel mit einem Durchmesser von 26 nm (Chevallier *et al.*, 1983; Govier, 1985). Das P3 stellt den grössten Anteil an der Hülle, wobei das P3-P5 Fusionsprotein nicht unbedingt für die Bildung von BWYV-Partikeln benötigt wird (Reutenauer *et al.*, 1993; Brault *et al.*, 1995). Obwohl das P3 nicht notwendigerweise für die Replikation von BWYV benötigt wird, führt seine Abwesenheit zu einer Reduktion der BWYV-RNA Akkumulation in Protoplasten (Reutenauer *et al.*, 1993) und zum Ausbleiben einer systemischen Infektion der Wirtspflanze (Mutterer *et al.*, 1999a). Die durch den ORF5 kodierte im P3-P5 Fusionsprotein lokalisierte *read-through domain* (RTD) ist, wie das P3, nicht für eine BWYV Replikation erforderlich (Reutenauer *et al.*, 1993), besitzt aber einen Sequenzbereich, der für die Stabilität der Viruspartikel im Hämocoel von Blattläusen und für eine effiziente Virusübertragung benötigt wird (Brault *et al.*, 1995; Bruyère *et al.*, 1997; Brault *et al.*, 2000; Reinbold *et al.*, 2001). Allerdings werden PLRV-ähnliche Partikel, die in einem Baculovirus-Expressionssystem hergestellt werden und kein P5 enthalten, in gleicher Weise durch den Körper von Blattläusen transportiert und bleiben infektiös, wie Partikel mit RTD (Gildow *et al.*, 2000). Bei der Nahrungsaufnahme von Blattläusen gelangen Viruspartikel mit dem Phloemsaft über den Nahrungskanal in den Hinterdarm, von wo aus sie durch Endo- und Exozytose durch das Hämocoel bis zur Speicheldrüse gelangen (Garret *et al.*, 1993). Im Hämocoel werden die Viruspartikel durch Bindung an *Buchnera* GroEL, ein durch endosymbiotische Blattlausbakterien des Genus *Buchnera* produziertes Symbionin, stabilisiert (van den Heuvel *et al.*, 1997 & 1999). Die Vektorspezifität von Luteoviren ist unter anderem von der Möglichkeit der Aufnahme von Viruspartikeln in die Speicheldrüse abhängig (Peiffer *et al.*, 1997). Von der Speicheldrüse gelangen die Viruspartikel in den Speichelkanal und können so durch Speichelfluss bei der Nahrungsaufnahme wieder abgegeben werden (Gildow *et al.*, 2000).

Die biochemischen Eigenschaften des durch den PLRV ORF4 kodierten P4 lassen vermuten, dass es am phloem-spezifischen Virustransport beteiligt ist (Tacke *et al.*, 1993). BWYV-Mutanten, bei denen die P4-Expression unterbunden ist, bleiben weiterhin in *N. clevelandii* infektiös, auch wenn der Infektionsverlauf verlangsamt ist (Mayo & Ziegler-Graff, 1996). Die Notwendigkeit der Expression des P4 für eine systemische Infektion ist wirtsspezifisch (Lee *et al.*, 2002). Das durch den PLRV-ORF7 kodierte putative P7 wird nur in geringem Umfang exprimiert und besitzt aufgrund

seiner Nukleinsäurebindungskapazität vermutlich eine Rolle bei der Regulation der viralen Transkription (Ashoub *et al.*, 1998).

Der Nachweis einer BMVYV-Infektion in Pflanzen erfolgt üblicherweise durch ELISA mit verschiedenen polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern (Kühne *et al.*, 1985; Smith, 1990; Graichen & Rabenstein, 1996; Smith *et al.*, 1996). Trotz der hohen serologischen Verwandtschaft von Poleroviren ist ein monoklonaler Antikörper (MAb BYDV-PAV-IL1; D'Arcy *et al.*, 1989) erhältlich, der nur BMVYV und nicht BWYV oder BChV nachweist (Stevens *et al.*, 1994; Hauser *et al.*, 2000b). Des Weiteren können Poleroviren aufgrund von Sequenzunterschieden in ihrem 5'-Genombereich durch RT-PCR und der Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden voneinander unterschieden werden (Hauser *et al.*, 2000b). Eine BMVYV-Infektion von jungen Zuckerrübenpflanzen im Mai kann den Zuckerreinertrag um bis zu 35% reduzieren, während eine Infektion im Juli eine Reduktion von bis zu 15% zur Folge haben kann (Smith & Hallsworth, 1990; Stevens *et al.*, 2004). Die Verluste im Zuckerertrag sind dabei nicht durch ein verringertes Blattflächenwachstum oder einen geringeren Blattflächenindex sondern durch eine Zunahme an vergilbter Blattfläche erklärbar (de Koeijer & van der Werf, 1999). Zusätzlich werden erhöhte Natrium- und Amino-Stickstoffgehalte in der Rübe nachgewiesen, die eine industrielle Zuckerextraktion erschweren (Stevens *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2004). Eine Reduktion des Ernteverlustes an Zuckerrüben durch BMVYV erfolgt zum einen durch Bekämpfung der Blattläuse als Virusvektoren mittels Applikation von Insektiziden und zum anderen durch Anbau toleranter Zuckerrübensorten. Derzeit sind keine BMVYV-resistenten Sorten kommerziell erhältlich (Stevens *et al.*, 2004).

1.1.2 Beet chlorosis virus (BChV)

Das Polerovirus *Beet chlorosis virus* (BChV) aus der Familie der Luteoviren wurde erstmals von Stevens *et al.* (1994) als ein zweiter BMVYV-Stamm in englischen Zuckerrübenanbaugebieten beschrieben. Etwa zur gleichen Zeit wurde aus den Vereinigten Staaten von einem neuen Vergilbungsvirus in Zuckerrüben berichtet, das serologisch mit BWYV verwandt war (Liu *et al.*, 1999). Aufgrund des Symptombildes mit Vergilbung der Interkostalfelder, Blattchlorosen und nekrotischen Blattveränderungen an *B. vulgaris* Pflanzen (Abbildung 1.3) wurde dieses neue Virus von Liu *et al.* als *Beet chlorosis virus* beschrieben.

Durch molekulare, biologische und serologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass BChV nicht als ein BMVYV-Stamm sondern als neue Virusspezies innerhalb des Genus Polerovirus angesehen werden muss (Hauser *et al.*, 2000a). Das BChV ist noch nicht als eigenständige Spezies durch das *International Committee of Taxonomy of Viruses* (ICTV) bestätigt worden (Hauser *et al.*, 2002). Im Vergleich zu

BMV und BWV zeigt das BChV ein eingeschränktes Wirtspflanzenspektrum, infiziert aber im Gegensatz zu den beiden ersten Viren *C. capitatum* (Hauser *et al.*, 2000a, 2002). Während BMV und BWV *C. bursa-pastoris* in großem Umfang infizieren können, wird bei dieser Pflanzenart von einer BChV-Infektionsrate von unter 5% berichtet (Hauser *et al.*, 2002).

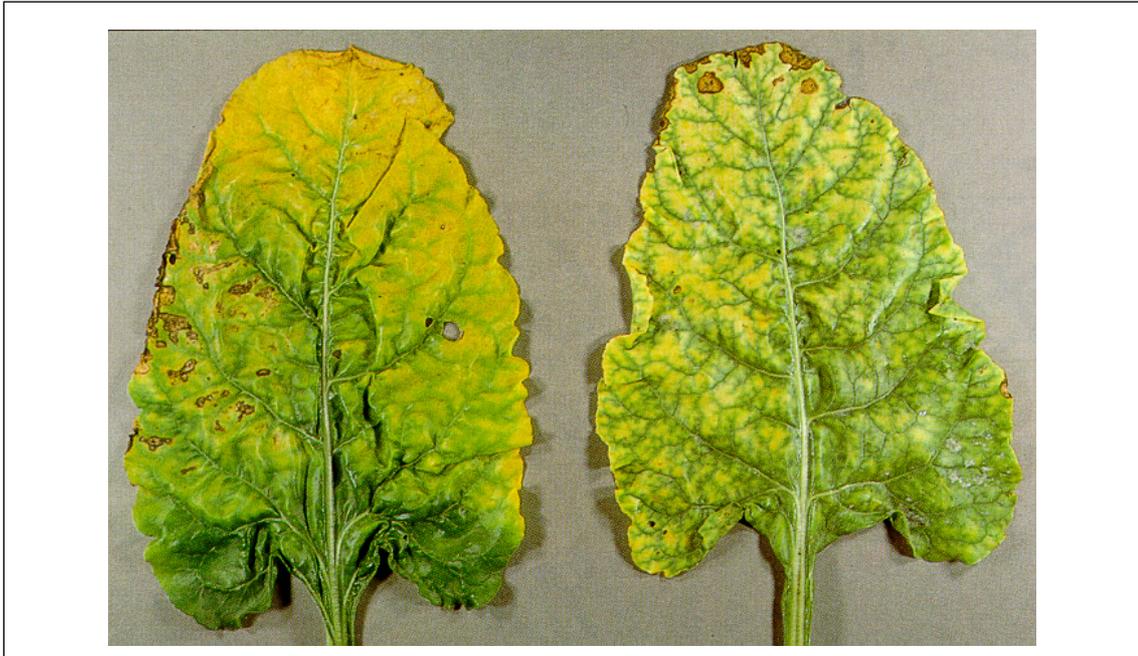


Abbildung 1.3: Virussympptome ausgelöst durch BMV (links) und BChV (rechts) an Blättern von infizierten *B. vulgaris* (zur Verfügung gestellt von Mark Stevens).

Durch Hauser *et al.* (2002) wurde die Genomsequenz von englischen und amerikanischen BChV-Isolaten bestimmt (GenBank: BChV-2a AF352024; BChV-CR AF352025; BChV NC_002766). Auf dem sinnpositiven, einzelsträngigen RNA-Genom mit einer Länge zwischen 5742 nt (BChV-CR) und 5776 nt (BChV-2a und BChV) sind, wie bei allen anderen Poleroviren, mindestens sechs grosse offene Leserahmen in einem 5'-Gencluster mit den ORF0-2 und einem 3'-Gencluster mit den ORF3-5 arrangiert. Wie für das BMV liegen auch für das BChV keine Untersuchungen zu den Funktionen der putativen Proteine P0-P5 vor. Aufgrund der von Hauser *et al.* festgestellten konservierten Sequenzbereiche dürfen aber ähnliche Proteinfunktionen angenommen werden, wie sie bereits bei der Beschreibung des BMV weiter oben aufgeführt sind.

Das BChV zeigt hohe Sequenzhomologien zu BMV und BWV im Bereich des 3'-Genclusters und eine geringe Übereinstimmung in den Genen, die im 5'-Bereich des Genoms organisiert sind. Der phylogenetische Vergleich lässt vermuten, dass BChV, BMV und BWV einen gemeinsamen Ursprung in ihrem 3'-Genombereich besitzen

und die Gene im 5'-Genombereich verschiedener Herkunft sind (Hauser *et al.*, 2000a, 2002). Das BChV ist dabei näher mit dem BMV als mit BWVYV verwandt.

In epidemiologischen Untersuchungen wird von einer Zunahme der BChV/BMVYV-Mischinfektionen in Zuckerrüben berichtet (Hauser *et al.*, 2000c). Der Nachweis einer BChV-Infektion kann dabei nur durch eine Testpflanzendiagnose oder durch RT-PCR mit BChV-spezifischen Oligonukleotiden erfolgen. Derzeit ist kein Antiserum erhältlich, das einen serologischen Nachweis von BChV ohne Kreuzreaktion mit BMVYV ermöglicht (Stevens *et al.*, 1994; Hauser *et al.*, 2000a).

Eine Infektion von Zuckerrübenjungpflanzen im Mai verringert den Zuckerertrag deutlich, wobei die Ertragsverluste variabler (8-24%) und geringer sind, als sie bei einer Infektion mit dem BMVYV festgestellt werden (Stevens *et al.*, 2004). Wird dagegen eine BChV-Infektion erst im Juli etabliert führt dieses zu höheren Ertragsverlusten als sie bei BMVYV-Infektionen zum gleichen Zeitpunkt nachweisbar sind (Stevens *et al.*, 2004). In den Vereinigten Staaten wird von einer Reduktion des Zuckerertrags nach einer BChV-Infektion von 5-40% berichtet (Lewellen *et al.*, 1999). Die Testung der im Anbau befindlichen Zuckerrübensorten auf eine Resistenz oder Toleranz gegenüber einer BChV-Infektion ist bisher nur in geringem Umfang erfolgt. Alle bisherigen Sortentestungen in England wurden mit Blattläusen durchgeführt, die auf BMVYV-infizierten *C. bursa-pastoris*, einer Nicht-Wirtspflanze des BChV, angezogen wurden (Stevens *et al.*, 2004). In den Vereinigten Staaten sind bereits *B. vulgaris* Zuchtlinien registriert worden, die eine Toleranz gegenüber BChV besitzen (Lewellen, 2004a, 2004b).

1.1.3 **Beet yellows virus (BYV)**

Das *Beet yellows virus* (BYV) wurde erstmals von Roland (1936) als ein blattlausübertragbares Vergilbungsvirus an *B. vulgaris* beschrieben. Das BYV ist die Typspezies des Genus *Closterovirus* innerhalb der Familie *Closteroviridae* (Agranovsky *et al.*, 1994). Es wird semi-persistent durch 22 Blattlausarten (Hauptvektoren *Myzus persicae* und *Aphis fabae*) auf 121 Pflanzenarten, hauptsächlich aus den Familien *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Aizoaceae* und *Caryophyllaceae*, übertragen (Duffus, 1973; Karasev, 2000). An BYV-infizierten *B. vulgaris* Pflanzen können starke Adernaufhellungen und Vergilbungen an jungen Blättern beobachtet werden. An älteren Blättern sind diese Vergilbungen intensiver und mit nekrotischen Bereichen durchsetzt (Duffus, 1973).

Das BYV besitzt ein sinnpositives, einzelsträngiges RNA-Genom mit einer Gesamtlänge von ~15,5 kb und einer 5'-terminalen Cap-Struktur. Auf dem RNA-Genom sind neun offene Leserahmen arrangiert (Abbildung 1.4), von denen die 3'-terminalen ORF2-8 von sieben subgenomischen RNAs translatiert werden (He *et al.*,

(Dolja, 2003). Neben den beiden Hüllproteinen wurden in BYV-Partikeln auch Hsp70h (Napuli *et al.*, 2000), P64 (Napuli *et al.*, 2003) und P20 (Prokhnevsky *et al.*, 2002) als integrale Bestandteile des Virions beschrieben. Während das durch CP geformte Viruspartikel dem Schutz der genomischen RNA dient, hat der distinkt geformte Partikelanhang aus CPm, Hsp70h, P64 und P20 eine Funktion in der systemischen Ausbreitung (Medina *et al.*, 1999; Alzhanova *et al.*, 2001; Prokhnevsky *et al.*, 2002; Dolja, 2003). Das P6 ist das einzige nicht an der Viruspartikelbildung beteiligte Movementprotein, dessen genaue Funktion bei der Virusausbreitung aber noch bestimmt werden muss (Dolja, 2003).

Wie andere Closteroviren auch, besitzt BYV eine hohe Phloemaffinität und akkumuliert dort so stark, dass es zu einer Blockierung der Siebröhren durch Viruspartikel kommen kann (Dolja, 2003). Bereits zu einem frühen Infektionszeitpunkt können in BYV-infizierten Pflanzen Membranvesikel (BYV-type Vesikel) beobachtet werden, welche vermutlich der Ort der Virusreplikation sind (Esau & Höfert, 1971; Erokhina *et al.*, 2001). Diese BYV-type Vesikel sind bei vielen sinnpositiven RNA Viren, deren Replikation membranassoziiert ist, nachweisbar (Ahlquist, 2002).

Eine Infektion von jungen *B. vulgaris* Pflanzen mit BYV führt zu einer Reduktion des Zuckerertrages um bis zu 47% (Smith & Hallsworth, 1990), wobei der Ernteausfall weniger durch eine niedrige Zuckerkonzentration in der Rübe, als durch ein verringertes Rübenwachstum hervorgerufen wird (Clover *et al.*, 1999). Eine Virusinfektion nach dem 16-Blattstadium führt zu keinem signifikanten Ertragsverlust (Smith & Hallsworth, 1990). Wie bei den Vergilbungsviren BMYV und BChV werden in BYV-infizierten Rüben erhöhte Kalium-, Natrium- und Amino-Stickstoffgehalte gemessen, die zu Problemen bei der industriellen Zuckerextraktion führen (Smith & Hallsworth, 1990; Clover *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu BMYV-Infektionen wird an BYV-infizierten Rübenpflanzen ein geringerer Blattflächenindex, ausgelöst durch ein geringes Flächenwachstum von jungen Blättern, und dadurch ein höherer Anteil an vergilbter Blattfläche beobachtet (de Koeijer & van der Werf, 1999; Clover *et al.*, 1999). Eine herabgesetzte Photosyntheserate ist zumindest teilweise für das verringerte Rübenwachstum verantwortlich (Clover *et al.*, 1999).

Die Reduzierung von Ernteverlusten durch BYV-Infektionen im Zuckerrübenanbau erfolgt, wie bei den Vergilbungsviren BMYV und BChV, durch prophylaktische Insektizidapplikationen, Selektion und Anbau toleranter *B. vulgaris* Sorten (Smith, 2001; Lewellen 2004a, 2004b).

1.2 Virusausbreitung in der Pflanze und Phloemlimitierung von Luteoviren

Die Ausbreitung von Viren innerhalb der Pflanze erfolgt vom Ort der primären Infektion im Kurzstreckentransport durch Zell-zu-Zell Bewegung über Plasmodesmen und im

Langstreckentransport durch das vaskuläre Pflanzengewebe (Godefroy-Colburn *et al.*, 1991; Carrington *et al.*, 1996). Für einen Transport werden sowohl viral kodierte Movement-Proteine (MP) als auch pflanzliche Faktoren benötigt (Atabekov & Taliansky, 1990).

Bei der natürlichen Übertragung durch Blattläuse werden Luteoviren direkt in das Phloemgewebe (Siebröhrenelemente) entlassen, von wo aus eine Ausbreitung sowohl über den Phloemstrom als auch lateral in Geleit- und in vaskuläre Parenchymzellen, die vermutlich die Orte der Virusreplikation sind, stattfindet (Barker & Harrison, 1986; Derrick & Barker, 1997). Die Ausbreitung von den Siebröhrenelementen in andere Bereiche erfolgt vermutlich über Plasmodesmen, scheint aber auf Geleitzellen, vaskuläre Parenchymzellen und in sehr seltenen Fällen auch auf einige Mesophyllzellen begrenzt zu sein (Barker, 1987; van den Heuvel *et al.*, 1995). Die Ausbreitungsmöglichkeit von Luteoviren ist dabei auf die in ihrer Struktur oder Physiologie spezialisierten Plasmodesmen zwischen Geleitzellen, vaskulärem Parenchym oder direkt angrenzenden Mesophyllzellen beschränkt (Mutterer *et al.*, 1999a). Das durch den ORF4 von Luteoviren kodierte putative 17 kDa MP kann in PLRV *Amplicon*-transgenen Pflanzen an Plasmodesmen, die Phloemgeleitzellen mit den Siebröhren verbinden, aber nicht an Plasmodesmen von Mesophyllzellen nachgewiesen werden (Schmitz *et al.*, 1997). Für eine systemische Ausbreitung des *Luteovirus* BYDV-PAV wird das Genprodukt des ORF4 benötigt (Chay *et al.*, 1996). Ziegler-Graff *et al.* (1996) konnten zeigen, dass sich BWYV-ORF4 Mutanten, die kein P4 aber P3 und das RTD exprimieren, systemisch ausbreiten können, aber eine Funktion des P4 als MP an Plasmodesmen, die Phloemzellen verbinden, nicht ausgeschlossen werden kann. Möglicherweise besitzen verschiedene Luteoviren auch unterschiedliche Möglichkeiten zur Ausbreitung innerhalb der Pflanze, wobei ein Luteovirus auch verschiedene Ausbreitungsmöglichkeiten (i) in verschiedenen Wirtspflanzen, (ii) an unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsverlaufs oder (iii) zwischen verschiedenen Arten von Phloemzellen besitzen kann (Mutterer *et al.*, 1999a). So können nach Agroinfektion PLRV-ORF4 Mutanten *Nicotiana* ssp. systemisch infizieren, während in *Physalis floridana* oder *Solanum tuberosum* die Infektion auf das agroinokulierte Blatt beschränkt bleibt (Lee *et al.*, 2002). Das PLRV MP wird für eine systemische Infektion nur in bestimmten Wirtspflanzen benötigt. Für BWYV (Ziegler-Graff *et al.*, 1996) und BYDV-PAV (Chay *et al.*, 1996) konnte gezeigt werden, dass das CP und das CP-RT für eine effiziente Virusakkumulation und -ausbreitung benötigt werden. Möglicherweise besitzen Luteoviren zwei parallele wirtsabhängige Wege der Virusausbreitung: einen ORF4-abhängigen und einen ORF4-unabhängigen Weg. Der ORF4-unabhängige Weg beinhaltet den Transport von

Virionen, wobei das CP-RT eine Funktion als MP oder stabilisierender Faktor besitzt. Der ORF4-abhängige Weg beinhaltet möglicherweise einen RNA-ORF4 Protein Komplex als Form des Transportes (Ziegler-Graff *et al.*, 1996).

Da sich Luteoviren wie BYDV-PAV (Young *et al.*, 1991), BWYV (Veidt *et al.*, 1992) und PLRV (Barker & Harrison, 1982) in Protoplasten aus Mesophyllzellen replizieren können, kann die Phloemlimitierung nicht auf eine Unfähigkeit zur Vermehrung von Luteoviren in anderen Gewebebereichen als dem Phloem zurückgeführt werden (Mutterer *et al.*, 1999a). Wenn PLRV infizierte Pflanzen mit PVY, *Carrot mottle virus* (CMoV, Genus *Umbravirus*), *Tobacco rattle virus* (TRV, Genus *Tobravirus*) oder *Pea early-browning virus* (PEBV, Genus *Tobravirus*) ko-inokuliert werden, kann jedoch eine erhöhte Anzahl an PLRV infizierten Mesophyllzellen festgestellt werden (Barker, 1987 & 1989). Ähnliche Ergebnisse wurden in Mischinfektionen von BWYV infizierten Pflanzen mit *Potato virus V* (PVV, Genus *Potyvirus*), PEBV oder CMoV erzielt (Barker, 1989). Lange Zeit wurde daher vermutet, dass die Phloemlimitierung von Luteoviren vor allem durch das Fehlen einer Movementfunktion bestimmt wird, die in Mischinfektionen mit Viren, die sich in allen Gewebebereichen der Pflanze ausbreiten können, teilweise bereitgestellt werden kann. In den von Franco-Lara *et al.* (1999) beschriebenen PLRV *Amplicon*-transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen konnte überraschenderweise, obwohl jede Zelle die Möglichkeit zur Expression des Transgens besaß, nur in einer geringen Anzahl von Zellen in Stamm- und Epidermisgeweben ausserhalb des Phloems PLRV nachgewiesen werden. Dieser Umstand wurde als eine Form der Resistenz, die ein Grossteil der nicht vaskulären Zellen ausprägt, beschrieben. Das RNA-vermittelte Abwehrmechanismen der Pflanze, wie post-transkriptionelles *gene silencing* (PTGS), ein Teil des Mechanismus sind, der die Infektion von nicht vaskulärem Gewebe mit PLRV unterbindet, wurde in einer Reihe von Berichten durch Ryabov *et al.* (2001a), Savenkov & Valkonen (2001) und Barker *et al.* (2001) vermutet. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von viralen Suppressoren des *silencing*, wie das potyvirale P1/HC-Pro oder das *Cucumber mosaic virus* (CMV, Genus *Cucumovirus*) 2b zu einer Erhöhung des PLRV Virustiter zumindest im Phloem führt. In Mischinfektionen mit Viren, von denen bekannt ist, dass sie Suppressoren des RNA-*silencing* besitzen, kann auch eine erhöhte Anzahl von infizierten Mesophyllzellen nachgewiesen werden. Durch Taliansky *et al.* (2004) konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der PLRV-Replikation in PLRV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* durch biotische und abiotische Stressfaktoren umgangen (*escape*) werden kann. Eine Infektion von nicht vaskulärem Gewebe mit PLRV und die Möglichkeit zur mechanischen PLRV-Übertragung wurde in Mischinfektionen mit dem Umbravirus PEMV-2 festgestellt (Ryabov *et al.*, 2001a). Die

mechanische Übertragung von BMV, und vermutlich auch von anderen Luteoviren, ist in Mischinfektionen mit den Umbraviren PEMV-2 oder *Groundnut rosette virus* (GRV) möglich (Mayo *et al.*, 2000). Dieser Vorgang beinhaltet ein limitiertes Movement im Mesophyllgewebe, die Phloembeladung im inokulierten Blatt und das Verlassen des Phloemgewebes um Mesophyllgewebe in systemisch infizierten Blättern (Ryabov *et al.*, 2001a). Das durch den ORF4 von Umbraviren kodierte MP vermittelt dabei vermutlich die Ausbreitung von Luteoviren in nicht vaskulärem Gewebe. Eine erfolgreiche Akkumulation und Ausbreitung von Luteoviren in Zellen ausserhalb des Phloems benötigt danach sowohl (i) eine Unterdrückung (Suppression) oder Umgehung (*escape*) eines pflanzlichen Abwehrmechanismus wie PTGS und (ii) die Komplementation der Zell-zu-Zell Ausbreitung in diesen Geweben (Ryabov *et al.*, 2001a; Barker *et al.*, 2001; Taliansky *et al.*, 2004).

1.3 Herstellung poleroviraler *full-length* cDNA Klone und Testung der Infektiosität durch Agroinfektion

Das Verständnis der molekularen Biologie von Viren und der Funktion der verschiedenen exprimierten Proteine ist eine Grundvoraussetzung für die Bekämpfung der Virusausbreitung und die Entwicklung von antiviralen Strategien (Urcuqui-Inc *et al.*, 2001).

Ein viraler *full-length* cDNA Klon ist ein durch molekularbiologische Methoden in die DNA-Form überführtes und kloniertes Abbild eines natürlichen RNA-Genoms. Die Herstellung eines *full-length* Klons von einem RNA-Virus beinhaltet die reverse Transkription der gesamten RNA-Sequenz und gegebenenfalls die Amplifikation der cDNA durch PCR sowie die anschließende Klonierung des dsDNA Fragments in geeignete Plasmidvektoren. Die reverse Transkription und die Amplifikation kann dabei auch mit Teilfragmenten durchgeführt werden, die anschließend zu einem vollständigen *full-length* Klon zusammengesetzt werden.

Full-length Klone lassen sich genetisch durch Insertionen und Deletionen gezielt verändern und bieten damit die Möglichkeit, funktionelle Genombereiche zu analysieren. Aufgrund limitierter molekularbiologischer Möglichkeiten war die Veränderung viraler RNA-Genome lange Zeit nur eingeschränkt möglich. Das erste genetisch modifizierte RNA-Virus, der Q β Phage (Familie *Leviviridae*), wurde mit aufwändigen Methoden *in vitro* chemisch modifiziert, wobei die Möglichkeiten einer RNA-Mutation begrenzt waren (Flavell *et al.*, 1974). Mit der zunehmenden Anwendung von revers-genetischen Methoden, der DNA-Klonierung und Vermehrung von Plasmiden in Bakterienzellen wurde es möglich, virale RNA in komplementäre DNA zu überführen und für eine leichtere Manipulation in Plasmidvektoren zu überführen. Der erste virale cDNA *full-length* Klon wurde ebenfalls vom Bakteriophagen Q β erstellt, in Plasmidvektoren

überführt und war in bakteriellen Wirtszellen infektiös (Tanigushi *et al.*, 1978). Mit dieser Methode wurden eine Reihe von infektiösen polioviralen (Familie *Picornaviridae*) cDNA *full-length* Klonen hergestellt (Racaniello & Baltimore, 1981), wobei nicht vollständig klar ist, wie es zu der promotorlosen Transkription der infektiösen RNA gekommen ist (Boyer & Haenni, 1994; Lai, 2000). Das *Brome mosaic virus* (BMV, Familie *Bromoviridae*) war das erste pflanzenpathogene RNA-Virus von dem ein cDNA-Klon erstellt wurde (Ahlquist *et al.* 1984; Ahlquist & Janda, 1984). Durch Verwendung eines modifizierten λ -Phagen Promotors (Ahlquist *et al.*, 1984) und eines Promotors des Bakteriophagen T7 (Ahlquist *et al.*, 1987) war der BMV *full-length* Klon der erste cDNA-Klon mit exakt terminiertem 5'-Ende. Der Einsatz von Promotoren und RNA-Polymerasen aus den Bakteriophagen T7, T3 und SP6 oder dem *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, Familie *Caulimoviridae*) 35S RNA-Promotor (Guilley *et al.*, 1982; Odell *et al.*, 1985) machte es möglich, die 5'-terminalen Enden der *full-length* cDNA Klone so zu erstellen, dass die primär transkribierte RNA keine nicht-viralen Fremdnukleotide besaß (Boyer & Haenni, 1994). Während in Systemen mit RNA-Polymerasen aus Bakteriophagen die virale RNA erst *in vitro* transkribiert und dann in entsprechende Wirtszellen überführt werden muss, können virale *full-length* Klone unter Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors direkt in Pflanzenzellen eingebracht werden. Die CaMV 35S-Promotorsequenz bewirkt die *in vivo* Transkription der viralen cDNA durch pflanzeigene DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Der *Tobacco mosaic virus* (TMV, Genus *Tobamovirus*) war das erste Virus von dem ein infektiöser cDNA *full-length* Klon unter CaMV 35S-Promotorkontrolle erstellt wurde (Yamaha *et al.*, 1988). Der CaMV 35S-Promotor wird in einem Großteil der dikotylen und monokotylen Pflanzenzellen, auch im vaskulären Gewebe, erkannt (Mutterer *et al.*, 1999b). Die Verlängerung des 5'-Terminus der primären viralen RNA-Transkripte um einige zusätzliche Nukleotide kann die Infektiosität bereits verhindern, während eine 3'-terminale Verlängerung nur einen geringen Einfluss hat (Boyer & Haenni, 1994). Eine Transkriptionstermination der *full-length* cDNA kann durch Integration von Polyadenylierungs- und Ribozymsequenzen oder anderer Terminatoren erfolgen. Die Testung der Infektiosität von luteoviralen *full-length* cDNA Klonen beinhaltet die erfolgreiche Überführung der RNA-Transkripte, cDNA Klone oder infektiöser Viruspartikel in pflanzliche Zellen. Die Übertragung von Luteoviren kann durch Blattläuse, die an infizierten Pflanzen und Protoplasten gesaugt haben (Veidt *et al.*, 1992), durch Pfropfung (Barker & Harrison, 1985), durch die Methode der Agroinfektion (Leiser *et al.*, 1992) und durch biolistische Inokulation gereinigter viraler RNA mittels Partikelbeschusstechnik (Hoffmann *et al.*, 2001; Helloco-Kervarrec *et al.*, 2002) erfolgen.

Die ersten infektiösen RNA-Transkripte von einem *full-length* cDNA Klon eines Luteovirus wurden von Young *et al.* (1991) von einem *Barley yellow dwarf*-PAV Isolat (BYDV-PAV) in einem T7-Promotor System hergestellt und in Gersteprotoplasten überführt. Aufgrund der Phloemgebundenheit von Mitgliedern der Familie *Luteoviridae* war eine mechanische Inokulation der *in vitro* Transkripte nicht möglich, eine Übertragung durch Blattläuse, die an infizierten Protoplasten gesaugt hatten, war jedoch erfolgreich. In ähnlichen Versuchen mit BWYV konnten durch Veidt *et al.* (1992) die ersten in *Chenopodium quinoa* Protoplasten infektiösen *in vivo* Transkripte eines Polerovirus hergestellt werden. Unter Anwendung der von Grimsley *et al.* (1986) beschriebenen Methode der Agroinfektion von Pflanzen mit *full-length* Klonen von Pflanzenviren wie *Maize streak virus* (MSV, Familie *Geminiviridae*) mit einzelsträngigem, zirkulärem DNA-Genom konnte von Leiser *et al.* (1992) gezeigt werden, dass diese Methode auch für einzelsträngige RNA Viren angewandt werden kann. Durch Verwendung des von Veidt *et al.* (1992) beschriebenen BWYV *full-length* cDNA Klons und Überführung der Sequenz unter CaMV 35S Promotor-, Ribozym- und Nopalinsynthase-Terminationskontrolle (NOS-Term) konnte der Klon als T-DNA in den binären Vektor Bin 19 (Bevan, 1984) integriert werden. Nach Elektroporation in den *A. tumefaciens*-Stamm LBA4404 konnten *Physalis floridana*, *Nicotiana clevelandii* und *Nicotiana benthamiana* Pflanzen erfolgreich mit BWYV agroinfiziert werden. Von den Poleroviren CABYV (Prüfer *et al.*, 1995) und PLRV (Commandeur & Martin, 1993; Prüfer *et al.*, 1997; Franco-Lara *et al.*, 1999) wurden ebenfalls *full-length* cDNA-Klone für *in vitro* oder *in vivo* Untersuchungen der Genomfunktion hergestellt. Die einzigen Poleroviren, von denen es bisher nicht gelungen ist, infektiöse *full-length* cDNA Klone zu erstellen, sind BMV, BChV und CYDV-RPV.

Um die Infektiosität von poleroviralen *full-length* cDNA Klonen zu überprüfen wird, neben der *in vitro* Transkription und einer anschließenden Überführung der RNA in Protoplasten, die Methode der Agroinfektion angewandt. Der Aufbau der *full-length* cDNA Konstrukte hat dabei entscheidenden Einfluss auf die Infektiosität. Da Poleroviren ein lineares RNA-Genom besitzen, muss die effiziente Transkription des viralen *full-length* Klons durch einen Promotor, wie den CaMV 35S-Promotor, gewährleistet sein (Mutterer *et al.*, 1999b). Die Verlängerung des 5'-terminalen primären RNA-Transkripts durch nicht-virale Nukleotide kann dabei die Infektiosität minimieren oder unterbinden (Boyer & Haenni, 1994). Das Vorliegen von einem (Prüfer *et al.*, 1995) oder zwei (Veidt *et al.*, 1992) Fremdnukleotiden in diesem Bereich verhindert allerdings nicht die Infektiosität von PLRV oder BWYV *full-length* Klonen. Das VPg ist viruskodiert und kann somit nicht an der primär transkribierten RNA vorliegen (Veidt *et al.*, 1992). Aus diesem Grund wird angenommen, dass das Fehlen

des VPg die Infektiosität von *in vitro* oder nach Agroinfektion transkribierten BWYV-, PLRV- oder CABYV-RNAs nicht verhindert (Mutterer *et al.*, 1999b). Im Gegensatz zu 5'-terminalen Fremdnukleotiden haben 3'-terminale nicht virale Sequenzbereiche selten einen negativen Einfluss auf die Infektiosität von viralen *full-length* Klonen (Boyer & Haenni, 1994). Die in vielen Vektorsystemen für die Transkriptionstermination verwendete NOS-Term Sequenz besitzt üblicherweise eine Länge von über 100 Basenpaaren, wodurch das primäre RNA-Transkript *in planta* nach einer Agroinfektion vermutlich 3'-terminal um den Sequenzbereich des NOS-Terminators und eines poly(A)-Schwanzes verlängert wird (Mutterer *et al.*, 1999b). Die exakte Termination der Translation kann durch die Integration einer Ribozymsequenz (Shintaku *et al.*, 1996; Dagless *et al.*, 1997; Symons, 1997) am 3'-Ende der viralen cDNA Sequenz erreicht werden. Obwohl für BWYV *full-length* cDNA Klone gezeigt werden konnte, dass die Infektiosität mit Konstrukten ohne Ribozym- und Nopalinsynthase-Termination nicht beeinflusst wird und alle 3'-nicht viralen Sequenzbereiche im Verlauf der viralen Replikation eliminiert werden (Leiser *et al.*, 1992; Brault *et al.*, 1995), muss dies nicht für andere Poleroviren zutreffen. Wenn die 3'-terminale Sequenz nicht in einem optimalen Kontext vorliegt, kann möglicherweise die Minusstrangsynthese durch eine virale RdRp unterbunden werden (Mutterer *et al.*, 1999b).

Bei allen bisher als *in vivo* infektiös beschriebenen poleroviralen *full-length* cDNA Klonen erfolgt die Transkriptionsinitialisierung durch einen CaMV 35S-Promotor. Alle Klone für Agroinfektionsversuche (Leiser *et al.*, 1992; Commandeur & Martin, 1993; Prüfer *et al.*, 1995; Brault *et al.*, 1995; Bruyère *et al.*, 1997; Mutterer *et al.*, 1999a; Kawchuk *et al.*, 2002) oder Pflanzentransformationen (Prüfer *et al.*, 1997; Franco-Lara *et al.*, 1999; Barker *et al.*, 2001; Taliansky *et al.*, 2004) wurden in den binären Vektor Bin 19 (Bevan, 1984) und in die *A. tumefaciens*-Stämme LBA4404 oder C58C1 überführt. Eine erfolgreiche Agroinfektion beinhaltet vermutlich die Induktion der *vir*-Genkette durch phenolische Substanzen, wie Wundsignalstoffe oder Acetosyringon (Stachel *et al.*, 1985; Alt-Mörbe *et al.*, 1988,1989), den Transport des *full-length* Klons als einzelsträngige T-DNA in die Pflanzenzelle und die Integration der T-DNA in das Pflanzengenom. Nach der Transkription und der Überführung der RNA in das Cytoplasma findet dort die Translation der viral kodierten Proteine statt (Mutterer *et al.*, 1999b). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine erfolgreiche Agroinfektion auch durch Transkription der T-DNA und der Synthese replikationsfähiger viraler Zwischenstufen vor der Integration in das Pflanzengenom möglich ist (Grimsley, 1995). Da Poleroviren phloemlimitiert sind, muss durch die angewandte Methode der Agroinfektion eine möglichst grosse Zahl von Phloemzellen erreicht werden, wobei der Zugang zu diesen Zellen in verschiedenen Pflanzenarten einen Einfluss auf die

Infektionsrate haben kann (Mutterer *et al.*, 1999b). Die Agroinfektion von Poleroviren erfolgte bisher ausschliesslich durch Injektion der rekombinanten Bakterien mit einer Hamilton-Spritze in den Blattstiel und Stamm (Leiser *et al.*, 1992; Prüfer *et al.*, 1995; Brault *et al.*, 1995; Bruyère *et al.*, 1997; Mutterer *et al.*, 1999a; Nurkiyanova *et al.*, 2000; Kawchuk *et al.*, 2002) oder durch Injektion in das mit einer Rasierklinge verletzte Blattgewebe durch eine Spritze ohne Nadel (Nurkiyanova *et al.*, 2000).

Während durch Agroinfektionen der virale *full-length* Klon vermutlich nur im Inokulationsbereich in das Genom einzelner Pflanzenzellen integriert wird (Grimsley, 1995), besitzen *Amplicon*-transgene Pflanzen in jeder Zelle zumindest eine Kopie des *full-length* Klons als Transgen. In diesem Zusammenhang wird ein *Amplicon* als ein Transgen bezeichnet, das einen viralen *full-length* Klon unter Kontrolle eines Promotors, der die Expression von viralen RNA-Transkripten bewirkt, beinhaltet. In solchen *Amplicon*-transgenen Pflanzen werden durch Expression des Transgens potentiell alle Zellen mit dem Virus infiziert. Von Angell & Baulcombe (1997) wurde dagegen erstmals von einem *Amplicon*-induzierten RNA-*silencing* in *Potato virus X* (PVX) transgenen *N. tabacum* berichtet. Entgegen den Erwartungen wurde in allen selektierten PVX *Amplicon*-transgenen Linien eine reduzierte Virusakkumulation festgestellt und nur in wenigen Zellen war eine PVX-Infektion nachweisbar. Ein *Amplicon*-induziertes RNA-*silencing* wurde auch für das Polerovirus PLRV durch Franco-Lara *et al.* (1999), Barker *et al.* (2001) und Taliansky *et al.* (2004) beobachtet. Das RNA-*silencing* ist ein pflanzlicher Abwehrmechanismus, der auf der sequenzspezifischen Degradierung von RNA-Molekülen basiert (Baulcombe, 2002 a; Voinnet, 2001; Vance & Vaucheret, 2001; Carrington, 2000). Bei diesem Mechanismus werden durch Degradierung von dsRNA, die auch als replikative Zwischenstufe bei der Virusvermehrung entsteht, 21-25 nt lange *short interfering RNAs* (siRNAs) gebildet, die in sense- und antisense-Orientierung der zu degradierenden Ziel-RNA entsprechen und die Spezifität des *Silencing*-Prozesses ausmachen. *Amplicon*-transgene Pflanzen induzieren diesen RNA-*silencing* Prozess besonders effektiv, auch wenn eine Virusinfektion nicht unbedingt vollständig unterbunden wird (Taliansky *et al.*, 2004). Der RNA-*silencing* Prozess kann von Pflanzenviren, die Suppressoren des RNA-*silencing* besitzen, unterdrückt werden, wobei verschiedene Viren auch Unterschiede in ihrer Möglichkeit zur Suppression zeigen (Voinnet *et al.*, 1999). Durch Taliansky *et al.* (2004) konnte durch einen PLRV *full-length* Klon, in den eine GFP-Sequenz integriert und als PLRV-GFP *Amplicon* in *N. benthamiana* Pflanzen integriert worden war, gezeigt werden, dass der RNA-*silencing* Mechanismus durch (i) Ko-Infektion mit Viren, die für einen Suppressor kodieren, (ii) durch Viren, von denen kein Suppressor bekannt ist und (iii) durch biotische und abiotische Stressfaktoren beeinflusst werden kann. In dieser

Arbeit sollten BMYV *Amplicon*-transgene *N. benthamiana* mit BYV (Kapitel 1.1.3) und PVY (Kapitel 1.5), die einen Suppressor des RNA-*silencing* besitzen, und PEMV-2 (Kapitel 1.4), von dem bisher kein Suppressor bekannt ist, Ko-infiziert werden und mögliche Unterschiede zu nicht Ko-infizierten BMYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen untersucht werden.

1.4 *Pea enation mosaic virus-1/-2 (PEMV-1/-2)*

Der Pea enation mosaic Virus-Komplex ist eine obligate Symbiose von zwei verschiedenen voneinander abhängigen Pflanzenviren: das *Enamovirus Pea enation mosaic virus-1* (Familie *Luteoviridae*) und das noch keiner Virusfamilie zugeordnete *Umbravirus Pea enation mosaic virus-2* (de Zoeten & Skaf, 2001).

Das PEMV-1/-2 besitzt ein eingeschränktes natürliches Wirtspflanzenspektrum und infiziert hauptsächlich Pflanzenarten wie *Phaseolus*, *Pisum*, *Trifolium* oder *Vicia* aus der Familie der Leguminosen (Hagedorn *et al.*, 1964; Izadpanah & Shepherd, 1966; Gonsalves & Shepherd, 1972; Hull & Lane, 1973). Als experimentelle Wirtspflanzen können auch *Nicotiana clevelandii* und *Nicotiana benthamiana* infiziert werden (Hagedorn *et al.*, 1964; Demler *et al.*, 1994b). An PEMV-1/-2 infizierten Erbsen werden zuerst Blattrollsymptome und anschliessend chlorotische und durchscheinende Blattflecken beobachtet. Drei Wochen nach einer Infektion werden an der Blattunterseite blasige, hyperplastische Auswüchse an den Blattadern (*enation*) beobachtet (de Zoeten & Skaf, 2001).

Die Übertragung von PEMV-1/-2 kann mechanisch oder auch persistent nicht-propagativ durch mindestens zehn Blattlausarten (Hauptvektoren *Acyrtosiphon pisum* und *Myzus persicae*) erfolgen (Demler *et al.*, 1996b). Die Zirkulation der Viruspartikel in den Blattläusen erfolgt in ähnlicher Weise wie sie auch für Luteoviren beschrieben wird, allerdings sind die Aquisitions- und Retentionszeiten extrem kürzer (de Zoeten & Skaf, 2001). Im Gegensatz zu den phloemlimitierten Luteoviren kann PEMV-1/-2 in fast allen Geweben von infizierten Pflanzen nachgewiesen werden (de Zoeten & Skaf, 2001). In infiziertem Pflanzengewebe bilden sich an der inneren Membran des Zellkerns Vesikel, die in das Zytoplasma entlassen werden. Diese Vesikel sind vermutlich der Ort der PEMV-1/-2 Replikation und aufgrund ihrer systemischen Mobilität im Gewebe auch an der Virusausbreitung beteiligt (Powell & de Zoeten, 1977; de Zoeten & Gaard, 1983).

Nach der anfänglichen Vermutung, dass der PEMV-1/-2 Komplex ein Virus mit einem bipartiten RNA-Genom ist (Harrison *et al.*, 1971), mehrten sich in den nachfolgenden Jahren Zweifel an der multikomponenten Natur des Virus. Adam *et al.* (1979) wiesen diese Unstimmigkeiten auf fehlende Möglichkeiten zur Separation der an dem PEMV-1/-2 Komplex beteiligten Komponenten zurück.

Im Jahr 1991 wurde von Demler und de Zoeten die RNA eines PEMV-1 Isolates sequenziert. Das PEMV-1 ist bisher das einzige Virus innerhalb des Genus *Enamovirus* (Familie *Luteoviridae*). Auf der einzelsträngigen, sinnpositiven RNA (RNA-1) mit einer Länge von 5706 nt sind fünf ORFs arrangiert, wobei die ORF0-2 im 5'-Genombereich durch eine kurze nicht-kodierende Region von den ORF3 und ORF5 im 3'-Genombereich getrennt sind (Demler & de Zoeten, 1991). Im Gegensatz zu den beiden anderen Genera Polerovirus und Luteovirus besitzen Enamoviren keinen ORF4 (Martin *et al.*, 1990; de Zoeten & Skaf, 2001).

Die Genomorganisation (Abbildung 1.5) und Sequenzhomologie zeigen aber eine nahe Verwandtschaft des PEMV-1 zu Viren des Genus Polerovirus (Veidt *et al.*, 1988; Demler & de Zoeten, 1991; Vincent *et al.*, 1991). Die Translation der ORF0-2 erfolgt von genomischer RNA, wobei der ORF2 durch einen ribosomalen Wechsel des Leserasters von ORF1 als P1/2 Fusionsprotein exprimiert wird (Nixon *et al.*, 2002).

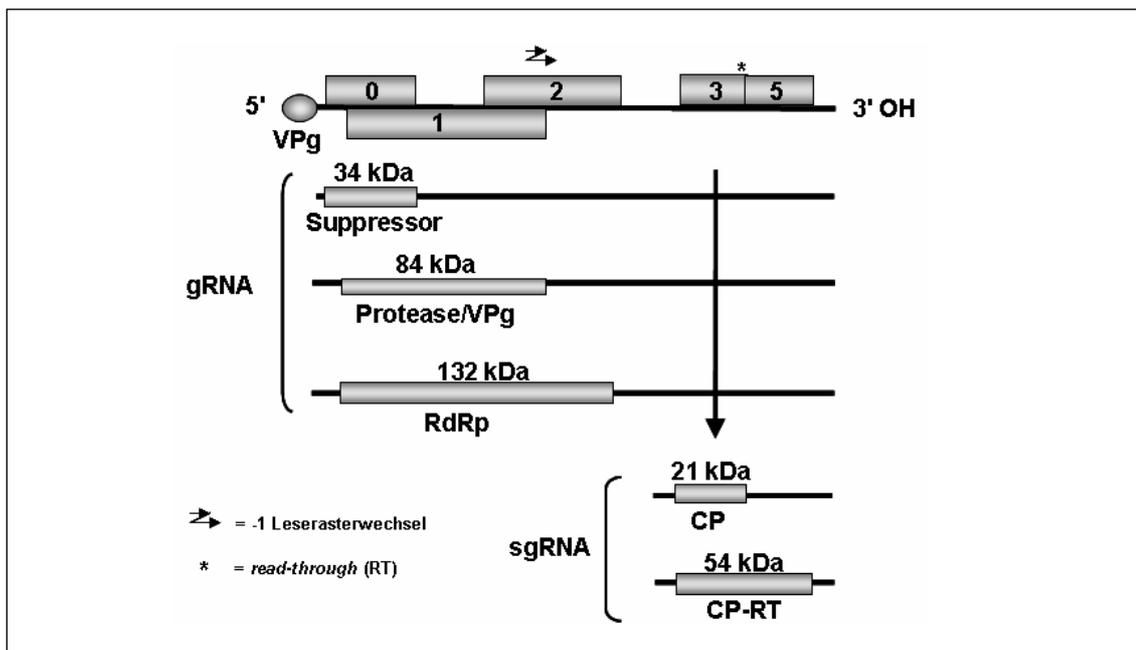


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Genomorganisation des *Enamovirus* PEMV-1 mit Angabe der ORFs und putativen Translationsprodukten, die von genomischer (gRNA) und subgenomischer RNA (sgRNA) translatiert werden können.

Die ORF3 und ORF5 werden von subgenomischer RNA translatiert, wobei der ORF5 nach Überlesen des ORF3 Stopkodons als P3/5 Fusionsprotein translatiert wird (de Zoeten & Skaf, 2001). Aufgrund von Analogien mit anderen Pflanzenviren, insbesondere aus der Familie der Luteoviren, können Rückschlüsse auf die Funktionen einiger durch die PEMV-1 ORFs kodierten Proteine geschlossen werden. Das P0

besitzt keinerlei Sequenzhomologie mit anderen viralen Proteinen; von Pfeffer *et al.* (2002) konnte für polerovirale ORF0-Produkte eine Funktion als Suppressor des RNA-*silencing* gezeigt werden. Durch den ORF2 wird vermutlich die virale RdRp mit der hydrophoben Region eines Transmembranproteins kodiert (Demler & de Zoeten, 1991). Innerhalb des P1 ist ein Proteasemotiv vorhanden, und diese Protease ist vermutlich auch an der Prozessierung eines stromabwärts gelegenen, durch den ORF1 kodierten, VPg beteiligt (Wobus *et al.*, 1998). Das VPg des PEMV-1 ist kovalent an die genomische PEMV-1 und PEMV-2 RNA gebunden und ist an einer effizienten Virusreplikation beteiligt (Reisman & de Zoeten, 1982; Skaf *et al.*, 2000). Der ORF3 kodiert für ein Hüllprotein (CP) und zusammen mit dem ORF5 für das P3/5 Fusionsprotein (CP-RT), das durch Überlesen des ORF3-Stopkodons als C-terminale Verlängerung des P3 translatiert wird. Das CP-RTD liegt in geringerem Umfang im Viruspartikel vor und wird für eine Übertragung durch Blattläuse benötigt (Demler *et al.*, 1997). Das PEMV-1 Hüllprotein wird, im Gegensatz zu allen anderen Luteoviren, nicht für die Ausbreitung des PEMV-1/2 Komplexes in der Pflanze benötigt (Skaf *et al.*, 1997). In gereinigten PEMV-1/2 Viruspräparationen werden zwei verschiedene isometrische Partikelkomponenten (B- bzw. T-Partikel) mit einem Durchmesser von 22-28 nm nachgewiesen, wobei der Anteil der B- und T-Partikel zwischen verschiedenen Isolaten stark variiert (Hull & Lane, 1973). In T-Partikeln kann PEMV-2 RNA (Gonsalves & Sheperd, 1972; Hull & Lane, 1973; Adam *et al.*, 1979) und in B-Partikeln sowohl PEMV-1 als auch PEMV-2 RNA nachgewiesen werden (Adam *et al.*, 1979). Die Heterogenität der B- und T-Partikel entsteht vermutlich durch einen erhöhten Anteil des P3/5 Fusionsproteins im B-Partikel (de Zoeten & Skaf, 2001).

Das Genom des *Umbravirus* PEMV-2 ist eine sinnpositive RNA (RNA-2) mit einer Länge von 4253 nt auf der die ORF1-4 lokalisiert sind (Demler *et al.*, 1993). Die ORF1 und ORF2 sind dabei durch eine kurze, nicht-kodierende Region von den 3'-terminalen ORF3 und ORF4, die von subgenomischer RNA translatiert werden, getrennt (Abbildung 1.6). Die Sequenz des putativen ORF1 Proteinprodukts P1 zeigt keine Homologien zu anderen viralen Proteinen, und es ist nicht bekannt, ob P1 als Einzelprotein translatiert wird (Taliatsky & Robinson, 2003).

Der ORF2 von Umbraviren kodiert für ein Protein mit Sequenzmotiven einer viralen RdRp (Demler *et al.*, 1993; Gibbs *et al.*, 1996) und wird vermutlich durch einen -1 Leserasterwechsel von ORF1 als P1/P2 Fusionsprotein translatiert. Die ORF3 und ORF4 überlagern sich fast vollständig in verschiedenen Leserastern. Das ORF4 Proteinprodukt zeigt Charakteristika für virale Movementproteine (de Zoeten & Skaf, 2001; Taliatsky & Robinson, 2003), wobei das P4 von Umbraviren auch die Zell-zu-Zell-Ausbreitung von anderen Pflanzenviren ermöglicht (Ryabov *et al.*, 1998 & 1999a).

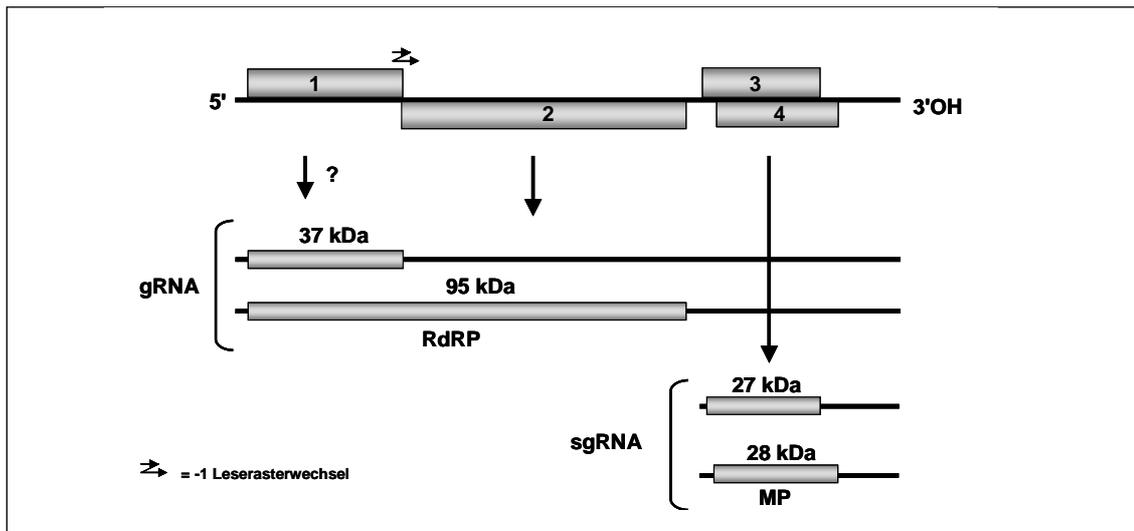


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Genomorganisation von Umbraviren mit Angabe der ORFs und putativen Translationsprodukte von genomischer und subgenomischer RNA.

Das durch den ORF3 kodierte Proteinprodukt P3 zeigt innerhalb des Genus Umbravirus eine 50%ige Sequenzhomologie, jedoch lassen sich keine Ähnlichkeiten mit anderen viralen oder nicht viralen Proteinen feststellen (Taliansky & Robinson, 2003). Das umbravirale P3 ist ein multifunktionales RNA-bindendes Protein einer neuen Proteinklasse und ist sowohl am vaskulären Langstreckentransport als auch am Schutz der viralen RNA, die nicht von einem Hüllprotein umgeben ist, beteiligt (Ryabov *et al.*, 1999b; Ryabov *et al.*, 2001b; Taliansky *et al.*, 2003a).

Da keiner der vier ORFs von Umbraviren für ein konventionelles Hüllprotein kodiert wird angenommen, dass die Transport- und Schutzfunktion, die das Hüllprotein bei anderen Pflanzenviren besitzt, durch das Genprodukt des ORF3 gestellt wird (Taliansky & Robinson, 2003). Das P3, welches auch im Zellkern nachgewiesen werden kann, ist an der Bildung von Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP) mit einem Durchmesser von 13-14 nm im Zytoplasma beteiligt. Diese RNP sind vermutlich auch die Transportform in der sich die virale RNA über das Phloem ausbreitet. Die RNPs schützen die virale RNA dabei vor einem Abbau durch Ribonukleasen und möglicherweise auch vor Degradation und Erkennung durch pflanzeigene Abwehrmechanismen wie RNA-*silencing* Prozesse (Taliansky *et al.*, 2003a). Bisher wurde kein umbraviraler Suppressor des RNA-*silencing* nachgewiesen (Taliansky & Robinson, 2003).

In einigen PEMV-1/-2 Isolaten ist eine dritte einzelsträngige RNA von 717 nt vorhanden, die in ihren zwölf 5'- bzw. sieben 3'-terminalen Nukleotiden mit den Termini der PEMV-2 RNA übereinstimmt. Diese Satelliten-RNA-3 ist ohne PEMV-2 nicht

infektiös und wird nicht für eine Infektion mit PEMV-1/-2 benötigt (Demler *et al.*, 1994b). Vermutlich hat die RNA-3 eine Funktion bei der Stabilität der B-Partikel, die RNA-1 und RNA-3 oder RNA-2 und RNA-3 enthalten können. Sie ist bei anderen Umbravirus/Luteovirus Symbiosen auch an der Ausbildung der Symptome beteiligt (Demler *et al.*, 1996a).

Die Symbiose der Viren PEMV-1 und PEMV-2 beinhaltet die Abhängigkeit des PEMV-1 von den durch PEMV-2 kodierten Proteinen für die Zell-zu-Zell Ausbreitung und auch für den Langstreckentransport im Phloem (Demler *et al.*, 1993; 1994a). PEMV-2 kann sowohl Mesophyll- als auch Phloemgewebe infizieren und vermittelt PEMV-1 und anderen Luteoviren in einer Luteovirus/PEMV-2 Mischinfektion die Fähigkeit, sich in gleichen Geweben auszubreiten und eine mechanische Übertragbarkeit (Mayo *et al.*, 2000; Ryabov *et al.*, 2001a). Das PEMV-2 ist für seine mechanische Übertragbarkeit oder die systemische Ausbreitung in der Pflanze nicht auf Proteinprodukte des PEMV-1 angewiesen (Demler *et al.*, 1993; 1994a & b). Dagegen wird die vektorielle Übertragbarkeit des PEMV-1/-2 Komplexes durch Blattläuse nur durch die PEMV-1 kodierten Hüllproteine P3 und P3/5 ermöglicht (Demler *et al.*, 1997). Eine wiederholte mechanische Übertragung des PEMV-1/-2 kann zu einem Verlust der Blattlausübertragbarkeit führen. Hierbei werden innerhalb von Viruspopulationen verstärkt P5 Aminosäuresubstitutionen und auch der Verlust von Teilbereichen des PEMV-1 ORF5 beobachtet (de Zoeten & Skaf, 2001).

Die Kontrolle des PEMV-1/-2 Komplexes im Anbau von Erbsen, Linsen und Kichererbsen erfolgt durch den Einsatz von toleranten Sorten, wobei die Symptome an den Pflanzen abgeschwächt werden, das Virusreservoir aber erhalten bleibt. Aufgrund der kurzen Retentionszeit von sieben Sekunden ist die Bekämpfung der Blattläuse als Virusvektoren nicht effektiv. Da bisher keine resistenten Sorten bekannt sind, kann die Entwicklung transgener Virusresistenzen erfolgversprechend sein (de Zoeten & Skaf, 2001).

1.5 *Potato virus Y (PVY)*

Das *Potato virus Y* (PVY) wurde erstmals im Jahr 1931 beschrieben und ist die Typspezies innerhalb des Genus *Potyvirus* (Familie *Potyviridae*). Die Familie *Potyviridae* ist die grösste bekannte Pflanzenvirusgruppe (Ward & Shukla, 1991). PVY infiziert hauptsächlich Pflanzenarten aus der Familie der *Solanaceae*, aber auch einige Pflanzenarten aus den Familien *Chenopodiaceae* und *Leguminaceae* (de Bokx & Huttinga, 1981). Das PVY führt weltweit zu Ernteverlusten an ökonomisch wichtigen *Solanaceae*-Arten und kann sowohl mechanisch als auch nicht-persistent durch Blattläuse (Hauptvektor *Myzus persicae*) übertragen werden (van Hoof, 1980). Aufgrund des Wirtspflanzenspektrums, der Symptomausprägung an Kartoffeln und

Tabak und serologischen sowie molekularen Unterschieden werden innerhalb der Spezies PVY die PVY-Stämme PVY^O, PVY^N, PVY^C unterschieden (de Bokx & Huttinga, 1981). Ein weiteres Isolat, das PVY^{NTN}, ist der Auslöser der Kartoffelringfäule (Beczner *et al.*, 1984; Le Romancer *et al.*, 1994) und wird aufgrund seiner Symptomausprägung an Tabakpflanzen und seines serologischen Verhaltens als Pathotyp innerhalb der PVY^N-Isolate beschrieben (van den Heuvel *et al.*, 1994; Glais *et al.*, 1996; Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998). Das PVY^{NTN} kann in vielen europäischen Anbaugebieten nachgewiesen werden (Weidemann & Maiß, 1996). Im Jahre 1984 wurde von dem ungarischen PVY^{NW}-Isolat berichtet, das wie PVY^N Adernekrosen an Tabakpflanzen hervorruft, aber nicht mit PVY^N-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden kann (Chrzanowska, 1994). Das PVY^{NW}-Isolat zeigt, ebenso wie die westeuropäischen Isolate PVY^Z und PVY^{ZE} (Kerlan *et al.*, 1999), eine phylogenetisch enge Verwandtschaft zu den Isolaten PVY^O und PVY^N (Glais *et al.*, 1998). Die europäischen Isolate PVY^{NTN}, PVY^{NW}, PVY^Z und PVY^{ZE} werden als Pathotypen der Stämme PVY^N und PVY^O beschrieben und sind vermutlich aus Rekombinationsereignissen hervorgegangen (Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998; Kerlan *et al.*, 1999; Glais *et al.* 2002), während die amerikanischen PVY^{NTN}-Isolate durch Genommutation des PVY^N entstanden sind (Nie & Singh, 2003).

Das PVY besitzt in filamentösen Viruspartikeln ein einzelsträngiges positivsinniges RNA-Genom (Abbildung 1.7) mit einer Länge von ~ 9700 nt, auf dem ein großer ORF, eingeschlossen von 5'- und 3'-terminalen nicht-kodierenden Sequenzbereichen, für ein 350 kDa-Polyprotein kodiert (Robaglia *et al.*, 1989; Riechmann *et al.*, 1992; Thole *et al.*, 1993). An die potyvirale RNA ist 5'-terminal ein VPg kovalent gebunden, und das 3'-Ende wird mit einem poly(A)-Schwanz terminiert (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Das potyvirale Polyprotein wird proteolytisch durch virale Proteasen in die funktionellen Proteine P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb und das Hüllprotein (CP) prozessiert (Riechmann *et al.*, 1992; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Die P1-Proteinase und die Helferkomponente-Proteinase (HC-Pro) prozessieren autoproteolytisch nur ihren eigenen C-Terminus (Carrington *et al.*, 1989; Verchot *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1998), wogegen die Proteasedomain (NIaPro) am C-Terminus des *nuclear inclusion* Proteins (NIa) für die Prozessierung der übrigen proteolytischen Schnittstellen verantwortlich ist (Carrington *et al.*, 1988; Garcia *et al.*, 1990). Die Prozessierung des Polyproteins erfolgt an den proteolytischen Schnittstellen mit unterschiedlicher Schnelligkeit, wobei eine langsame Prozessierung der Schnittstellen zwischen P3 und 6K1, CI und 6K2 und der internen NIa Schnittstelle beobachtet werden kann (Merits *et al.*, 2002).

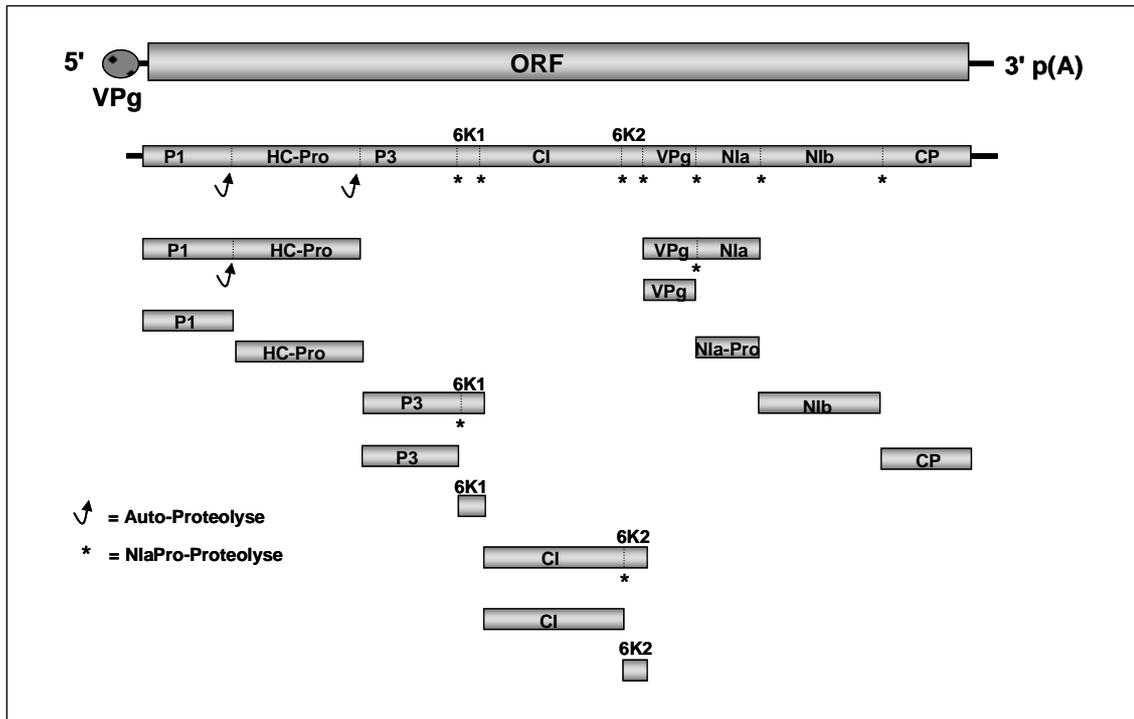


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Genomorganisation von PVY mit Angabe der Position von proteolytisch prozessierten Schnittsequenzen (Stern und Pfeil) auf dem Polyprotein. Die Einzelproteine sind durch gestrichelte Linien voneinander abgegrenzt. Die aufgrund von suboptimalen Schnittsequenzen im Verlauf der Prozessierung entstehenden Fusionsproteine sind über den Einzelproteinen angegeben.

Das P1 von Potyviren besitzt neben seiner autoproteolytischen Proteasefunktion möglicherweise auch eine Funktion bei der Symptomausbildung (Wisler *et al.*, 1995; Tordo *et al.*, 1995) und aufgrund seiner RNA-Bindungsaktivität (Merits *et al.*, 1998) und seinem Vorkommen in cytoplasmatischen Einschlusskörpern auch eine Funktion bei der Zell-zu-Zell Ausbreitung (Arbatova *et al.*, 1998). Zusätzlich zeigt das P1 als P1/HC-Pro Fusionsprotein eine Funktion als Suppressor des RNA-silencing (Kasschau & Carrington, 1998; Anandalakshimi *et al.*, 1998; Kasschau *et al.*, 2003). Die Helferkomponente HC-Pro wird als multifunktionales Protein beschrieben und ist neben seiner durch die Proteasefunktion prozessierten autoproteolytischen Funktion (Maia *et al.*, 1996) an zahlreichen Prozessen wie der Blattlausübertragung (Wang *et al.*, 1998), der Replikation und systemischen Ausbreitung in der Pflanze (Kasschau *et al.*, 1997; Kasschau & Carrington, 2001), der Bindung von RNA (Merits *et al.*, 1998) sowie der synergistischen Erhöhung der Virusakkumulation und der Verstärkung der Symptomausbildung in Mischinfektionen mit anderen Pflanzenviren beteiligt (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997). Es liegen zahlreiche Untersuchungen zu der Funktion des HC-Pro als Suppressor des RNA-silencing vor (Kasschau &

Carrington, 1998; Anandalakshimi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Llave *et al.*, 2000; Mette *et al.*, 2001; Mallory *et al.*, 2001; Kasschau & Carrington, 2001; Mlotshwa *et al.*, 2002; Savenkov & Valkonen, 2002; Kasschau *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2003).

Die Expression von HC-Pro führt zu einer starken Reduktion von microRNAs (miRNA) und *small interfering RNAs* (siRNA), die an der Regulation von Entwicklungsprozessen der Pflanze (Pasquinelli & Ruvkun, 2002; Carrington & Ambros, 2003) bzw. am RNA-*silencing* Prozess beteiligt sind (Hamilton & Baulcombe, 1999; Hamilton *et al.*, 2002). Durch Pruss *et al.* (2004) ist kürzlich gezeigt worden, dass HC-Pro transgene Pflanzen anfälliger für virale Pathogene sind aber auch, vermutlich durch einen HC-Pro induzierten veränderten Salicylsäurestoffwechsel im pflanzlichen Abwehrmechanismus, eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen anderen Pflanzenpathogenen zeigen. Über die Funktionen des P3 von Potyviren ist sehr wenig bekannt (Uruqui-Inchima *et al.*, 2001). Obwohl es keine RNA-Bindungsaktivität zeigt (Merits *et al.*, 1998) wird vermutet, dass das P3 eine Funktion bei der Virusreplikation besitzt (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1994; Langenberg & Zhang, 1997). Das P3 wird, auch in Verbindung mit dem auf dem Polyprotein C-terminal folgenden Protein 6K1, als Pathogenitätsfaktor beschrieben, durch den die Symptomausprägung und das Wirtspflanzenspektrum beeinflusst wird (Riechmann *et al.*, 1992; Sáenz *et al.*, 2000; Jenner *et al.*, 2003; Suehiro *et al.*, 2004). Das 6K1-Protein wird häufig als P3/6K1 Polyprotein nachgewiesen (Uruqui-Inchima *et al.*, 2001) und besitzt wie das P3 keine RNA-Bindungsaktivität (Merits *et al.*, 1998). Da eine Deletion der 6K1-kodierenden Sequenz die proteolytische Prozessierung von P3 und CI verhindert, besitzt dieser Sequenzabschnitt vermutlich eine funktionell wichtige Trennungsfunktion (*spacer*) für das P3 und das CI (Merits *et al.*, 2002). Das CI-Protein zeigt ATPase- und Helikaseaktivität (Laín *et al.*, 1990; 1991; Fernandez *et al.*, 1995), ist an der Zell-zu-Zell Ausbreitung beteiligt und kann zu einem frühen Infektionszeitpunkt an Plasmodesmen lokalisiert werden (Carrington *et al.*, 1996). Das aufgrund einer langsamen proteolytischen Prozessierung entstehende CI/6K2-Polyprotein besitzt möglicherweise auch eine Funktion im Infektionszyklus und bindet an zelluläre Membranen (Merits *et al.*, 2002). Das 6K2-Protein ist am intra- und interzellulären Transport von Potyviren beteiligt (Rajamäki & Valkonen, 1999; Spetz & Valkonen, 2004) und verankert den Replikationskomplex an Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (Schaad *et al.*, 1997). Von Spetz & Valkonen (2004) wurde ein wirtsspezifischer Einfluss des 6K2 auf die Symptomausprägung in infizierten Pflanzen nachgewiesen. Das NIa-Protein besitzt eine N-terminale VPg- und eine C-terminale Proteinasedomäne (NIa-Pro). Das NIa prozessiert mit Ausnahme von P1 und HC-Pro alle anderen proteolytischen Schnittstellen des Polyproteins (Carrington *et al.*, 1988; Garcia *et al.*, 1990) und besitzt

RNA-Bindungsaktivität (Merits *et al.*, 1998). Die Aktivität der NIaPro ist abhängig von der proteolytischen Erkennungssequenz und den diesen Sequenzabschnitt flankierenden Bereichen (Riechmann *et al.*, 1992; Schaad *et al.*, 1996). Die optimalen Erkennungssequenzen zwischen 6K1/CI, 6K2/VPg, NIaPro/NIb und NIb/CP werden besonders schnell prozessiert (Merits *et al.*, 2002). Die VPg-Domäne des NIa ist essentiell an der Virusreplikation beteiligt. Das VPg bindet kovalent unter Beteiligung eines Tyrosin-Restes an den Phosphatrest des terminalen Adenosins der viralen RNA (Riechmann *et al.*, 1992; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Aufgrund von VPg-RdRp (NIb) Interaktionen und der Nukleotidbindungsaktivität des VPg wird vermutet, dass das VPg als Primer bei der Virusreplikation wirkt (Riechmann *et al.*, 1992; Puustinen & Mäkinen, 2004). Das potyvirale VPg interagiert mit den pflanzlichen Translations-Initiationsfaktoren eIF4E oder eIF(iso)4E (Leonard *et al.*, 2000; Schaad *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2004), wodurch eine Replikation erst möglich oder zumindest positiv beeinflusst wird. Die VPg/eIF4E Interaktion ist vermutlich spezifisch für Potyviren (Duprat *et al.*, 2002). Das VPg ist auch an der Wirtsspezifität und in Interaktion mit dem 6K2 am Langstreckentransport von Potyviren beteiligt (Rajamäki & Valkonen, 1999; Moury *et al.*, 2004).

Das NIb Protein ist die putative potyvirale RdRp mit RNA Bindungsaktivität (Merits *et al.*, 1998). Das NIb bildet Einschlusskörper im Zellkern von infizierten Pflanzen und liegt vermutlich im Cytoplasma und an den Replikationskomplexen vor (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Das NIb interagiert mit der potyviralen NIaPro- oder VPg-Domäne (Guo *et al.*, 2001) und, wie das VPg (Leonard *et al.*, 2004), mit pflanzlichen poly(A)-Bindungsproteinen (PABP). Diese Interaktionen haben vermutlich eine Funktion bei der viralen Replikation. Das Hüllprotein (CP) besitzt variable N- und C-terminale Domänen und die stärker konservierte Zentraldomäne (*core region*). In der N-terminalen Domäne befindet sich bei blattlausübertragbaren Potyviren das DAG-Aminosäuremotiv, das in einem bestimmten Kontext und in Interaktion mit dem HC-Pro für eine effiziente Blattlausübertragung benötigt wird (López-Moya *et al.*, 1999). Hierbei tritt das im HC-Pro konservierte Aminosequenzmotiv PTK in Interaktion mit dem DAG-Motiv des CP. Über ein weiteres konserviertes KITC-Motiv kann sich das HC-Pro als Brückenprotein an Rezeptoren im Nahrungskanal von Blattläusen anlagern (Blanc *et al.*, 1998; Raccah *et al.*, 2001). Der N- und C-terminale Bereich des Hüllproteins ist entscheidend für die Zell-zu-Zell Ausbreitung von Potyviren, während die Kerndomäne an der Ausbildung der Viruspartikel beteiligt ist (Dolja *et al.*, 1995; Varrelmann & Maiss, 2000). Aufgrund der festgestellten CP/NIb (RdRp) Interaktion wird vermutet, dass das CP auch regulierend bei der RNA-Amplifikation beteiligt ist (Mahajan *et al.*, 1996).

Um Ertragsausfälle durch PVY und andere Viren im Kartoffelanbau zu begrenzen wird empfohlen, nur zertifiziertes Pflanzgut zu verwenden. Die Bundessortenliste gibt Auskunft über PVY-Anfälligkeiten von verschiedenen Kartoffelsorten. Neben dem Einsatz von resistenten Sorten wird durch Bekämpfung von Blattläusen als PVY-Vektor mit Insektiziden versucht eine Virusausbreitung im Bestand zu minimieren. Die Identifizierung von PVY-Resistenzgenen in verschiedenen Pflanzenarten (Arnedo-Andrés *et al.*, 2002; Parrella *et al.*, 2002; Ruffel *et al.*, 2002) erhöht die Möglichkeit für eine züchterische Selektion hochresistenter Sorten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Feste Chemikalien

Substanz	Abkürzung	Hersteller
Acetosyringon		Sigma
Adenosintriphosphat	ATP	Serva
Agar		GibcoBRL
Agar (Pflanzengewebekultur)		Duchefa
Agarose		Biozym
Ammoniumpersulfat	APS	Serva
Ammoniumsulfat	(NH ₄)SO ₄	Serva
Ampicillin	Amp	Serva
N-6-Benzyladenin (synthetisches Cytokinin)	BAP	Duchefa
Bovine Serum Albumin (FraktionV)	BSA	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid	X-Gal	BTS
Bromphenolblau		Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂	Merck
Celite		Serva
Chloramphenicol	Camp	Serva
Claforan		Duchefa
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Na ₂ HPO ₄	Merck
Dithiotreithol	DTT	ICN
Ethidiumbromid	EtBr	Roth
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz	EDTA	Merck
Fast Red TR Salz		Sigma
Glucose		Sigma
HEPES		Roth
Hexamincobalttrichlorid	HaCoCl ₃	Sigma
Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase	IPTG	BTS
Kaliumacetat	KAc	Merck
Kaliumhydroxyd	KOH	Merck

Tabelle 2.1 (Fortsetzung)

Substanz	Abkürzung	Hersteller
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck
Kaliumhydroxyd	KOH	Merck
Kanamycin	Kn	Serva
Lithiumchlorid	LiCl	Roth
LM-Agarose	LM	Biozym
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl_2	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO_4	Merck
Manganchlorid-Dihydrat	MnCl_2	Merck
Morpholinoethansulfonsäure	MES	Roth
Naphtol AS-MX		Sigma
1-Naphtylelessigsäure (synthetisches Auxin)	NAA	Duchefa
Natriumacetat-Trihydrat	NaAc	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumcitrat-Dihydrat	NaCitrat	Roth
Natriumdodecylsulfat Ultra Pure	SDS	Roth
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	Roth
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO_3	Merck
Natriumhydroxyd	NaOH	Merck
p-Nitrophenylphosphat		Serva
Nonidet P40		Fluka
Polyvinylpyrrolidon K25		LOEWE
Rifampicin	Rif	Serva
Rubidiumchlorid	RbCl	Sigma
Saccharose		Merck, Roth
Select Peptone 140		GibcoBRL
Streptomycin	Str	Serva
Tetramethylethylenediamin	TEMED	Serva
Tricin		ICN Biomed
Tris Pufferan [®] Ultra Pure	Tris-base	Roth
Tris-hydrochlorid Pufferan [®]	Tris-HCl	Roth
Uranylacetat		Merck
Yeast Extract		GibcoBRL

Tabelle 2.2: Flüssige Chemikalien

Substanz	Abkürzung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	2-MeEtOH	Merck
Acrylamidlösung (37, 5:1, 30%) Rothiphorese [®]		Roth
Chloroform		Roth
Diethanolamin		Sigma
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Serva
Dimethylformamid	DMF	Serva
Dimethylsulfoxyd	DMSO	Serva
Eisessig (100%)		Roth
Ethanol (99,6%)	EtOH _{abs.}	Roth
Glycerin (99,5%)		Roth
Isopropanol (99,7%)		Roth
Isoamylalkohol		Roth
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	Tween-20	Fluka
Roti-Phenol (redestilliert und äquilibriert)	Phenol	Roth
Triton [®] X-100		Serva

2.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 2.3: Übersicht über verwendete *Escherichia coli*-Stämme.

Bakterium	Referenz	Antibiotikaresistenz
<i>E. coli</i> K12 NM522	Pharmacia	-
<i>E. coli</i> JM110	NEB	-

Tabelle 2.4: Übersicht über verwendete *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme.

Bakterium	Helferplasmid	Referenz	Antibiotikaresistenz
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	pAL4404	Hoekema <i>et al.</i> (1983)	Streptomycin
<i>A. tumefaciens</i> C58C1 ATHV	pEHA101	Hood <i>et al.</i> (1986), Sonntag <i>et al.</i> (2000)	Kanamycin (pEH101) Rifampicin (genomisch)

2.1.3 Virus-Isolate

Tabelle 2.5: Übersicht über verwendete Virus-Isolate mit Herkunftsangabe und verwendeten Pflanzenarten zur Viruserhaltung.

Virus-Isolat	Herkunft	Erhaltungswirt
BMYV	BAZF Aschersleben (Graichen, K.)	<i>B. vulgaris</i> , <i>N. benthamiana</i>
BChV	BAZF Aschersleben (Graichen, K.)	<i>Beta vulgaris</i>
BYV	BAZF Aschersleben (Graichen, K.)	<i>B. vulgaris</i> , <i>N. benthamiana</i>
PVY ^{NTN}	Pietrek, G.	<i>N. tabacum</i> cv. 'Xanthi' nc
PEMV-1/-2	DSMZ, Braunschweig, PV-0427	<i>N. benthamiana</i> 27/1

2.1.4 Pflanzenmaterial

Für die Viruserhaltung und die Testung des Wirtspflanzenspektrums wurden nachfolgend angeführte Pflanzenarten verwendet.

Tabelle 2.6: Übersicht über verwendete Pflanzenarten mit Herkunftsangabe.

Pflanzenart	Bemerkungen
<i>Beta vulgaris</i>	KWS, Einbeck
<i>Brassica napus</i>	KWS, Einbeck
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Botanischer Garten Jena, Akznr.: 1871
<i>Chenopodium capitatum</i>	Botanischer Garten Ulm, Akznr.: 2001-F-145, Herkunft H.B. Trondheim
<i>Chenopodium foliosum</i>	Botanischer Garten Jena, Akznr.:8765-2365
<i>Chenopodium quinoa</i>	IPP
<i>Lamium purpureum</i>	Rühlemann Saatgut, Horstedt
<i>Nicotiana benthamiana</i>	IPP, Linie 27/1 aus Gewebekultur
<i>Nicotiana clevelandii</i>	IPP
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. 'Xanthi'	IPP
<i>Nicotiana rustica</i>	IPP
<i>Nicotiana occidentalis</i>	IPP
<i>Nicotiana edwardsonii</i>	IPP
<i>Nicotiana glutinosa</i>	IPP

2.1.5 Plasmide und Nukleinsäuren

Tabelle 2.7: Übersicht über verwendete Plasmide und Nukleinsäuren mit Referenzangaben.

Bezeichnung	Hersteller/Referenz	Antibiotikaresistenz
pBluescript II SKM	Stratagene	Ampicillin
pBluescript II SKP	Stratagene	Ampicillin
pGEM7Zf(+)	Promega	Ampicillin
pGEM T-easy	Promega	Ampicillin
pBC SKM	Stratagene	Chloramphenicol
pLitmus28	NEB	Ampicillin
pT7T3_18U	Pharmacia	Ampicillin
pUC57	Fermentas	Ampicillin
pSport I	Invitrogen	Ampicillin
pBIN_SN (pBIN19 Derivat)	Prof. E. Maiß (siehe Anhang)	Kanamycin
V162 pe35S_Ribo	Prof. E. Maiß (siehe Anhang)	Ampicillin
p442	Prof. E. Maiß (siehe Anhang)	Ampicillin
p996 (GFP)	Prof. E. Maiß (siehe Anhang)	Ampicillin
p1231	Prof. E. Maiß (siehe Anhang)	Ampicillin
p104	Prof. E. Maiß (siehe Anhang)	Ampicillin
V174	Prof. E. Maiß (siehe Anhang)	Ampicillin
pKali	Prof. E. Maiß (siehe Anhang)	Kanamycin
DIG-DNA Standard II	Roche (siehe Anhang)	-
λ-Phagen DNA	Fermentas	-

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software VectorNTI ausgewählt und enthalten teilweise Sequenzen die nicht BMVYV bzw. BChV spezifisch sind (kursiv) und der Integration von Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) und/oder der Angleichung an optimale GC-Gehalte und Anlagerungseigenschaften dienen. Die Angaben der Oligonukleotidpositionen beziehen sich auf die virale Sequenz (BMVYV-IPP, BChV-IPP und BYV GenBank # AF056575). Die Oligonukleotide für Sequenzierungen wurde nach den unter 2.2.14 beschriebenen Kriterien mit Hilfe des WWW-gestützten Programmes Webprimer (Dolinski *et al.*, 2003) erstellt.

2.1.6.1 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2.8: Übersicht über verwendete Oligonukleotide für die Herstellung und Nachweis des BMYV_{fl} mit Hersteller- und Sequenzangabe.

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
BMVYV1s (1-24 nt)	GibcoBRL	ATGGGCGCGCCACAAAAGAAACCAGCGAGGATCTA Asc I
BM1110as (1077-1094 nt)	GibcoBRL	ATATGGATCCCGATGCGGAATCATGTGAACTGC BamH I
BMVYSN (854-876 nt)	GibcoBRL	AACATGCGTAACCTTATTCGACG
BMVYASN (2466-2495 nt)	GibcoBRL	CGGGATCCAATTGTTTCAGGGCTCATATGCTCAAATT BamH I
BMVY_1 (2256-2277 nt)	GibcoBRL	ACGGGTACCATGGCCACGAGAGGAAACAA Kpn I
BMVY_2 (4772-4791 nt)	GibcoBRL	CCAATGCATGACAGCGGGACCAACAACAA Nsi I
BMVY3s (4049-4068 nt)	GibcoBRL	CCGGCAGGAGGGCATTGCA
BMVY3as (5708-5723 nt)	GibcoBRL	GGGGGCCACACCGAAGTGCCGTA Bsp120 I
BMVYVP0s (162-183 nt)	GibcoBRL	ACTGCATTCTTCTCTTCTCGC
BMVYVP0as (632-652 nt)	GibcoBRL	CATACCGCGAGCTTCACCAA

Tabelle 2.9: Oligonukleotide zur Herstellung des AscIΔBMYV_{fl}.

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
Mut1s	Invitrogen	CGGGATCCCGTGTACAAAAGAAACCAGCGAGGATC BamH I Rsa I TAGCAGTCTATGCAAGCGGCCGCAATCTAGAGC BstAP I Not I Xba I
Mut1as	Invitrogen	GCTCTAGATTGCGGCCGCTTGCATAGACTGCTAGAT Xba I Not I BstAP I CCTCGCTGGTTTCTTTTGTACACGGGATCCCG Rsa I BamH I

Mut1as ist komplementär zu Mut1s.

Tabelle 2.10: Übersicht über verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung des BMV_{fl} mit Hersteller- und Sequenzangabe.

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
35SSEQ (35S-Promotor)	GibcoBRL	CACTATCCTTCGCAAGAC
BM453 (453-470 nt)	GibcoBRL	CAGTATGGTGTGCTGAAA
BM1005 (1005-1023 nt)	GibcoBRL	TACACATCTGAGAAAAGGG
BM3b (1495-1512 nt)	GibcoBRL	CTTGTCCAGATGAAGAGA
BM2014 (2014-2031 nt)	GibcoBRL	TAAACAAAAAGGATGCTC
BM2544 (2544-2562 nt)	GibcoBRL	CACACAAACAATCCAAACT
BM2956 (2956-2973 nt)	GibcoBRL	AGATGGAACATTGCTCTC
BM7b (3542-3559 nt)	GibcoBRL	AATTGGCTTGTACTTCGT
BM4125 (4126-4143 nt)	GibcoBRL	CTCTACAAAGGCAATGGT
BM9b (4620-4639 nt)	GibcoBRL	GGAGATAACCAATAATAAGG
BM5100 (5088-5105 nt)	GibcoBRL	TCCTGTTGAAGAAGACAT

Tabelle 2.11: Oligonukleotide zur GFP-Markierung des BMV_{fl}

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
Aflgfps	Invitrogen	AAAAGGATCCTTAAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT <i>Bam</i> H I <i>Afl</i> II
Aflgfpas	Invitrogen	AGCGCGGTCTAGACTTAAGTTACTTGTACAGCTCGTC <i>Xba</i> I <i>Afl</i> II
BMVPO GFPs	Invitrogen	ATTAAGGATCCGCAGTCTATGCAATGGTGAGCAAGGGC <i>Bam</i> H I <i>Bst</i> AP I GAG
BMVPO GFPas	Invitrogen	AATTATCTAGAGCATAGACTGCTGGATTGGCCCAGGGTT <i>Xba</i> I <i>Bst</i> AP I GGACTC
BMVREPs (2936-2964 nt)	Invitrogen	AACAGCGTCCTCTGTTTATCAGATGGAAC
BMVREP2 (3380-3397 nt)	MWG	ACGGATCCAATGTACACGGTTAACTATCTTTTGTGGCTG <i>Bam</i> H I <i>Bsp</i> 1407 I <i>Ksp</i> A I CAC
BMVEco47s (3396-3419 nt)	Invitrogen	AACTGTACAAGTAACGAGGGATAACATAAACAG <i>Bsp</i> 1407 I
BMVEco47as (3791-3808 nt)	Invitrogen	ACGGATCCTTGAGAAAACAAATGTCT <i>Bam</i> H I

Tabelle 2.11 (Fortsetzung)

P2 1 (funktionelle P2A-Sequenz)	Invitrogen	AAGGATCCAACAATGGTAACTTTGACCTTCTTAAGCTTG <i>BamH I</i> <i>KspA I</i> CGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCAACCATGGAA TCTAGAAA <i>Xba I</i>
P2 2 (funktionelle P2A-Sequenz)	Invitrogen	TTTCTAGATTCCATGGTTGGCCCAGGGTTGGASCTCGAC <i>Xba I</i> GTCTCCC GCAAGCTTAAGAAGGTCAAAGTTAACCATTTGT <i>KspA I</i> TGGATCCTT <i>BamH I</i>

P2 2 ist komplementär zu P2 1.

Tabelle 2.12: Übersicht über verwendete Oligonukleotide für die Herstellung und den Nachweis des BChV_{fl} und der BChV-BMYV Chimäre mit Hersteller- und Sequenzangabe.

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
BChV1sneu (1-20 nt)	Invitrogen	ACTCTAGAGCGTACAAAAGAATAGCAGGAGGA <i>Xba I</i> <i>Rsa I</i>
BChV394as (375-394 nt)	Invitrogen	ACGGATCCGTTCTTTGTAGCTGTAATCT <i>BamH I</i>
BChV216s (216-237 nt)	Invitrogen	AGTCTAGACTTATTTGGAGCTCTTGGGACC <i>Xba I</i>
BChV1430as (1411-1430 nt)	Invitrogen	ACGGATCCAGGTCATCCATTTCTTTCTC <i>BamH I</i>
BChV1404s (1404-1432 nt)	Invitrogen	AGTCTAGAATTTCTCGAGAAAGAAATGGATGACCTGC <i>Xba I</i>
BChV3610as (3585-3612 nt)	Invitrogen	AGCCAAGCTTCATTAACGATTGATCTTACGTGTTGG <i>Hind III</i>
BChV2932s (2932-2960 nt)	MWG	AGAATTC AATGCATAAGCAATTCAGTCTTGTGCCTT <i>EcoR I</i>
BChV4289as (4272-4289 nt)	MWG	AGGAAGCTTAACGATATTTCTTTTGGG <i>Hind III</i>
BChV4208s (4209-4226 nt)	MWG	ACTCGAGCCAAATAGGTAGACGAGG <i>Xho I</i>
BChV5030as (5014-5031 nt)	MWG	AGAATTCAGGTCTTGTCTTTGACCG <i>EcoR I</i>
BChV3sneu (4915-4940 nt)	MWG	AAGGCGCGCCGAGGACAGAAAGACCAAAGAGAGTTG <i>Asc I</i>
BChV3asneu (5738-5768 nt)	MWG	AGGGCCACACCGAAGTGCCGTAGGATCCTACTGTATAA <i>Bsp120 I</i> C
BChVChi6148s (2877-2889 nt)	MWG	AGAATTCGCTTGACCAGAAACAACAACC <i>EcoR I</i>
BChVChi6824as (3534-3553 nt)	MWG	ACCGAAGCTTGCGGCCGCAGATGTACATTACCGTTACGG <i>Hind III</i> <i>Not I</i> <i>Tat I</i> GTATTGCT
BChVP0s (69-90 nt)	Gibco BRL	GTGACGAGCGAAAGACACTTGC
BChVP0as (629-649 nt)	Gibco BRL	CGCTTAAGGCCATCAATGAGG

Tabelle 2.13: Oligonukleotide zur Herstellung des AscI-BChV_{fl}.

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
BChVAscI (1-26 nt)	MWG	<u>ATGGCGCGCC</u> ACAAAAGAATAGCAGGAGGACAGCGA Asc I
BChVBstAPI (935-958 nt)	MWG	<u>TGTACTCTCGAG</u> TGGGAGCATGCGAGCAGGTTATC A Bsp1407 I Xho I

Tabelle 2.14: Oligonukleotide zum Nachweis einer BYV-Infektion.

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
BYVCPNTR1 (13642-13662 nt)	MWG	<u>GTTGGATCCT</u> GGGATAAGCCTAACCTATAA BamH I
BYVCPNTR2 (14224-14255 nt)	MWG	<u>GCTCTAGAT</u> CATCTTCCGGTGGCTAGACCACGACCCAG Xba I CT

Tabelle 2.15: Übersicht über verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung des BChV_{fl} mit Hersteller- und Sequenzangabe.

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
BSEQ01 (35S-Promotor)	MWG	TATCTCCACTGACGTAAGGG
BC1 (292-310 nt)	MWG	GATTTTCCCTTACCACCGG
BC2 (681-700 nt)	MWG	CAAAATATTACA ACTATGCC
BC3 (1049-1067 nt)	MWG	AGATCTTATTCGGCCCACC
BC4 (1429-1447 nt)	MWG	CTGCTCGAATACGACTGGT
BC5 (1814-1832 nt)	MWG	TGGGCCTTCTATTAACCG
BC6 (2199-2217 nt)	MWG	AAGGCGAGGGAATCCGTTA
BC7 (2575-2592 nt)	MWG	AAGGTCGCTACCGCCTTA
BC8 (2951-2969 nt)	MWG	CTTGTGCCTTTCTGATGGG
BC9 (3332-3350 nt)	MWG	AATTCGTCACGACGAGAGC
BC10 (3716-3734 nt)	MWG	ACAACACAACGCCGACCTA
BC11 (4090-4108 nt)	MWG	CAATGGAACGGAATGGCAC
BC12 (4470-4488 nt)	MWG	TAGTACCAGTCCCTCAAGG
BC13 (4852-4870 nt)	MWG	TCGGATGATGGAGATAGGG

Tabelle 2.15 (Fortsetzung)

BC14 (5229-5246 nt)	MWG	TGCCAAAACCAACCGG
BC15 (5613-5631 nt)	MWG	GCTCTGGGACATAGCCTAA

Tabelle 2.16: Verwendete Oligonukleotide für die Herstellung von DIG-markierten PCR Sonden.

M13 R49	MWG	GAGCGGATAACAATTCACACAGG
M13 U43	MWG	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT
NPTA	MWG	<u>TTTCTAGAATCATGAGCG</u> <i>Xba</i> I
NPTB	MWG	<u>TTTAAGCTTCAGAAGA</u> ACTCGTCAAGA <i>Hind</i> III

2.1.7 Enzyme

2.1.7.1 Restriktionsenzyme

Für die Durchführung eines Restriktionsverdau wurden Enzyme verschiedener Hersteller verwendet. Wenn Isoschizomere verwendet wurden, sind die Bezeichnung und Hersteller in Klammern angegeben. Isoschizomere mit gleichen Erkennungssequenzen, aber unterschiedlichen Spaltungsorten, sind separat aufgeführt. Die Spaltungsorte sind innerhalb der Sequenz durch Pfeile gekennzeichnet.

Tabelle 2.17: Übersicht über die für einen Restriktionsverdau verwendeten Restriktionsendonukleasen mit Angabe der Erkennungssequenz und Hersteller.

Bezeichnung	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>Acc</i> 65 I	5'...G↓GTACC...3' 3'...CCATG↑G...5'	Fermentas
<i>Asc</i> I	5'...GG↓CGCGCC...3' 3'...CCGCGC↑GG...5'	NEB
<i>Afl</i> II	5'...C↓TTAAG...3' 3'...GCCTT↑C...5'	NEB
<i>Bam</i> H I	5'...GG↓ATCC...3' 3'...CCTA↑GG...5'	NEB, Fermentas
<i>Bsp</i> 120 I	5'...G↓GGCCC...3' 3'...CCCGG↑G...5'	Fermentas
<i>Bsp</i> 1407 I	5'...T↓GTACA...3' 3'...ACATG↑T...5'	Fermentas
<i>Bst</i> AP I	5'...GCANNNN↓NTGC...3' 3'...CGTN↑NNNNACG...5'	SibEnzyme

Tabelle 2.17 (Fortsetzung)

<i>BspE</i> I	5'...T↓CCGGA...3' 3'...AGGCC↑T...5'	NEB
<i>Eco47</i> III	5'...AGC↓GCT...3' 3'...TCG↑CGA...5'	Fermentas
<i>Eco91</i> I	5'...G↓GTNACC...3' 5'...CCANTG↑G...3'	Fermentas
<i>EcoR</i> I	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	Fermentas
<i>EcoR</i> V	5'...GAT↓ATC...3' 3'...CTA↑TAG...5'	Promega
<i>Hind</i> III	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↑A...5'	Fermentas
<i>Kpn</i> I	5'...GGTAC↓C...3' 3'...C↑CATGG...5'	NEB
<i>KspA</i> I	5'...GTT↓AAC...3' 3'...CAA↑TTG...5'	Fermentas
<i>Mro</i> I (<i>Kpn2</i> I)	5'...T↓CCGGA...3' 3'...AGGCC↑T...5'	NEB, Fermentas
<i>Not</i> I	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'	NEB, Fermentas
<i>Rsa</i> I	5'...GT↓AC...3' 3'...CA↑TG...5'	NEB
<i>Sac</i> I	5'...GAGCT↓C...3' 3'...C↑TCGAG...5'	NEB
<i>SnaB</i> I (<i>Eco105</i> I)	5'...TAC↓GTA...3' 3'...ATG↑CAT...5'	NEB, Fermentas
<i>Stu</i> I (<i>Eco147</i> I)	5'...AGG↓CCT...3' 3'...TCC↑GGA...5'	NEB, Fermentas
<i>Tat</i> I	5'...W↓GTACW...3' 3'...WCATG↑W...5'	Fermentas
<i>Xba</i> I	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↑T...5'	NEB, Fermentas
<i>Xho</i> I	5'...C↓TCGAG...3' 3'...GAGCT↑C...5'	NEB, Fermentas

W= A oder T, N= A,T,C oder G.

2.1.7.2 DNA/RNA/Protein modifizierende Enzyme

Tabelle 2.18: Übersicht über weitere nukleinsäure- oder proteinmodifizierende Enzyme mit Konzentrations- und Herstellerangaben.

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkungen
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega, Peqlab	5'→3' Polymeraseaktivität in Mg ²⁺ haltiger Lösung, 3'-Tailing mit Einzelnukleotiden, 5 U/μl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega	5'→3' Polymeraseaktivität, 3'→5' Exonukleaseaktivität (<i>proofreading</i>), 2-3 U/μl
AMV-Reverse Transkriptase	Promega	cDNA-Synthese, 10 U/μl

Tabelle 2.18 (Fortsetzung)

SuperScript II RNase H ⁻ RT	Invitrogen	cDNA-Synthese, RNase H ⁻ Mutante (verringerte RNA-Degradierung), 200U/μl
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	Deoxyribonuklease I, Degradierung von Einzel- und Doppelstrang-DNA, 1 U/μl
Proteinase-K	Roth	Serin-Protease, Spaltung von Proteinen, Inaktivierung von Nukleasen, 20 mg/ml
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Boehringer	aus Kälberdarm, Dephosphorylierungsreaktionen, 1 U/μl

2.1.8 Medien und Medienzusätze

2.1.8.1 Medienbestandteile

Tabelle 2.19: Übersicht über Medienzusätze mit Herstellerangabe.

Bezeichnung	Hersteller
Select Yeast Extract	Gibco BRL
Select Agar	Gibco BRL
Select Peptone 140	Gibco BRL
Murashige & Skoog-Medium	Duchefa
Plant-Agar	Duchefa
X-Gal	BSA
IPTG	BSA
Ampicillin	Serva
Kanamycin	Serva
Rifampicin	Serva
Streptomycin	Serva
Claforan	Duchefa
IAA (Auxin)	Duchefa
BA (Cytokinin)	Duchefa

2.1.8.2 Medienzusammensetzung

Luria-Bertoni Medium (LB-Medium),

nach Sambrook & Russel (2001)

- o 15 g Agar
- o 10 g Select Peptone
- o 5 g Yeast Extract
- o 10 g NaCl

H₂O_{dest} ad 1000 ml (pH 7,5), autoklavieren.

LB-AIX-Medium

- o 1000 ml LB-Medium (~50°C)
- o 150 mg Ampicillin/1 ml H₂O
- o 40 mg X-Gal/1 ml DMF
- o 46 mg IPTG/1 ml H₂O_{bidest}

LB-AP-Medium

- o 1000 ml LB-Medium (~50°C)
- o 150 mg Ampicillin/1 ml H₂O_{bidest}

LB-Kn-Medium

- o 1000 ml LB-Medium (~50°C)
- o 50 mg Kanamycin/1 ml H₂O_{bidest}

LB-CIX-Medium

- o 1000 ml LB-Medium (~50°C)
- o 25 mg Chloramphenicol/1 ml EtOH
- o 40 mg X-Gal/1 ml DMF
- o 47 mg IPTG/1 ml H₂O_{bidest}

LB-Kn-Rif-Medium

- o 1000 ml LB-Medium (~50°C)
- o 50 mg Kanamycin/1 ml H₂O_{bidest}
- o 100 mg Rifampicin/1 ml Methanol

LB-Str-Medium

- o 1000 ml LB-Medium (~50°C)
- o 25 mg Streptomycin/1 ml H₂O_{bidest}

SOB-Medium

- o 10 g Bacto Peptone 140
 - o 5 g Yeast Extract
 - o 584 mg NaCl
 - o 186 mg KCl
- H₂O_{dest} ad 1000 ml (pH 6,0-7,0), autoklavieren.

SOC-Medium

- o 1 ml 2 M Glucose
- o 1 ml 2 M MgCl₂

SOB-Medium ad 100 ml.

MS-Medium

- o 4,705 g Murashige & Skoog Medium
- o 20 g Saccharose
- o 8 g Plant-Agar

H₂O_{dest} ad 1000 ml (pH 5,7-5,9, KOH), autoklavieren.

MS0-Medium

- o 4,705 g Murashige & Skoog Medium
- o 20 g Saccharose

H₂O_{dest} ad 1000 ml (pH 5,7-5,9, KOH), autoklavieren.

T0-Medium

- o 4,705 g Murashige & Skoog Medium
- o 20 g Saccharose
- o 6 g Plant-Agar
- o 250 mg Claforan
- o 50 mg Kanamycin

H₂O_{dest} ad 1000 ml (pH 5,7-5,9, KOH), autoklavieren.

T1-Medium

- o 1 mg BAP (20 µl Stammlsg.)
- o 0,1 mg NAA (20 µl Stammlsg.)
- o 500 mg Claforan
- o 50 mg Kanamycin

MS-Medium ad 1000 ml, BAP und NAA mit MS-Medium autoklavieren, Zugabe der Antibiotika bei ~50°C.

BAP-Stammlösung

- o 1 mg BAP in 20 µl 1 N NaOH (v/v)
- Lagerung bei 4°C für 2 Monate möglich.

NAA-Stammlösung

- o 1 mg NAA in 200 µl 1 N NaOH (v/v)
- Lagerung bei 4°C für 2 Monate möglich.

MS-Medium zur Samenselektion

- o 400 mg Kanamycin/1 ml H₂O_{bidest}
- in 1000 ml MS-Medium (~50°C).

2.1.9 Antiseren

Tabelle 2.20: Übersicht über eingesetzte Antiseren mit Herstellerangabe.

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkungen
BMVY-IgG / BMVY-IgG-AP	LOEWE Biochemica	polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS-ELISA Set
PVY-IgG-AP	LOEWE Biochemica	polyklonale Antiseren ex rabbit
BYV-IgG-AP	LOEWE Biochemica	polyklonale Antiseren ex rabbit
PEMV-IgG-AP	DSMZ Braunschweig	polyklonale Antiseren ex rabbit
MAFF24	Smith <i>et al.</i> (1996), zur Verfügung gestellt von Mark Stevens	monoklonales Antiserum ex rat
Goat-Anti-Rat- IgG-AP	Sigma-Aldrich	Anti-Rat-IgG AP-konjugierter Antikörper ex goat
MAb5G4 (BLRV)	DSMZ Braunschweig, Katul (1992)	monoklonales Antiserum ex mouse
RAM-AP	DSMZ Braunschweig	polyklonales Antiserum rabbit anti-mouse

AP= konjugiert mit Alkalischer Phosphatase

2.1.10 Geräte

Tabelle 2.21: Übersicht über verwendete Geräte mit Herstellerangabe und Modellbezeichnung.

Gerät	Hersteller	Bemerkung
Autoklav	Wolff	Sanoclav Tischautoklav
Bidestillationsanlage	GFL	Bi-Dest 2104
Binokular	Leica	
Blottingkammer	Hoefer	Vertikal-Elektroblot
Digitalkameras	Intas	Geldokumentation
	Canon	Ixus V2
Einwegspritzen	Braun	2 ml
Elektrophoresekammern	Polymehr	
	Hoefer	Mighty Small II
Elektroporator	Bio-Rad	Electroporator II
ELISA-Photometer	Bio-Rad	Microplate Reader 550
Feinwaage	Sartorius	Analytic 200 S
Hybridisierungsinkubator	Biometra	
Inkubationsschrank	Heraeus	
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Leica	CLSM, TCS SP2
Kühlzentrifugen	Sigma	4 K15, Festwinkelrotor 12130H, Ausschwingrotor 11140
	Sorvall	RC-5B Plus, Festwinkelrotoren SS-34 und SLA-1500
Magnetrührer	IKA	RH Basic
Mikroplate-Washer	Bio Tek Instruments	ELx50 Auto Strip Washer

Fortsetzung Tabelle 2.21

PCR Arbeitsstation	QBiogene	Template Tamer
Pflanzenpresse	Pollähne GmbH	MEKU Pflanzenpresse
pH-Meter	WTW	pH 523
Pipetten	Gilson	Pipetman P10, P20, P200, P1000
Schüttler	Braun Biotech	Certomat R+H
Spannungsquellen	LKB Bromma	2197 Power Supply
	Consort	E143 und E443
Sterilwerkbank	Heraeus	Lamina Air HA 2448 GS
Thermoblock	Eppendorf	Thermostat 5320
Thermocycler	Biometra	T3 und TGradient
	MJ Research	PTC 200
Tischzentrifuge	Eppendorf	MiniSpin
	Heraeus	Biofuge 13
UV-Tische	Intas	MW 312
	Spectroline	TVL 312 A
Vakuumkonzentrator	Heto	Hetovac VR1 CT60e
Videoprinter	Mitsubishi	P91D und Video Copy Processor
Vortexer	IKA	MS 1 Minishaker
Waage	Sartorius	LC 420
Wasserbäder	Haake	SF3 und BN2
Wipptisch	GFL	3013

2.1.11 Sonstige Materialien

Tabelle 2.22: Übersicht über weitere Materialien die für Versuchsdurchführungen verwendet wurden.

Material	Hersteller	Bemerkung
ELISA-Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One	#655061, Polystyrol, Microlon 600 (erhöhte Proteinbindungskapazität)
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell	Porengröße 0,45 µm
Nylonmembran	Qiagen	Qiabran

2.1.12 Software

Tabelle 2.23: Übersicht über eingesetzte Software mit Hersteller- und Versionsangabe.

Software	Hersteller	Version
Vector NTI	Informax Inc.	Demoversion 7
BioEdit	Hall, T.A. (1999)	5.0.6
ClustalX	Higgins, D.G. & Sharp, P.M.	1.8
SPSS	SPSS Inc.	11.0
SigmaPlot	SPSS Inc.	8.0
ELISA Microplate Manager	BioRad	
Gel Dokumentation Intas GDS	Intas	2002
Leica Confocal Software TCS SP2	Leica	2.1.11

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht der Versuchspflanzen

Von allen unter 2.1.4 angegebenen Versuchspflanzen wird Samen auf feuchtem Torfkultursubstrat (TKS) in 10er Töpfen ausgesät und mit Petrischalen abgedeckt, um die Verdunstung zu verringern. Die Anzucht im Gewächshaus erfolgt bei 24°C (Lüftungstemperatur) und unter Zusatzbeleuchtung. Die verwendeten Gewächshauskabinen verfügen nicht über eine Kühlung, sodass vor allem in den Sommermonaten Temperaturen über 24°C erreicht werden. Die Sämlinge werden in Schalen pikiert und ab dem 4-Blattstadium in TKS getopft.

2.2.2 Inokulation von Pflanzen mit Viren

Die Übertragung von Viren auf verschiedene Testpflanzen erfolgt mittels Blattläusen (*Myzus persicae*) oder mechanischer Inokulation. Die Inokulation von Pflanzen mittels Agroinfection ist unter 2.2.19 beschrieben.

2.2.2.1 Mechanische Virusübertragung

Für die mechanische Inokulation wird von einer virusinfizierten Pflanze Blattmaterial in einem Verhältnis von 1:5 in 0,03 M HEPES-Puffer (pH 7,0) gemörsert. Einige Blätter der zu inokulierenden Pflanzen werden mit dem Abrassiv Celite bestäubt und anschließend mit dem Pflanzenpresssaft der virusinfizierten Ausgangspflanze bestrichen. Durch das Verteilen des Pflanzenpresssaftes mit dem Daumen und der Kombination mit Celite werden der Blattoberfläche Verletzungen zugefügt, durch die Viren in die Pflanze gelangen und zu einer Infektion führen.

2.2.2.2 Vektorielle Virusübertragung

Die vektorielle Virusübertragung mittels *Myzus persicae* wird verwendet um die Blattlausübertragbarkeit der infektiösen Klone zu testen und wenn eine mechanische Übertragung nicht erfolgreich war. So lässt sich BYV nur in geringem Umfang von einer BYV infizierten *B. vulgaris* Erhaltungspflanze auf *N. benthamiana* mechanisch übertragen. Andererseits lässt sich BYV von *N. benthamiana* auf *N. benthamiana* ohne Probleme mechanisch übertragen.

Für die Virusübertragung mittels *Myzus persicae* werden 5-10 virusfreie Blättläuse für 24 Std. auf die jüngsten Blätter einer virusinfizierten *B. vulgaris* bzw. auf die Blattunterseite der untersten Stammblätter bei *N. benthamiana* gesetzt. An den *N. benthamiana* Blättern, die im unteren Stammbereich knapp über dem Substrat wachsen, ist eine Blattlausbesiedlung am erfolgreichsten. Die Blattläuse werden auf die

beschriebenen Blattbereiche von virusfreien *B. vulgaris* oder *N. benthamiana* gesetzt. Nach 48-72 Std. werden die Blattläuse durch Insektizidbehandlung abgetötet. Alle Blattlausübertragungen finden in insektendichten Käfigen statt. Die virusfreien *Myzus persicae* werden bei kontrollierter Temperatur und Luftfeuchte auf Paprikapflanzen (*Capsicum annum* L.) gehalten.

2.2.3 Serologische Nachweisverfahren

2.2.3.1 DAS-ELISA

Der *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wird als serologisches Nachweisverfahren für Pflanzenviren verwendet (Clark & Adams, 1977). Der *Double-antibody-sandwich*-ELISA (DAS-ELISA) ist eine Variante dieses Nachweisverfahrens, durch das aufgrund von spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen auf das Vorkommen und die Konzentration von Antigenen durch einen Farbnachweis geschlossen werden kann. Die DAS-ELISA Testungen werden mit kommerziell erhältlichen Anitseren-Sets der Firma LOEWE Biochemica und der DSMZ (Braunschweig) durchgeführt (siehe 2.1.9). Die Sets enthalten polyklonales Anti-Virus-Immunglobulin G (Anti-Virus-IgG), wobei ein Anti-Virus-IgG mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist (Anti-Virus-IgG-AP). In DAS-ELISA Untersuchungen wird der Virustiter im Blattstielgewebe und Proben der Blattlamina, die von Blattadern der ersten und zweiten Ordnung (Abbildung 2.1) mittels eines Skalpells befreit wird, untersucht.

Der DAS-ELISA wird in Polystyrol-Mikrotiterplatten mit hoher Proteinbindungskapazität durchgeführt. Dafür wird das Anti-Virus-IgG nach den Herstellerangaben im Beschichtungspuffer verdünnt und 200 µl der Antikörperlösung in jede vorgesehene Probenvertiefung der Mikrotiterplatte überführt. Die beschichtete Platte wird für 4 Std. bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit lagern sich die Anti-Virus-IgG an der Oberfläche der Polystyrol-Mikrotiterplatte an. Nach erfolgter Inkubation werden ungebundene Anti-Virus-IgG durch fünfmaliges Waschen mit PBS-T für je 3 Min. im Mikroplate-Washer entfernt. Das zu untersuchende Blattmaterial wird in einer Meku-Pflanzenpresse zerkleinert und der Presssaft nach Zugabe von PBS-TPO (1:3, w/v) in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Um den Presssaft von groben Pflanzenbestandteilen zu befreien wird er für 60 Sek. bei 13.000 UpM (Eppendorf, MiniSpin) zentrifugiert. Vom verbleibenden Überstand werden 200 µl in jede Probenvertiefung überführt. Die befüllte Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4°C zur Anlagerung der Antigene (Viren) an die gebundenen Anti-Virus-IgG inkubiert. Die freien Anlagerungsstellen in den Probenvertiefungen werden durch das im Probenpuffer enthaltene Tween, Polyvinylpyrrolidon und Ovalbumin abgesättigt. Nach einem

fünfmaligen Waschen für je 3 Min. werden jeweils 200 µl des 1:200 in PBS-TPO verdünnten, mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Virus-IgG-AP in jede Probenvertiefung pipettiert. Nach einer Inkubation von 4 Std. bei 37°C werden ungebundene Antikörper durch erneute Waschstschritte entfernt. Nach Zugabe von 200 µl Substratlösung pro Probenvertiefung wird die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Als Substrat dient das farblose p-Nitrophenylphosphat, von welchem in einer durch Alkalische Phosphatase katalysierten enzymatischen Reaktion Phosphorsäure abgespalten wird. Als Reaktionsprodukt entstehen p-Nitrophenolat-Anionen, die sich aufgrund ihrer charakteristischen gelbe Farbe im alkalischen Milieu photometrisch gut quantifizieren lassen. Die Intensität der Gelbfärbung ist dabei indirekt proportional zu der Menge an Antigenen (Virus), die im Presssaft enthalten waren. Bei hohem Antigengehalt kann mehr Anti-Virus-IgG-AP gebunden und damit auch vermehrt Substrat umgesetzt werden. Die Intensität der Verfärbung in jeder Probenvertiefung wird als Extinktion (*Absorbance*) in einem ELISA-Photometer bei 415 nm gemessen und dient nach Abzug von gemittelten Extinktionswerten von nicht virusinfizierten Kontrollpflanzen als Maß für den Virustiter im untersuchten Pflanzenpresssaft. Die Messung der Extinktion erfolgt 1, 2 und 3 Std. nach Zugabe der Substratlösung. Pflanzen werden als virusinfiziert eingestuft, wenn die verwendeten Presssäfte mindestens eine doppelte bis dreifach höhere Extinktion aufweisen als Presssaft einer nicht virusinfizierten Kontrollpflanze. Nachfolgend ist die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen angegeben.

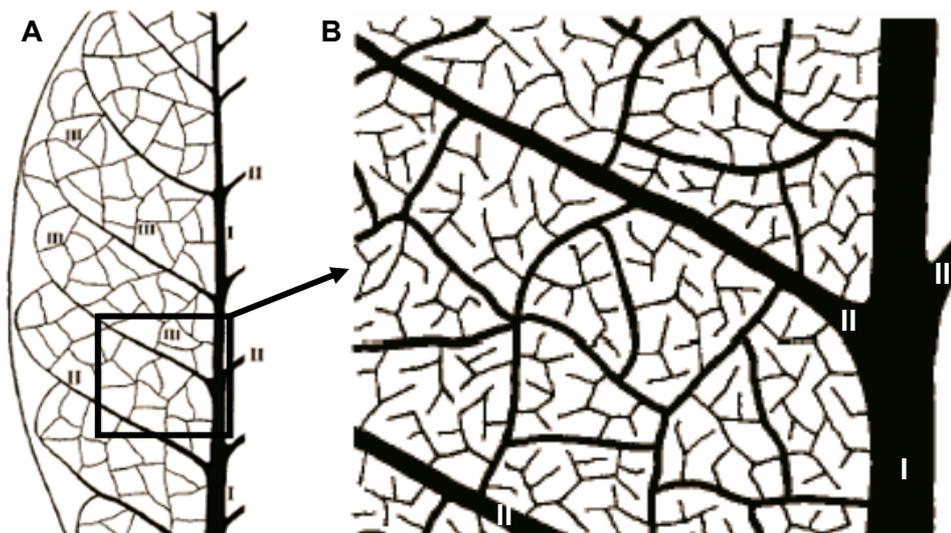


Abbildung 2.1: (A) Klassifizierung der Blattadern in *N. benthamiana* nach Roberts *et al.* (1997) mit der Blattmittelrippe (I) als Blattader erster Ordnung. (B) Ausschnittsvergrößerung aus (A) mit Blattadern II. Ordnung; davon abgehend sind Blattadern III., IV. und V. Ordnung dargestellt.

Beschichtungspuffer

- o 1,59 g Na_2CO_3
 - o 2,93 g NaHCO_3
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad 1000 ml, pH 9,6, autoklavieren.

PBS (phosphate buffered saline)

- o 8,0 g NaCl
 - o 0,2 g KH_2PO_4
 - o 0,2 g KCl
 - o 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad 1000 ml, pH 7,4, autoklavieren.

PBS-T (Waschpuffer)

- o 0,05 % Tween 20
- in PBS, pH 7,4.

PBS-TPO

- o 0,2 % Ovalbumin
 - o 2 % Polyvinylpyrrolidon
- in PBS-T, pH 7,4.

Substratlösung

- o 1 mg p-Nitrophenylphosphat / ml
10 % Diethanolamin
(pH 9,8)

2.2.3.2 Tissue-Print-Immuno-Assay (TPIA)

Der Virusnachweis durch *Tissue print immuno assay* (TPIA) ermöglicht die Lokalisierung von Viren in verschiedenen Pflanzengewebe. Im Gegensatz zum ELISA-Verfahren ist der TPIA sensitiver, da bereits eine einzige infizierte Zelle nachgewiesen werden kann und keine weitere Verdünnung mit Pflanzenpresssaft und Probenpuffer vorgenommen wird. Zusätzlich ermöglicht der TPIA die Auswertung einer großen Anzahl von Proben innerhalb kurzer Zeit. Eine Abschätzung der Viruskonzentration ist mit spezieller Bildbearbeitungssoftware möglich, im Vergleich zu dem normalen ELISA-Verfahren allerdings nur sehr eingeschränkt durchführbar. Für die Durchführung des TPIA werden die monoklonalen Antikörper MAb5G4 ex mouse (Katul, 1992) und MAFF24 ex rat (Smith *et al.*, 1996) für den Nachweis einer BChV- oder BMVYV-Infektion verwendet. Der Mab5G4-Antikörper, ursprünglich für die Detektion des Luteovirus *Bean leafroll virus* hergestellt, zeigt mit einer Reihe von Luteoviren Kreuzreaktionen, was vermutlich in identischen Epitopen im Hüllprotein dieser Viren begründet liegt (Katul, 1992). Ein Nachweis von gebundenem Mab5G4 im TPIA erfolgt durch einen polyklonalen mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten rabbit-anti-mouse Antikörper (RAM-AP, DSMZ, Braunschweig). Durch den MAFF24-Antikörper können BMVYV, BChV und BWYV nachgewiesen werden. Der Nachweis von

gebundenem MAFF24 erfolgt durch den mit Alkalischer Phosphatase konjugierten *goat-anti-rat* Antikörper (Sigma). Für den Nachweis von BYV-, PEMV-1/-2- oder PVY-Infektionen durch TPIA wurden polyklonale Anti-Virus-IgG-AP verwendet.

Die Durchführung des TPIA erfolgt weitgehend wie bei Lin *et al.* (1990) beschrieben. Von den zu untersuchenden Pflanzen werden Blattstiel- oder Stammproben mit einer Rasierklinge entnommen. Die Schnittfläche (Querschnitt) soll dabei gerade sein, um eine möglichst vollständige Abbildung der Probe zu gewährleisten. Tritt aus den Schnittflächen verstärkt Pflanzenpresssaft aus, kann dieser mit einem saugfähigen Tuch abgenommen werden, bevor die Schnittfläche kurz und mit leichtem Druck auf eine Nitrozellulosemembran gepresst wird. Die Membran wird für 1 Std. bei Raumtemperatur zur Blockierung in 0,2% BSA auf einer Laborwippe inkubiert. Nach einem fünfminütigen Waschschrift mit PBS-T wird die Membran für 1 Std. bei Raumtemperatur auf der Laborwippe in der Antikörperlösung inkubiert. In dieser Lösung sind die Antikörper 1:200 (MAb5G4, MAFF24) bzw. 1:400 (Anti-Virus-IgG-AP) in PBS-TPO verdünnt. An die Antigene (Viren), die aufgrund der Proteinbindungskapazität der Membran an diese beim Aufdrücken der Schnittfläche gebunden werden, lagern sich nun die spezifischen Antikörper an. Nach einem Waschschrift wird die Membran für 1 Std. bei Raumtemperatur in einer zweiten Antikörperlösung auf der Laborwippe inkubiert. Die Behandlung mit einem zweiten Antikörper wird nur nach Verwendung des Mab5G4 oder MAFF24 durchgeführt, da alle anderen verwendeten Antiseren bereits mit Alkalischer Phosphatase konjugiert sind. Für die Herstellung der zweiten Antikörperlösung werden die mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper (RAM-AP oder *goat-anti-rat*-AP) 1:1000 in PBS-TPO verdünnt. Nach der Inkubation werden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Als Substrat dient eine Fast Red TR/Naphthol AS-MX Lösung, welche nach einer durch Alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyse von Phosphorsäure-Estern eine dunkelviolette Färbung zeigt. Die Substratumsetzung findet dabei an den Orten der Antigen (Virus)-Antikörper Bindungen auf der Membran statt. Durch das Aufdrücken der Pflanzenprobe auf die Membran bleiben die Strukturen der Probe erhalten und eine indirekte Lokalisierung von Antigenen durch dunkelviolett verfärbte Bereiche im pflanzlichen Gewebe wird möglich. Nachfolgend sind die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen für den TPIA angegeben (PBS, PBS-T und PBS-TPO siehe 2.2.3.1).

Fast Red Puffer

- o 0,2 M Tris-base, pH 8,0
 - o 2 mM MgCl₂
- in H₂O_{dest.}

0,2% BSA (Bovine serum albumin)

- o 20 mg Ovalbumin, Bovin
Serum Albumin
- in 10 ml PBS (siehe 2.2.3.1) lösen.

Fast Red-Naphtol Substratlösung

- o 3 mg Naphtol AS-MX Phosphat
Disodium Salz in 7,5 ml
H₂O_{dest} lösen
- o 45 mg Fast Red TR Salz in 7,5
ml Fast Red Puffer lösen

Naphtol- und Fast Red- Lösungen frisch ansetzen und kurz vor dem Gebrauch mischen.

2.2.3.3 Nachweis von BMYV-Hüllprotein durch Western-Blot Analyse

Für den Nachweis viraler Proteine aus Pflanzen und die Bestimmung des Molekulargewichts anhand von Markerproteinen wird eine Gesamt-Protein Extraktion aus Pflanzen nach Berger *et al.* (1989) und eine Auftrennung der Protein-Extrakte durch Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow (1987) durchgeführt. Die in der analytischen SDS-Page aufgetrennten Proteine werden in einem Western-Blot durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran überführt und dort durch Adsorption immobilisiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Nachweis der an die Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine erfolgt über spezifische Antikörper und eine durch Alkalische Phosphatase katalysierte Färbung mit Fast-Red/Naphtol-AS-MX.

2.2.3.4 Gesamtprotein-Extraktion aus Pflanzen

Die Gesamtprotein-Extraktion aus Pflanzen wird nach einer modifizierten Methode nach Berger *et al.* (1989) durchgeführt. Hierzu werden 300 mg Pflanzenmaterial (Blattstiele) in 750 µl erhitztem Berger-Puffer (95°C) gemörsert und der Presssaft anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 10-minütiger Inkubation der Probe bei 95°C folgt eine Zentrifugation für 15 Min. bei 13000 UpM (Eppendorf, MiniSpin). 10 µl des Überstandes werden mit 10 µl 2x Probenpuffer durch eine Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt.

<u>Berger-Puffer</u>		<u>2x Probenpuffer</u>	
o	750 mM Tris-base (pH 8,8)	o	100 mM Tris-HCl (pH 6,5)
o	4 % (w/v) SDS	o	4 % SDS
o	4 % (w/v) 2-Mercaptoethanol	o	20 % Glycerin
o	40 % (w/v) Saccharose	o	200 mM DTT
		o	0,2 % Bromphenolblau

2.2.3.5 Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung des Gesamtprotein-Extraktes erfolgt durch die Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Schagger und Jagow (1987). Diese Methode ermöglicht eine gleichmäßige Auftrennung von Proteinproben (1-100 kDa) mit hoher Bandenschärfe in einem 15%igen Trenngel. Hierbei werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen unabhängig von ihrer Ladung auf Basis ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Durch parallel aufgetragene Markerproteine können die Molekulargewichte der Proteine annähernd bestimmt werden. Die Auftrennung erfolgt in einer Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur (Hofer Mighty Small II).

Nach der Polymerisation des Trenngels kann dieses in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt werden, welche anschließend mit Kathoden- und Anodenpuffer befüllt wird. Die mit Probenpuffer (siehe 2.2.3.4) versetzten Proteinproben werden in die mit Kathodenpuffer beschichteten Slots überführt. Das Laufverhalten der Proteinproben ist deutlich verbessert, wenn alle Gelslots mit gleichem Volumen befüllt werden. Für die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteinproben wird ein *prestained*-Proteinmarker (Biorad 161-0374, siehe Anhang) parallel aufgetragen. Dieser Marker wird bei dem nachfolgenden Western-Blot auf die Nitrozellulosemembran übertragen und ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts ohne Färbung des Protein-Gels. Zusätzlich erlaubt der Proteinmarker die Verfolgung des Laufverhaltens der Proben während der Elektrophorese und zeigt im nachfolgenden Western-Blot die Effizienz des Transfers an. Nach Anschluss der Wasserkühlung an die Elektrophorese-Apparatur wird eine Spannung von 80 V/260 mA angelegt. Nach Erreichen der gewünschten Auftrennungsweite wird das Gel entnommen und für den Elektrotransfer in die Western-Blot Apparatur überführt.

Tricin-SDS-PAA Trenngel (15%)

- o 30 ml Acrylamid (37,5:1, 30%)
- o 20 ml Tricin-Gelpuffer
- o 6,9 ml Glycerin (99,5%)
- o 2,77 ml H₂O_{bidest}
- o 300 µl Ammoniumpersulfat (10%)
- o 30 µl TEMED

In angegebener Reihenfolge unter leichtem Rühren zugeben. Die Polymerisation erfolgt nach Zugabe von TEMED.

Tricin-Gelpuffer

- o 3 M Tris-base
 - o 0,3% SDS
- in H₂O_{dest}, pH 8,45 (HCl).

Kathodenpuffer

- o 0,1 M Tris-base
- o 0,1 M Tricin
- o 0,1% SDS

in H₂O_{dest}, pH 8,25.

Anodenpuffer

- o 0,2 M Tris-base
- in H₂O_{dest}, pH 8,9 (HCl).

2.2.3.6 Western-Blot von Proteingelen

Die aufgetrennten Proteinproben werden in einem Western-Blot Verfahren nach Towbin *et al.* (1979) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Elektrotransfer erfolgt in einer Vertikal-Elektroblotkammer (Hoefer Scientific Instruments) für 14 Stunden bei einer angelegten Spannung von 40 V/160 mA.

Hierzu wird das Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran gleicher Größe platziert und beides zwischen zwei mit Blotting-Puffer angefeuchtete Filterpapiere gelegt. Das Einschleiben des Blots in die Kammer erfolgt so, dass ein Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran in Richtung der Anode (+) stattfinden kann (Kathode(-)-SDS-Polyacrylamidgel-Nitrozellulosemembran-Anode (+)). Die an eine Wasserkühlung angeschlossene Kammer ist vollständig mit Blotting-Puffer gefüllt, der durch einen Magnetrührstab für die Dauer des Transfers in Bewegung bleibt.

Der Nachweis der an die Nitrozellulosemembran gebundenen viralen Proteine erfolgt modifiziert, wie in Kapitel 2.2.3.2 (TPIA) beschrieben, durch Inkubation mit in TTBS verdünnten Mab5G4- bzw. RAM-AP Antikörperlösungen. Das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran erfolgt durch eine Inkubation der Membran in TBS mit 2% Tween für 2 Min.. Alle für einen TPIA beschriebenen Waschvorgänge werden hier mit TTBS durchgeführt. Der Nachweis der gebundenen

Antikörper erfolgt durch Inkubation der Membran in Fast-Red/Naphtol-AS Lösung für 10-15 Min..

2.2.3.7 ISEM

Die Darstellung von Viruspartikeln durch elektronenoptische Verfahren ermöglicht die Detektion von Viren in Pflanzen und die Charakterisierung der Partikelmorphologie. In einer Variante der Elektronenmikroskopie (EM), der *immunosorbent electron microscopy* (ISEM) werden die Viruspartikel an, mit Anti-Virus-IgG beschichtete, EM-Netze (*grids*) gebunden. Eine Vereinfachung des Nachweises wird dadurch erreicht, dass bereits an das Grid gebundene Viruspartikel mit einem Anti-Virus-IgG inkubiert werden. Bei dieser als Dekoration bezeichneten Methode werden die Viruspartikel von einer Hülle aus IgG umgeben, die durch die negative Kontrastierung im EM deutlich zu erkennen ist.

Die elektronenoptische Darstellung von Viren wurde durch Herrn Dr. Lesemann und seine Mitarbeiter an der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig durchgeführt. Hierbei wurden Viruspartikel sowohl mit, als auch ohne Dekoration dargestellt. Für den Nachweis mittels ISEM werden mit Pioloform beschichtete und mit Kohle bedampfte Nickelgrids auf einer Antikörperlösung für 5 Min. inkubiert. Der verwendete Antikörper ist spezifisch für BWYV, eignet sich aber aufgrund von gemeinsamen Epitopen im Hüllprotein auch für den BMYV-Nachweis. Das so behandelte Grid wird mit einigen Tropfen bidestilliertem Wasser von nicht gebundenen Antikörpern gereinigt und am Grid haftendes Wasser vom Rand her mit einem Filterpapier abgesaugt. Zur Anlagerung der Viruspartikel wird das Grid auf einem Tropfen Pflanzenpresssaft bei Raumtemperatur in einer Feuchteammer über Nacht inkubiert. Für die Herstellung des Presssaftes wird virusinfiziertes Pflanzenmaterial in Phosphatpuffer homogenisiert, etwas Presssaft mit einer Pasteurpipette aufgenommen und ein Tropfen auf einen Objektträger gegeben. Nach der Inkubation wird das Grid mit bidestilliertem Wasser gewaschen und die restliche Flüssigkeit mit einem Filterpapier vom Rand her abgesaugt. Für eine Dekoration der Viruspartikel werden die Grids auf Anti-BWYV-IgG-Lösung für 15 Min. inkubiert und nicht gebundene Antikörper anschließend mit bidestilliertem Wasser entfernt. Die dekorierten und nicht dekorierten Grids werden zur Kontrastierung mit 1% Uranylacetatlösung behandelt. Die hergestellten Präparate werden im EM untersucht und ausgewertet (Vergrößerung x37000). Die Anzahl der Viruspartikel pro Beobachtungsfeld wird nach folgendem Schlüssel angegeben:

+++ : 100 - 1000 Partikel pro Beobachtungsfeld

++ : 10 - 100 Partikel pro Beobachtungsfeld

+ : 1 - 10 Partikel pro Beobachtungsfeld

<u>0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0)</u>	<u>1% Uranylacetat</u>
o 38,8 ml KH_2PO_4 (500 mM)	o 1% Uranylacetat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
o 61,2 ml Na_2HPO_4 (500 mM)	

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 500 ml.

2.2.4 Phenol/Chloroform-Reinigung

Die Entfernung von kontaminierenden Proteinen bei der Aufreinigung von Nucleinsäuren wird mit einer Phenol/Chloroform Reinigung erreicht. Hierbei wird das gleiche Volumen TE-Puffer gesättigten Phenols auf den Reaktionsansatz gegeben und gut vermischt. Nach einer Zentrifugation von 5 Min. bei 13000 UpM (Heraeus, Biofuge 13) kann die obere wässrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt werden. Die Zugabe von Chloroform reinigt den Reaktionsansatz von in der wässrigen Phase verbliebenem Phenol. Das Gemisch wird gut geschüttelt und für 5 Min. bei 13000 UpM (Heraeus, Biofuge 13) zentrifugiert. In der wässrigen Phase befindet sich die gereinigte Nucleinsäure, die durch Ethanol (siehe 2.2.5) präzipitiert werden kann.

2.2.5 Nucleinsäurefällung mit Ethanol

Für die Präzipitation von Nucleinsäuren aus Lösungen wird eine Ethanol/Natriumacetat-Fällung durchgeführt. Hierzu wird der Reaktionsansatz mit dem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol_{abs} (-20°C) versetzt und gut gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 13000 UpM (Sigma 4K15, Rotor 12130H) und 4°C wird der Überstand verworfen, das Pellet in 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 Min. unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet im Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend in TE 10/0,1 aufgenommen.

TE 10/0,1

- o 10 mM Tris-base
 - o 0,1 mM EDTA
- in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, pH 8,0.

2.2.6 Isolierung von Nukleinsäure aus pflanzlichem Gewebe

2.2.6.1 Gesamtnukleinsäure-Extraktion aus Pflanzen

Für den Nachweis von Fremd-DNA in transgenen *N. benthamiana* mittels PCR wird die Gesamt-DNA Extraktion nach Edwards *et al.* (1991) durchgeführt. Bei dieser Methode, die sich sowohl für die DNA als auch für die RNA Extraktion eignet (Menzel & Maiß, 2000), liegt nach ungefähr 30 Min. die Gesamtnukleinsäure für eine weitere Verwendung vor. Die Pflanzenproben werden mit dem Verschluss eines 1,5 ml Eppendorfgefäßes aus den Blättern der zu untersuchenden Pflanze ausgestanzt. Zwei solcher Blattscheiben werden im Eppendorfgefäß durch ein Mikropistill mit 400 µl Extraktionspuffer homogenisiert. Nach einer Zentrifugation von 1 Min. bei 13000 UpM (Eppendorf, MiniSpin) werden 300 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol (-20°C) versetzt, gut gemischt und anschließend für 2 Min. zur Ausfällung der Nukleinsäure bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 Min. bei 13000 UpM (Eppendorf, MiniSpin) wird der Überstand abgegossen und das Pellet im Vakuum getrocknet. Das Pellet wird in 100 µl TE 10/0,1 aufgenommen. Die extrahierte Nukleinsäure kann sofort in der PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

Extraktionspuffer

- o 200 mM Tris Base
- o 250 mM NaCl
- o 25 mM EDTA
- o 0,5 % SDS

in H₂O_{dest}, pH 7,5.

2.2.6.2 Gesamt-DNA Extraktion aus Pflanzen mit dem DNeasy® Plant Kit

Für die Durchführung von Southern-Blot Hybridisierungen wird Gesamt-DNA aus transgenen *N. benthamiana* mit dem DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) extrahiert. Mit diesem Extraktionsverfahren können aus 100 mg junger Tabakblattmasse (*Nicotiana tabacum*) durchschnittlich 20-25 µg Gesamt-DNA extrahiert werden. Nach Aufschluss der pflanzlichen Zellen und Reinigung von Zellbestandteilen wird die DNA an einer Silica-Gel ähnlichen Membran gebunden, von der sie nach einer Reinigung wieder eluiert werden kann. Verwendet werden die mit dem Extraktionskit gelieferten Lösungen. Alle Zentrifugationen werden mit der Eppendorf MiniSpin Tischzentrifuge durchgeführt.

Es werden 100 mg junges *N. benthamiana* Blattgewebe in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff für 20 Sek. gefroren. Mit einem zuvor in flüssigen Stickstoff getauchten Mikropistill wird die gefrorene Blattmasse zu einem feinen Pulver zerrieben. Bei diesem Vorgang darf das Pflanzenmaterial nicht auftauen. Das zerriebene Pflanzengewebe wird anschließend mit 400 µl AP1 Puffer und 4 µl RNase A Lösung (100 mg/ml) gut vermischt. Für die Zellyse wird das Gemisch für 10 Min. bei 65°C mit dreimaligem Invertieren in einem Wasserbad inkubiert, bevor 130 µl AP2 Puffer zugegeben werden. Nach gutem Mischen folgt eine Inkubation für 5 Min. auf Eis. Durch die anschließende Zentrifugation bei 14000 UpM für 5 Min. werden die Zellbestandteile vom Überstand getrennt. Dieser wird in eine QIAshredder Mini Spin Säule, die sich in einem 2 ml Auffanggefäß befindet, dekantiert. Durch diese Säule werden die im Überstand verbliebenen Zellbestandteile durch eine Zentrifugation bei 14000 UpM für 2 Min. vom Filtrat getrennt. Der Durchfluss wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1,5 Vol. AP3/E Puffer versetzt. Nach vorsichtigem Invertieren werden 650 µl des Gemisches auf eine DNeasy Mini Spin Säule in ein 2 ml Auffanggefäß überführt und für 1 Min. bei 8000 UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Zentrifugation mit dem restlichen Volumen des mit dem AP3/E Puffer gemischten Filtrats wiederholt. Der Durchfluss wird verworfen und die DNeasy Mini Spin Säule in ein neues Auffanggefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl AW Puffer auf die Säule folgt eine Zentrifugation von 1 Min bei 8000 UpM. Dieser Durchfluss wird wiederum verworfen und die Mini Spin Säule erneut durch Zugabe von 500 µl AW Puffer und einer Zentrifugation für 2 Min. bei 14000 UpM gewaschen. Anschließend wird die Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführt und auf die Membran 50 µl AE Puffer pipettiert. Die Elution der an die Membran gebundenen DNA erfolgt durch eine Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur (15-25°C) und eine nachfolgende Zentrifugation für 1 Min. bei 8000 UpM. Nach erneuter Zugabe von 50 µl AE Puffer auf die Membran mit anschließender Inkubation und Zentrifugation liegen ~100 µl in AE Puffer gelöste Gesamt-DNA (20-25 µg) zur weiteren Verwendung vor.

2.2.6.3 Gesamt-RNA Extraktion aus Pflanzen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenproben wird nach einer veränderten Methode von Verwoerd *et al.* (1989) durchgeführt. Hierbei wird RNA in mehreren Schritten von kontaminierenden Proteinen und DNA gereinigt. Für die Extraktion werden 250 mg Blattmaterial in 300 µl 0,03 M HEPES-Puffer gemörsert und der Presssaft in ein Sicherheitsreaktionsgefäß mit einem auf 80°C erhitztem Gemisch aus 300 µl Phenol und 300 µl RNA-Extraktionspuffer überführt. Anschließend wird der Presssaft im Eppendorfgefäß mit der Phenollösung gut gemischt und für 5 Min. bei

13000 UpM (Heraeus, Biofuge 13) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfggefäß pipettiert, mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gut gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 Min. bei 13000 UpM (Heraeus, Biofuge 13) wird die obere wässrige Phase abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen 4 M LiCl-Lösung versetzt. Nach leichtem Mischen werden die Nukleinsäuren bei 4°C über Nacht ausgefällt. Das Präzipitat wird für 20 Min. bei 13000 UpM (Sigma 4K15, Rotor 12130H) und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet im Vakuum getrocknet und anschließend in 175 µl RNase freiem Wasser (DEPC behandelt) resuspendiert. Um vorhandene DNA abzubauen, werden 5 µl RQ1-DNase (1U/µl) und 20 µl 10x RQ1-DNase-Puffer zugegeben und das Gemisch für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Es folgt die Zugabe von 20 µl Proteinase-K (20mg/ml) und 200 µl Proteinase K-Puffer und eine weitere Inkubation für 30 Min. bei 37°C. Zur Reinigung der Lösung wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.4) mit anschließender Natriumacetat/Ethanol-Fällung (siehe 2.2.5) durchgeführt. Das Pellet wird in 50 µl TE 10/0,1 resuspendiert. Die extrahierte RNA kann direkt für die Amplifikation in der RT-PCR verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

RNA-Extraktionspuffer

- o 100 mM LiCl
- o 10 mM EDTA
- o 100 mM Tris
- o 1% SDS

in H₂O_{dest}, pH 8,0.

Proteinase K Puffer

- o 200 mM Tris-HCl
- o 25 mM EDTA
- o 300 mM NaCl
- o 2 % SDS

in H₂O_{dest}, pH 7,0.

RNase freies Wasser

- o 2 ml DEPC
- H₂O_{dest} ad 1000 ml, über Nacht rühren und autoklavieren.

4 M LiCl-Lösung

in H₂O_{dest}.

2.2.7 Reverse Transkription

Der Nachweis und die Amplifikation von aus infizierten Pflanzen extrahierter viraler RNA wird durch reverse Transkription mit nachfolgender Polymerase Kettenreaktion (siehe 2.2.8) ermöglicht. Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) verwendet RNA als Matrize und synthetisiert einen zu der RNA-Matrize komplementären einzelsträngigen DNA-Strang (cDNA), der in einer nachfolgenden PCR mit einer DNA-Polymerase als Amplifikationsvorlage verwendet werden kann. Die Herstellung von cDNA kann separat oder im gleichen PCR-Gefäß, in dem auch die Amplifikation stattfindet, durchgeführt werden. Für die Herstellung viraler full-length Klone wurde die Reverse Transkriptase Superscript II (Invitrogen) verwendet. Das Enzym Superscript II wird aus *E. coli* Zellen extrahiert, welche das *pol*-Gen des *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) exprimieren. Während unmodifizierte M-MLV-RT eine hohe RNase H Aktivität aufweist, ist in der Superscript II diese Aktivität durch Mutationen in der RNase H Domäne unterbunden. Diese Modifikation verhindert die Degradierung von RNA Molekülen bei der Erststrang cDNA-Synthese und führt zu einer effektiveren Anreicherung von cDNA. Bei der Verwendung von Superscript II findet die cDNA Synthese in einem separaten PCR-Gefäß statt. Für Routinenachweisreaktionen wird eine aus gereinigten *Avian myeloblastosis virus* Partikeln extrahierte RT verwendet (AMV-RT, Promega), bei der die RNase H Aktivität noch vorhanden ist. Allen Reversen Transkriptasen gemein ist die im Vergleich zu DNA Polymerasen relativ hohe Rate an Basenfehlinsertionen. So wurde bei AMV-RT eine Fehlerrate von $4,9\text{-}5,8 \times 10^{-4}$ (~1 Fehlinsertion pro 2000 Basen) und bei M-MLV eine Fehlerrate von 1×10^{-3} (~1 Fehlinsertion pro 1000 Basen) nachgewiesen (Ricchetti & Buc, 1990).

Der Routinenachweis von viraler RNA wird in einem PCR-Gefäß durchgeführt, d.h. alle benötigten Enzyme und Reagenzien für die Reverse Transkription und die anschließende PCR liegen zusammen vor. In dieser Ein-Schritt-RT-PCR wird dem PCR-Mix (siehe 2.2.8) 0,5 U AMV-RT (10U/µl) und 2 µl Gesamt-RNA (siehe 2.2.6.3) zugegeben und nach der Denaturierung der RNA bei 70°C für 10 Min. zur cDNA Synthese für 50 Min. bei 42°C im PCR-Cycler inkubiert bevor die PCR-Amplifikationszyklen beginnen.

Bei der Verwendung von Superscript II werden 2 µl Gesamt-RNA, 1 µl Primer (komplementär zur RNA-Sequenz) und 12,5 µl RNase freies Wasser in einem PCR-Gefäß gemischt und im PCR-Cycler für 10 Min. bei 70°C zur Denaturierung der RNA inkubiert. Nach der Abkühlung auf 4°C werden 5,0 µl 5x First strand Puffer, 1 µl 25 mM dNTP-Mix und 2,5 µl 0,1 M DTT zugegeben und vorsichtig vermischt. Es folgt eine kurze Inkubation für 1 Min. bei 42°C bevor 200 U Superscript II (200 U/µl) zugegeben

werden. Nach Inkubation für 50 Min. bei 42°C im PCR-Cycler wird die Reaktion bei 70°C für 15 Min. gestoppt. Die synthetisierte cDNA wird sofort in der PCR verwendet oder bei 4°C aufbewahrt. Es werden die mit der Superscript II gelieferten Puffer verwendet. Alle Versuchsschritte außerhalb des PCR-Cyclers werden auf Eis durchgeführt.

5x First strand Puffer

- o 250 mM Tris-HCl (pH 8,3)
- o 375 mM KCl
- o 15 mM MgCl₂

Puffer wird mit Superscript II geliefert.

2.2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Anreicherung (Amplifikation) von Nukleinsäurefragmenten mit definierter Länge und Sequenz. Eine Amplifikation von DNA kann aus doppelsträngiger oder einzelsträngiger DNA (z.B. cDNA) erfolgen. Das Prinzip der PCR beruht auf einer enzymatischen Vervielfältigung einer DNA-Matrize, deren Sequenz an den zu vervielfältigenden Endbereichen bekannt ist. Hierzu werden zwei Oligonukleotide benötigt, die Primer, die jeweils komplementär homolog zu dem (+)-Strang des einen Endes und zu dem (-)-Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region sind. Nach einer Denaturierung der DNA durch Hitzeeinwirkung lagern sich die Primer bei der anschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize an. Eine hitzestabile Polymerase, z.B. *Taq*-Polymerase (eine aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene DNA-Polymerase), erstellt ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers durch Primer-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Die Extension beginnt sofort nach der Anlagerung der Primer, also bereits bei suboptimalen Temperaturbedingungen für die *Taq*-Polymerase. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitzeeinwirkung voneinander getrennt. Durch Senkung der Temperatur wird eine erneute Bindung der Primer an die ursprünglichen und die neu synthetisierten DNA-Fragmente ermöglicht, und es kann eine weitere Amplifikation an einer größeren Anzahl von Matrizen stattfinden. Durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen des Amplifikationszyklus wird eine exponentielle Vermehrung des von den Primern flankierten DNA-Abschnittes erreicht. Ein Amplifikationszyklus in einer Standard-PCR besteht aus drei Teilschritten:

- o Denaturierung von doppelsträngiger DNA oder cDNA bei 94°C
- o Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die Einzelstränge (40-70°C)
- o Synthese des Komplementärstranges durch eine thermostabile DNA Polymerase (bei *Taq*-Polymerase 72°C)

Die Festlegung der Anlagerungstemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer, d.h. der Temperatur bei der sich 50% der Primer wieder von der Matrize lösen. Als Faustregel gilt, dass die Anlagerungstemperatur 5°C unter der Schmelztemperatur liegen sollte. Für die exakte Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers werden verschiedene Modelle angewandt, wobei neben der Länge und der Basenzusammensetzung des Primers vor allem auch die vorliegende Konzentration maßgebend ist. Als zuverlässiges Berechnungsmodell hat sich der Algorithmus, basierend auf der *nearest-neighbour thermodynamics* Methode nach Breslauer *et al.* (1986) erwiesen, welches in Softwareprogrammen wie VectorNTI kalkuliert werden kann. Um eine hohe Spezifität bei der Amplifikation eines Fragmentes in der PCR zu erreichen, sollten die verwendeten Primer annähernd gleiche Schmelztemperaturen besitzen. Ausgehend vom angelagerten Primer synthetisiert die DNA Polymerase den Komplementärstrang in 5'→3' Richtung durch Einbau der im PCR-Mix vorliegenden Desoxynukleotide. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen für eine Amplifikation, maßgeblich beeinflusst durch Salzkonzentrationen und PCR-Pufferkonzentrationen, sind an die jeweils verwendete Polymerase angepasst. Es werden in dieser Arbeit zwei Polymerasen verwendet, die sich in ihrer Fähigkeit zur Korrektur von Lesefehlern unterscheiden. Während die *Taq*-Polymerase diesen Korrekturmechanismus nicht besitzt, zeigt die *Pfu*-DNA Polymerase (extrahiert aus einem *Pyrococcus furiosus* Stamm, Promega) neben der 5'→3' Polymeraseaktivität auch eine 3'→5' (*proofreading*) und eine geringe 5'→3' Exonukleaseaktivität. Nach Cline *et al.* (1996) korrigiert die *proofreading*-Exonukleaseaktivität Basenfehlinsertionen während der Amplifikation und vermindert dadurch im Vergleich zur der mit *Taq*-Polymerase festgestellten Fehlerrate von 8×10^{-6} (1 Fehlinsertion pro ~125.000 Basenpaaren) die mit *Pfu*-Polymerase nachgewiesene Fehlerrate auf $1,3 \times 10^{-6}$ (1 Fehlinsertion pro ~770.000 Basenpaaren). Die *Pfu*-Polymerase wird verwendet um DNA-Abschnitte zu amplifizieren, die für die Integration in *full-length*-Klone vorgesehen sind. Die 5'→3' Exonukleaseaktivität kann allerdings zur Verkürzung von Einzelstrang-DNA und zur Degradierung von Primern führen, was den Amplifikationserfolg schmälern kann. Die Zugabe der *Pfu*-Polymerase erfolgt am Ende in den fertigen PCR-Mix. Da die Prozessivität der *Pfu*-Polymerase mit 500

bp/Min. um die Hälfte geringer ist als die der *Taq*-Polymerase, wird, falls eine Amplifikation mit der *Pfu*-Polymerase alleine nicht erfolgreich ist, ein 10:1-Gemisch (*Taq:Pfu*) in der PCR verwendet. So wird versucht, die Vorteile des Korrekturmechanismus mit einer guten Prozessivität zu kombinieren. Hierbei ist zu beachten, dass die Reaktionsbedingungen für die *Taq*-Polymerase optimiert sind, d.h. $MgCl_2$ wird dem PCR-Mix zugegeben und nicht das für die *Pfu*-Polymerase optimale $MgSO_4$. Der Standard-PCR-Mix für 50 μ l Ansätze für Amplifikationen mit *Pfu*-Polymerase und *Taq*-Polymerase ist nachfolgend dargestellt. Es wurden die mit dem jeweiligen Enzym mitgelieferten PCR-Puffer verwendet.

Taq-Polymerase-PCR-Mix

- o 2 μ l DNA-/cDNA-Extrakt
- o 5 μ l 10x *Taq*-PCR-Puffer
- o 5 μ l $MgCl_2$ (25mM)
- o 0,5 μ l dNTP-Mix (je 25mM)
- o 1 μ l sense Primer (10 μ M)
- o 1 μ l antisense Primer (10 μ M)
- o 0,1 μ l *Taq*-Polymerase (5U/ μ l)
bzw. *Taq/Pfu* 10:1

H_2O_{bidest} ad 50 μ l.

Pfu-Polymerase-PCR-Mix

- o 2 μ l DNA-/cDNA-Extrakt
- o 5 μ l 10x *Pfu*-PCR-Puffer mit
- o 20 mM $MgSO_4$
- o 0,5 μ l dNTP-Mix (je 25mM)
- o 1,5 μ l sense Primer (10 μ M)
- o 1,5 μ l antisense Primer (10 μ M)
- o 0,3 μ l *Pfu*-Polymerase (2-3U/ μ l)
 H_2O_{bidest} ad 50 μ l.

Der PCR-Mix wird grundsätzlich auf Eis angesetzt. Die unterschiedlichen Programme, die für die Amplifikation im PCR-Cycler gespeichert werden, variieren hauptsächlich in Abhängigkeit des verwendeten Primerpaares, in der Anlagerungstemperatur (zwischen 52°C und 60°C in dieser Arbeit) und der Elongationszeit. Setzt man *Taq*-Polymerase ein, wird pro zu amplifizierenden 1000 bp 1 Min. Elongationszeit berechnet, bei Verwendung von *Pfu*-Polymerase pro 1000 bp 2 Min.. Ein Standard-PCR Programm beinhaltet die primäre Denaturierung der DNA für 2 Min. bei 94°C, 35 Zyklen (94°C für 30 Sek., 30 Sek. Primeranlagerung bei 52°C-55°C, Amplifikation bei 72°C für 1 bzw. 2 Min. pro 1000 bp) und eine Abschlussynthese für 10 Min. bei 72°C, in der unvollständig amplifizierte Fragmente fertiggestellt werden können. Nach der Abschlussynthese werden die Proben sofort bei 4°C aufbewahrt. Das amplifizierte Fragment (Amplifikat) kann durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.10.5) kontrolliert werden.

10x *Taq*-PCR-Puffer

- o 100 mM Tris-base (pH 8,8,)
 - o 500 mM KCl
 - o 0,8 % Nonidet P40
- Puffer wird selbst hergestellt und mit *Taq*-Polymerase (Peqlab) verwendet.

dNTP Mix (je 25 mM)

- gleiche Volumen von jeweils 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP mischen
- Alliquots werden bei -20°C gelagert.

10x *Taq*-PCR-Puffer (Promega)

- o 100 mM Tris-HCl (pH 9,9)
 - o 500 mM KCl
 - o 1 % Triton[®] X-100
- Puffer und separates 25 mM MgCl₂ wird mit *Taq*-Polymerase (Promega) geliefert.

10x *Pfu*-PCR-Puffer mit MgSO₄

- o 200 mM Tris-HCl (pH 8,8)
- o 100 mM KCl
- o 100 mM (NH₄)₂SO₄
- o 20 mM MgSO₄
- o 1 % Triton[®] X-100
- o 1 mg/ml Nukleasefreies BSA

Puffer wird mit *Pfu*-Polymerase geliefert.

2.2.9 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Die Integration und Deletion spezifischer Nukleotide in einer gegebenen Sequenz erfolgt über die Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden. Hierfür werden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die eine gewünschte Insertion bzw. Deletion enthalten. Aufgrund ihrer komplementären Sequenzabfolge können die beiden Oligonukleotide hybridisiert werden und ein spezifisches DNA-Fragment ausbilden. Die Länge der Oligonukleotide wird dabei von dem Abstand zweier sequenzinterner Restriktionsschnittstellen bestimmt, die für eine Integration des gebildeten DNA-Fragments genutzt werden können.

Für die Hybridisierungsreaktion werden jeweils 25 µl der Oligonukleotidlösungen (10 µM) in ein PCR-Gefäß überführt. Die Hybridisierung erfolgt bei schrittweiser Abkühlung des Oligonukleotidgemisches von 95°C auf 20°C in einem Thermocycler. Nach einer Denaturierung für 10 Min. bei 95°C folgen bei einer Starttemperatur von 95°C 150 Hybridisierungszyklen für jeweils 1 Min., wobei jeder Folgezyklus bei einer um 0,5°C

geringeren Hybridisierungstemperatur durchgeführt wird. Die DNA-Fragmente können in Restriktionsspaltungen und Klonierungen verwendet werden.

2.2.10 Klonierung von DNA in *E. coli* und *A. tumefaciens*

2.2.10.1 Restriktionsverdau von DNA

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten und die Überprüfung einzelner Restriktionsschnittstellen werden Restriktionsendonukleasen (RE) verwendet. Diese Doppelstrang-DNA spaltenden Enzyme verdauen DNA im Gegensatz zu anderen DNasen sequenzspezifisch. Je nach Lage und Häufigkeit der betreffenden Schnittsequenzen entstehen exakt definierte DNA-Fragmente. Der Großteil der durch RE erkannten Schnittsequenzen sind Palindrome, d.h. dieser DNA-Abschnitt enthält in jedem der beiden Stränge in jeweils entgegengesetzter Richtung die gleiche Basensequenz (invers repetitive Sequenz). Nach sequenzspezifischer Enzymanlagerung werden die Phosphodiesterbindungen der beiden DNA-Stränge gespalten, was zu einer Trennung der DNA-Abschnitte führt. Hierbei entstehen an den gespaltenen DNA-Bereichen, je nach eingesetzter RE, glatte Enden (*blunt ends*) oder versetzte Enden (*sticky ends*), die bei Klonierungen mit komplementären Enden anderer Fragmente ligiert werden können (siehe 2.2.10.8). Die RE werden aus Mikroorganismen gewonnen und haben dort vermutlich die Aufgabe Zellen vor eindringender Fremd-DNA zu schützen. Die Namensgebung für diese Enzyme leitet sich im wesentlichen von den Bezeichnungen der Mikroorganismen ab, aus denen sie gewonnen werden (z.B. *Pvu* II von *Proteus vulgaris*). Die industrielle Herstellung erfolgt auch durch Klonierung der RE-Gene in rekombinante *E. coli*-Zellen. Die Aktivität der RE wird weitgehend von der Wahl des Reaktionspuffers, der Temperatur und der Menge an eingesetztem Enzym bestimmt. Die Konzentration der RE wird in *Units/μl* angegeben, wobei ein *Unit* die Menge an RE darstellt, die benötigt wird um 1 μg Substrat-DNA in 60 Min. bei optimalen Reaktionsbedingungen komplett zu verdauen. Die vom Hersteller der RE angebotenen Puffersysteme ermöglichen die Bereitstellung optimaler Reaktionsbedingungen auch bei Verwendung von zwei verschiedenen RE in einem Reaktionsansatz. Durch die Inkubation in suboptimalen Bedingungen wird eine unvollständige Spaltung der DNA angestrebt, d.h. nicht alle vorhandenen Schnittsequenzen werden während der Inkubationszeit durch das Enzym angegriffen. Ein unvollständiger Verdau wird durchgeführt, wenn innerhalb eines Zielfragments für eine Klonierung eine zusätzliche Schnittsequenz vorliegt, die zur unerwünschten Aufspaltung des Fragments führen würde. Eine unvollständige Spaltung wird durch

Verkürzung der Inkubationszeit der DNA mit der jeweiligen RE auf 10 Min. in einem nicht optimalen Reaktionspuffer und anschließender Hitzeinaktivierung erreicht.

Für einen Restriktionsansatz werden 5-10 µg DNA mit 10 U RE in 1x RE-Reaktionspuffer und der entsprechenden Menge an H₂O_{bidest} vermischt und für 1-2 Stunden bei der RE-spezifischen Temperatur inkubiert. Die Analyse der Restriktionsspaltung erfolgt durch gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente (siehe 2.2.10.5). Bei Verwendung von methylierungsempfindlichen RE wird aus dem *E. coli* Stamm JM110 extrahierte Plasmid-DNA eingesetzt (siehe 2.2.10.9).

2.2.10.2 Auffüllreaktion durch DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment

Nach einem Restriktionsverdau, der zu 5'-überhängenden DNA-Enden führt (*sticky ends*), können diese kohäsiven Enden durch das Klenow-Enzym zu glatten Enden 'aufgefüllt' werden. Das Klenow-Fragment besitzt die 5'→3' Polymerase- und 3'→5' Exonukleaseaktivität der *E. coli* DNA Polymerase I, aber keine 5'→3' Exonukleaseaktivität.

Für die Auffüllreaktion werden nach durchgeführtem Restriktionsverdau zu einem Phenol/Chloroform gereinigten 30 µl Ansatz 4 µl 10x Klenow-Reaktionspuffer, 1 µl 2 mM dNTP-Mix, 0,1 µl Klenow-Enzym (10 U/µl) und 4,9 µl H₂O_{bidest} gegeben. Nach einer Inkubation für 10 Min. bei 37°C wird durch Erhöhung der Temperatur auf 70°C für 10 Min. die enzymatische Reaktion gestoppt. Nach Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion der DNA aus dem LM-Gel (siehe 2.2.10.5) kann ein Aliquot in Ligationsreaktionen eingesetzt werden.

2.2.10.3 Dephosphorylierung von DNA-Proben

Die Dephosphorylierung von linearen Plasmidvektoren, die nach Behandlung mit Restriktionsenzymen kompatible Enden besitzen, verhindert die mögliche Religation der kompatiblen Enden und führt zu einer Erhöhung der gewünschten Ligationsprodukte. Durch eine mit Alkalischer Phosphatase katalysierten Entfernung von 5'-Phosphatgruppen an den Enden des linearisierten Vektors können nur DNA-Fragmente mit dem Vektor ligiert werden, die diese Phosphatgruppen noch besitzen. Eine Rezirkularisierung des Vektors ist dadurch unterbunden. Die aus Kälberdarm extrahierte verwendete Alkalische Phosphatase (CIAP) ist sehr stabil und wird, um eine Dephosphorylierung von zu ligierenden DNA-Fragmenten im Ligationsansatz zu vermeiden, durch Proteinase K-Behandlung und Phenol/Chloroform Extraktion vom dephosphorylierten Vektor getrennt.

Für die Reaktion werden ca. 5-10 µg linearisierter Vektor mit 1 U CIAP (1 U/µl) in 1x CIAP-Reaktionspuffer bei einem Endvolumen von 30 µl für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 U CIAP wird der Reaktionsansatz für 45 Min. bei 37°C inkubiert bevor die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 Min. erfolgt. Für eine Proteinentfernung werden 0,3 µl 0,5 M EDTA, 30 µl Proteinase K-Puffer (siehe 2.2.6.3) und 3 µl Proteinase K (20mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Es schließt sich eine Phenol/Chloroform Reinigung (siehe 2.2.4) und die Fällung der Vektor-DNA (siehe 2.2.5) an.

10x CIAP Reaktionspuffer

- o 0,5 M Tris-HCl (pH 8,5)
- o 1 mM EDTA

Puffer wird mit der CIAP geliefert.

2.2.10.4 Herstellung des λ-*Pst* I-Größenstandards

Für die Erstellung des in der Gelelektrophorese verwendeten Größenstandards werden 140 µl λ-DNA (0,4 mg/ml), 8 µl *Pst* I (NEB), 30 µl 10x NEB 3 Puffer und 122 µl H₂O_{bidest} gemischt und der Reaktionsansatz für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Die anschließende Inkubation bei 70°C für 10 Min. dient zum einen der Enzyminaktivierung und tritt zum anderen einem möglichen Zusammenschluss der kohäsiven Enden des 12 Nukleotid langen *cos*-Bereiches der Lambda Bakteriophagen DNA der 11501 bp und 2556 bp Fragmente entgegen. Ein durch den Zusammenschluss gebildetes 14057 bp langes Fragment kann durch die Inkubation bei 70°C wieder separiert werden. Nach Zugabe von 100 µl Ladepuffer werden Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Der *Pst* I-Verdau der λ-DNA (Sanger, 1982) führt zu der Bildung von 29 Fragmenten mit folgender Länge (in bp): 11501, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72 und 15 (siehe Anhang). Die Fragmente, die kürzer als 200 bp sind, können in einem 1%igen Agarosegel nicht deutlich unterschieden werden.

2.2.10.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von Nukleinsäurefragmenten wird durch Agarose-Gelelektrophorese erreicht. Hierbei wandern Nukleinsäuren innerhalb einer Gelmatrix aufgrund ihrer negativen Ladung in Abhängigkeit von ihrer Länge und Form (z.B. linear oder zirkulär) in einem angelegten elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die kleineren Fragmente laufen dabei schneller durch die Gelmatrix als die größeren, wodurch sich ein Gemisch von Nukleinsäurefragmenten leicht auftrennen lässt. Es wird standardmäßig ein 1 %iges Agarosegel verwendet. Hierfür wird Agarose in 1x TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst und 40 ml Agaroselösung nach leichter Abkühlung mit 0,13 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Lösung wird dann blasenfrei in ein Gelbett gegossen und zur Erzeugung von Probestaschen mit einem Gelkamm versehen. Nachdem das Gel erstarrt ist kann es in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer eingelegt werden und die Probestaschen mit den Nukleinsäureproben befüllt werden. Die Nukleinsäureproben werden zuvor mit 1/3 Volumen Ladepuffer versetzt. Das im Ladepuffer enthaltene Glycerin ermöglicht eine weitgehend verlustfreie Beladung der Probestaschen mit den Nukleinsäureproben. Durch Bromphenolblau kann die Laufgeschwindigkeit in der Gelmatrix visuell verfolgt werden. Die Laufgeschwindigkeit von Bromphenolblau im elektrischen Feld entspricht dabei ungefähr der von Oligonukleotiden. Als Größenstandard wird mit *Pst* I verdaute λ -DNA verwendet (siehe Anhang). Das elektrische Feld (ersten 2 Min. 80 V/260 mA, anschließend 120 V/260 mA) in der Elektrophoresekammer wird bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennungsweite angelegt. Während die Nukleinsäure die Gelmatrix durchläuft, lagert sich das im Gel enthaltene Ethidiumbromid an sie an. Als interkalierender kationischer Farbstoff kann sich Ethidiumbromid zwischen zwei Basenpaare einer DNA Doppelhelix schieben, was die Mutagenität dieses Farbstoffes durch Verlängerung und Verdrehung der Helix um die Dicke der eingelagerten Farbstoffmoleküle bedingt, und zum anderen durch elektrostatische Anlagerung an das negativ geladene Phosphatrückgrat in Wechselwirkung mit Nukleinsäure treten. Die an die aufgetrennten Nukleinsäurefragmente angelagerten Farbstoffmoleküle werden auf einem UV-Transilluminator ($\lambda=312$ nm) sichtbar gemacht und ihre Größe durch Vergleich mit dem Größenstandard bestimmt. Sollen die Fragmente für Klonierungen aus dem Gel extrahiert werden (siehe 2.2.10.6) wird eine *low-melting* Agarose zur Gelherstellung verwendet. Diese Agarose zeichnet sich durch eine geringe Schmelztemperatur aus und eignet sich zur schonenden Extraktion von großen DNA Fragmenten.

50x TAE Puffer

- o 242 g Tris-base
 - o 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 - o 57,1 ml Essigsäure
- erst Tris-base in 500 ml H₂O_{dest} lösen, dann
Zugabe EDTA und Essigsäure, H₂O_{dest} ad
1000 ml.

Ladepuffer

- o 3,44 ml Glycerin
- o 6,54 ml H₂O_{dest}
- o Spatelspitze Bromphenolblau

2.2.10.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wird für eine anschließende Klonierung des Fragments durchgeführt. Alle Zentrifugationen werden mit der Eppendorf MiniSpin Tischzentrifuge durchgeführt. Nach Restriktionsverdau (siehe 2.2.10.1) und elektrophoretischer Auftrennung wird das mit Ethidiumbromid angefärbte DNA-Fragment auf dem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Gelstück in ein Eppendorfgesäß überführt. Die Elution des DNA-Fragments aus dem Gel wird mit dem Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierbei wird das ausgeschnittene Agarosegelstück je nach zu isolierender Fragmentlänge in gleichem Volumen QX1 (bei Fragmentlänge zwischen 100 bp – 4 kb), in dreifachem Volumen QX1 und zweifachem Volumen H₂O (über 4 kb) oder in sechsfachem Volumen QX1 (unter 100 bp) durch leichtes Schwenken gelöst. Die DNA-Fragmente werden nach Zugabe von 10 µl Qiaex II Silicapartikelösung an diese gebunden. Die beste Bindung von DNA an die Silicapartikel wird bei einem pH-Wert unter 7,5 erreicht. Um pH-Wert Veränderungen nach Lösung der Agarose visuell verfolgen zu können, enthält die QX1 Lösung einen pH-Indikator, der im suboptimalen pH-Bereich über 7,5 eine Verfärbung von gelb zu orange bis violett anzeigt. Die Senkung des pH-Wertes erfolgt in diesem Fall mit einigen Tropfen 3 M Natriumacetat (pH 5,0). Die reversible Bindung der DNA erfolgt bei einer Temperatur von 56°C für 10 Min. unter regelmäßigem Mischen. Nach Zentrifugation für 30 Sek. bei 13000 UpM wird der Überstand verworfen und das Silicapellet in 500 µl QX1 Lösung suspendiert. Es folgt eine Zentrifugation für 30 Sek. bei 13000 UpM und das Verwerfen des Überstandes. Das Pellet wird dann zweimal in PE Puffer gelöst und abzentrifugiert bevor es nach vollständiger Abnahme des Überstandes getrocknet wird. Durch Zugabe von 15-20 µl Tris-Cl (pH 8,5) und einer Inkubation des gelösten Pellets für 5 Min. bei Raumtemperatur (Fragmentlängen von unter 4 kb) oder bei 56°C (über 4 kb) wird die DNA von den Silicapartikeln eluiert. Durch eine Zentrifugation für 30 Sek. bei 13000 UpM werden Silicapartikel von den im Überstand gelösten DNA-Fragmenten getrennt.

Der Überstand wird abgenommen und direkt in Ligationsreaktionen (siehe 2.2.10.8) eingesetzt. Die Zusammensetzung der gelieferten Puffer und Lösungen wird vom Hersteller nicht angegeben.

2.2.10.7 Qiaquick® PCR Purification Kit

Die Reinigung von PCR-Reaktionsansätzen wird mit dem Qiaquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Zentrifugationen werden mit der Eppendorf MiniSpin Tischzentrifuge durchgeführt. Hierbei wird die in der PCR-Reaktion amplifizierte DNA an eine Silicamembran gebunden und in einem Waschschrift von Oligonukleotiden, Puffern und Enzymen aus dem Reaktionsansatz gereinigt. Der PCR-Reaktionsansatz wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit dem 5-fachen Volumen an PB Puffer vermischt. Das Gemisch wird auf eine Silicamembran in einer Qiaquick Spinsäule überführt und für 60 Sek. bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule mit 750 µl PE Puffer für 60 Sek. bei 13000 UpM gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 60 Sek. bei 13000 UpM wird die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Eluierung der an die Säulenmembran gebundenen DNA erfolgt durch Zugabe von 50 µl EB Puffer. Nach einer Inkubation für 60 Sek. bei Raumtemperatur folgt eine Zentrifugation von 60 Sek. bei 13000 UpM. Die DNA liegt nun im Durchfluss vor.

2.2.10.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Ligation können DNA-Fragmente (Insert) und Vektoren, wenn sie nach einer Restriktionsspaltung komplementäre Enden besitzen (siehe 2.2.10.1), verbunden werden. Das eingesetzte Enzym, die T4-DNA-Ligase, katalysiert dabei unter ATP-Hydrolyse Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden von DNA-Fragmenten. Für einen 20 µl Ligationsansatz werden Vektor-DNA und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 mit 0,5 U T4-DNA-Ligase und 1x T4-DNA-Ligasepuffer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz kann direkt für die Transformation von *E. coli* verwendet (siehe 2.2.10.9) werden.

10x T4-DNA-Ligasepuffer

- o 400 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- o 100 mM MgCl₂
- o 100 mM DTT
- o 5 mM ATP

Puffer wird mit T4-DNA-Ligase geliefert.

2.2.10.9 Transformation von *E.coli*

Für eine Vermehrung von Plasmid-DNA werden *E. coli* Bakterienzellen transformiert. Im Gegensatz zu einigen Gram-positiven Bakterien besitzt das Gram-negative Bakterium *E. coli* keinen Zyklus, in dem es natürlicherweise in der Lage ist Fremd-DNA aufzunehmen. Daher werden *E. coli*-Zellen nach einer modifizierten Calciumchlorid/Rubidiumchlorid Methode von Hanahan (1983) für die Aufnahme der Plasmid-DNA kompetent gemacht. Für die Transformation werden zwei verschiedene *E. coli*-Stämme (siehe 2.1.2) verwendet, die sich in ihrer Fähigkeit zur Expression von sequenzspezifischen DNA-Methylasen unterscheiden. Wenn aus *E. coli* extrahierte Plasmid-DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen gespalten werden soll, wird der *E. coli* Stamm JM110 in der Transformation verwendet. Bei diesem Stamm ist die sequenzspezifische endogene Adenosin Methylierung (*dam*, bei G^mATC Sequenzen) und die Cytosin Methylierung (*dcm*, bei C^mC(A/T)GG Sequenzen) unterbunden. Für eine Standardtransformation wird der *E. coli* Stamm NM522 genutzt, da er im Gegensatz zu JM110 eine geringere Rekombinationsfrequenz zeigt und eine höhere Plasmid-DNA Ausbeute ermöglicht. Beide Bakterienstämme werden nach der gleichen Methode für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent gemacht.

Für die Transformation wird aus Dauerkulturen 10-20 µl Bakteriensuspension in 30 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 180 UpM in einem Erlenmeyerkolben geschüttelt. Von dieser Starterkultur werden am nächsten Morgen 200 µl abgenommen und in einen 2 l Erlenmeyerkolben mit 30 ml SOB und 300 µl Magnesiumlösung überführt. Nach einer Inkubation bei 37°C und 180 UpM erreichen die Bakterienzellen nach 2-2,5 Stunden eine OD_{550nm} von 0,5-0,6. Haben die Bakterienzellen diese Wachstumsphase erreicht, wird ihre Vermehrung durch Inkubation des Erlenmeyerkolbens für 10 Min. auf Eis gestoppt. Die Bakteriensuspension wird anschließend für 12 Min. bei 4°C und 226 g (1130 UpM, Sigma 4K15, Ausschwingrotor 11140) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml Transformationspuffer (TFB) vorsichtig resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 Min. auf Eis folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 12 Min. bei 4°C. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 4 ml TFB konzentriert und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation werden 140 µl DND der Bakteriensuspension zugegeben und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Die Gabe von 140 µl DND und die Inkubation auf Eis wird wiederholt, bevor die Bakterienzellen kompetent für die Aufnahme der Plasmid-DNA sind.

Zu jedem Ligationsansatz (siehe 2.2.10.8) werden 200 µl kompetente Zellen gegeben und die Ansätze für 30 Min. auf Eis inkubiert. Als Transformationskontrolle werden 10

µg eines pBluescript II Vektors ebenfalls mit 200 µl kompetenten Zellen inkubiert. Während der Inkubationszeit lagert sich die Plasmid-DNA an die Bakterienzellwände an. Die Aufnahme der Fremd-DNA erfolgt durch Hitzeinduktion für 1,5 Min. bei 42°C. Die Transformationsansätze werden sofort nach dem Hitzeschritt für 2 Min. auf Eis inkubiert, bevor 800 µl SOC zugegeben werden. Für die Ausbildung einer durch die Fremd-DNA neu erworbenen Resistenz werden die Transformationsansätze für 1 Std. bei 37°C und 180 UpM zur Vermehrung inkubiert. Die Selektion von transformierten Bakterienzellen (siehe 2.2.11) erfolgt auf antibiotikahaltigem Selektionsmedium. Die Transformationskontrolle wird in drei Verdünnungsstufen (10^{-2} – 10^{-4}) auf LB-AP ausplattiert. Die verwendeten Medien sind in Kapitel 2.1.8.2 aufgeführt. Der Nachweis von rekombinanter Plasmid-DNA in transformierten Bakterienzellen erfolgt nach Selektion und Plasmid-DNA Extraktion (siehe 2.2.11 und 2.2.12) durch Restriktionsverdau (siehe 2.2.10.1).

Magnesiumlösung

- o 1 M MgCl₂
- o 1 M MgSO₄

Transformationspuffer (TFB)

- o 0,1 M RbCl
 - o 45 mM MnCl₂
 - o 10 mM CaCl₂
 - o 10 mM MES (pH 6,3, 10 M KOH)
 - o 3 mM HaCOCl₃
- pH 6,2, steril filtrieren.

DND

- o 153 mg/ml DTT
- o 90% DMSO
- o 1% KAc (1 M)

pH-Wert auf 7,5.

2.2.10.10 Transformation von *A. tumefaciens* durch Elektroporation

Im Gegensatz zur Transformation von *E. coli* (siehe 2.2.10.9) erfolgt das Einschleusen von Fremd-DNA bei *A. tumefaciens* nicht durch einen Hitzeschritt sondern durch Elektroporation. Dabei werden durch einen elektrischen Impuls Poren in der Bakterienmembran kurzzeitig geöffnet und Fremd-DNA kann in die Zelle gelangen. Wie bei *E. coli* müssen *A. tumefaciens*-Zellen für die Aufnahme von Fremd-DNA kompetent gemacht werden. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten *A. tumefaciens*-Stämme

LBA4404 und ATHV (siehe 2.1.2) werden in gleicher Weise behandelt, wobei die Anzuchtzeiten für ATHV im Vergleich zu LBA4404 kürzer als im Protokoll angegeben sein können.

Für die Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* Zellen werden aus Dauerkulturen (siehe 2.2.15) Bakterienzellen auf LB-Str (LBA4404) oder LB-Kn-Rif (ATHV) ausgestrichen und bei 28°C für 48 Stunden inkubiert. Es werden 5 Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in 20 ml flüssiges LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt. Alle LB-Flüssigmedien, in denen *A. tumefaciens* Zellen für eine DNA-Aufnahme kompetent gemacht werden, enthalten geringere NaCl-Konzentration (5 g/l) als in Standard-LB-Medien (siehe 2.1.8.2). Höhere Salzkonzentrationen können später bei der Elektroporation zu Blitzentladungen führen, die die Transformationsrate negativ beeinflussen können. Die Kultur wird bei 28°C und 250 UpM über Nacht inkubiert. 10 ml dieser Starterkultur werden am nächsten Tag in einen 2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt. Es folgt eine Inkubation bei 28°C und 250 UpM bis die Bakterienzellen nach 3-4 Std. zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 herangewachsen sind. Das Bakterienwachstum wird durch Inkubation des Erlenmeyerkolbens für 20 Min. auf Eis unterbunden. Die Bakteriensuspension wird gleichmäßig in zwei eisgekühlte Sorvall-Zentrifugenbecher (Volumen 200 ml) überführt und bei 4000xg und 4°C für 15 Min. zentrifugiert (Sorvall RC5B, Rotor SLA-1500, ~ 6000 UpM). Der Überstand wird verworfen und das Pellet im Zentrifugenbecher auf Eis in 100 ml eiskalter 1 mM HEPES-Lösung vorsichtig resuspendiert. Es folgt ein erneuter Zentrifugationsschritt mit anschließendem Waschen des Pellets in 100 ml eiskalter 0,1 mM HEPES-Lösung. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Bakterienpellet in 10 ml kaltem 10%igem Glycerin suspendiert und in sterile 30 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 4000xg bei 4°C für 15 Min. (Sorvall RC5B, Rotor SS-34) wird der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml kalter Glycerin-Lösung (10%ig) konzentriert. Von dieser Bakteriensuspension werden 40 µl Aliquots in eisgekühlte 1,5 ml Eppendorfgeläße überführt und sofort für eine Transformation mittels Elektroporation verwendet oder für eine Lagerung bei -80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die Elektroporation werden 40 µl kompetente *A. tumefaciens* Zellen auf Eis mit 3 µl Plasmid-DNA gemischt und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Die Bakterien-DNA-Mischung wird dann in gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvetten blasenfrei überführt und nach Trocknung der Küvettenkontakte in den Elektroporator eingesetzt. Die Elektroporation erfolgt bei angelegten 1500 V, 25 mA und 25 W und folgenden Geräteeinstellungen: Capacitance 50 µF, Resistance 150 W und Set Volts 2,5 kV.

Sofort nach der Elektroporation wird die Küvette entnommen und 1 ml kaltes SOC (siehe 2.1.8.2) zugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abnehmen mit einer Pasteurpipette in der Küvette verteilt. Die Suspension wird mit der Pasteurpipette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 3-4 Stunden bei 28°C und 250 UpM zur Ausbildung der durch die Fremd-DNA erworbenen Resistenz inkubiert. Die Selektion von transformierten Bakterienzellen (siehe 2.2.11) erfolgt auf antibiotikahaltigem Selektionsmedium. Die verwendeten Medien sind in Kapitel 2.1.8.2 aufgeführt. Der Nachweis von rekombinanter Plasmid-DNA in transformierten Bakterienzellen erfolgt nach Selektion und Plasmid-DNA-Extraktion (siehe 2.2.11 und 2.2.12) durch Restriktionsverdau (siehe 2.2.10.1).

HEPES-Lösung

o 1 mM HEPES
in H₂O_{dest}, pH-Wert auf 7,0 einstellen
(KOH), autoklavieren, bei 4°C lagern.

10%ige Glycerin-Lösung

o 10 ml Glycerin (99,5%)
H₂O_{bidest} ad 100 ml, autoklavieren, bei
4°C lagern.

2.2.11 Selektion transformierter Bakterienzellen

Die Selektion von erfolgreich transformierten Bakterienzellen erfolgt über eine durch die aufgenommene Plasmid-DNA erworbene Antibiotikaresistenz. Zusätzlich zu einer Selektion über Antibiotikaresistenzen kann bei einigen Vektoren bei Vorliegen eines modifizierten *lacZ*-Gens mit *multiple cloning site* (Polylinker; Region im Vektor, in der viele Restriktionsschnittstellen vorliegen, die in der Vektorsequenz nur einmal vorkommen) die erfolgreiche Insertion eines Fragmentes in den Vektor überprüft werden.

Für die Ausbildung einer durch Transformation erworbenen Antibiotikaresistenz werden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.10.9 und 2.2.10.10 beschrieben, für einige Zeit ohne den Selektionsmarker inkubiert. Bei der nachfolgenden Inkubation auf antibiotikahaltigem Medium (siehe 2.1.8.2) können sich nur Zellen vermehren, die entsprechende Resistenzen ausbilden. Der Resistenzmechanismus kann dabei zum einen durch Modifikation des Antibiotikums selbst, durch aktiven Transport des Antibiotikums aus der Zelle über Membran-Efflux-Pumpen oder auch durch mutationsbedingte Modifikationen der Zielmoleküle wirken.

Ein in vielen Plasmid-Vektoren integriertes Resistenzgen ist das *amp^R*-Gen. Es kodiert für das Enzym β -Lactamase, das durch Spaltung des β -Lactamringes das Antibiotikum Ampicillin (Aminobenzylpenicillin, halbsynthetisches Penicillinderivat) inaktiviert und

somit *amp^R*-Gen exprimierenden Bakterienzellen die Vermehrung auf ampicillinhaltigem Medium ermöglicht. Ein weiteres zur Selektion eingesetztes Resistenzgen ist das aus dem Transposon Tn5 stammende *nptII*-Gen, welches für eine Neomycin-Phosphotransferase kodiert. Dieses Enzym inaktiviert Aminoglycosid-Antibiotika wie Kanamycin und Neomycin durch ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxyl-Gruppe des Aminohexose-Rings. Die Inaktivierung des Antibiotikums Streptomycin erfolgt durch eine Adenyltransferase, die durch das *aadA*(Strep^R)-Gen aus dem Plasmid R538-1 von *E. coli* kodiert wird, welche die 3'-Hydroxyl-Gruppe des N-Methylglucosamin-Rings modifiziert. Der Resistenzmechanismus gegen Rifampicin wirkt durch eine Reihe von Punktmutationen im *rpoB*-Gen, was zu einer veränderten β -Untereinheit einer RNA-Polymerase führt an die Rifampicin nicht mehr binden kann. Die Selektion von rekombinanten Plasmid-Vektoren mit integriertem *lacZ*-Genabschnitt und Polylinker erfolgt über den Mechanismus der α -Komplementation. Das Plasmid enthält neben regulatorischen Regionen den funktionellen N-terminalen Bereich des *lacZ*-Gens (α -Peptid). In dem Bakterienstamm NM522 wird aufgrund einer Deletion im N-terminalen Bereich des *lacZ*-Gens kein funktionelles Protein gebildet. Dieses mutierte Protein wird als β -Peptid bezeichnet. In einer transformierten Bakterienzelle können nun α - und β -Peptide gebildet werden und sich zu einem enzymatisch wirkenden Komplex mit β -Galaktosidaseaktivität komplementieren. Nach Induktion des *lac*-Operon durch IPTG setzt die gebildete β -Galaktosidase eine chromofore Gruppe am Substrat X-Gal frei, was zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonie führt. Ist das zu klonierende DNA-Fragment in den Polylinker, der in den Leserahmen des N-terminalen *lacZ*-Gens so integriert ist, dass die enzymatische Aktivität nicht beeinflusst wird, inseriert worden, kann kein α -Peptid mehr gebildet werden. Die Umsetzung des Substrates X-Gal kann nicht stattfinden und die Bakterienkolonie bleibt weiß. Für eine Selektion werden 100 μ l der Bakteriensuspension aus den unter 2.2.10.9 und 2.2.10.10 beschriebenen Transformationsmethoden oder ein Aliquot aus Dauerkulturen auf dem entsprechenden antibiotikahaltigen Medium ausplattiert. Die Selektion auf Agarplatten erfolgt über Nacht bei 37°C (*E. coli*) oder für 24-48 Stunden bei 28°C (*A. tumefaciens*).

2.2.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wird nach einer modifizierten Methode nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Hierbei erfolgt die Trennung von zirkulärer Plasmid-DNA von genomischer DNA und Proteinen durch eine alkalische Lysis der Bakterienzelle durch SDS. Durch Behandlung von

Bakterienzellwänden mit SDS als anionisches Detergens bei hohem pH-Wert bricht die Zellwand auf und Proteine und chromosomale DNA denaturieren. Bei diesem hohen pH-Wert werden die DNA-Basenpaarungen aufgehoben. Bei der zirkulär geschlossener Plasmid-DNA trennen sich die Einzelstränge allerdings aufgrund einer topologischen Überdrehung der Plasmid-DNA nicht voneinander; sie können sich bei sinkendem pH-Wert wieder aneinander anlagern. Die denaturierten Zellbestandteile können durch Zentrifugation von der zirkulären Plasmid-DNA im Überstand getrennt und die Plasmid-DNA anschließend präzipitiert werden. Die nachfolgend beschriebene Extraktionsmethode ist für eine Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* optimiert. Der Nachweis von erfolgreich transformierten *A. tumefaciens*-Zellen ist nach gleichem Protokoll möglich. Das Bakterienpellet wird jedoch vor Verwendung von Lösung A einmal in 1 ml 2 M NaCl Lösung aufgenommen, für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und wieder durch Zentrifugation für 2 Min. bei 13000 UpM pelletiert. Alle Zentrifugationen werden mit der Eppendorf MiniSpin Tischzentrifuge durchgeführt.

Für eine Isolierung von Plasmid-DNA werden Einzelkolonien in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und für 6 Std. bei 37°C und 180 UpM inkubiert (bei *A. tumefaciens* über Nacht bei 28°C und 250 UpM). Nach erfolgter Inkubation werden 2 ml der Bakteriensuspension durch Zentrifugation für 2 Min. bei 13000 UpM pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 200 µl Lösung A vollständig resuspendiert und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Lösung B wird die Lösung gemischt und anschließend nach Zugabe von 300 µl Lösung C für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Es folgen zwei Zentrifugationsschritte für jeweils 10 Min. bei Raumtemperatur mit Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird 600 µl eiskaltes Isopropanol zugegeben, vorsichtig gemischt und für 10 Min. bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das entstandene Pellet in 200 µl Lösung D gelöst. Nach Zugabe von 400 µl eiskaltem EtOH_{abs} wird die Plasmid-DNA durch Zentrifugation für 10 Min. bei 13000 UpM pelletiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das DNA-Pellet im Vakuumkonzentrator getrocknet. Das Pellet wird in 80 µl TE/RNase-Lösung aufgenommen. Die Lysate werden nach einer Inkubation für 5 Min. in der TE/RNase-Lösung sofort durch Restriktionsverdau (siehe 2.2.10.1) analysiert oder können bei -20°C gelagert werden.

Lösung A

- o 15 mM Tris-Base (pH 8,0)
- o 10 mM EDTA
- o 50 mM Glucose

Lösung B

- o 0,2 M NaOH
- o 1 % SDS

Lösung C

- o 3 M NaAc (pH 4,8)

Lösung D

- o 0,1 M NaAc (pH 7,0)
- o 0,05 M Tris-base (pH 8,0)

TE/RNase

- o 10 µg RNase/ml TE 10/0,1

2 M NaCl

in H₂O_{bidest.}

2.2.13 Qiaprep[®] Miniprep Kit

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgt neben der in Kapitel 2.2.12 beschriebenen Methode auch durch das Qiaprep[®] Miniprep Kit der Firma Qiagen. Bei dieser Methode bindet Plasmid-DNA in hoch konzentrierter chaotropischer Salzlösung an eine Silicamembran in einer Minispinsäule, während Proteine, RNA und andere Verunreinigungen in Lösung gehalten werden. Durch Wasch- und Zentrifugationsschritte mit verschiedenen Lösungen wird die gebundene Plasmid-DNA gereinigt bevor sie bei einem pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5 in gering konzentrierter Salzlösung oder Wasser von der Membran gelöst wird. Das Miniprep Kit beinhaltet Reagenzien die für eine Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen durch alkalische Lysis nach Birnboim und Doly (1979) oder auch für die nachträgliche Reinigung von Plasmid-DNA, die durch andere Extraktionsmethoden gewonnen wurden (siehe 2.2.12), benötigt werden. Alle Zentrifugationen werden mit der Eppendorf MiniSpin Tischzentrifuge durchgeführt.

Die Bakterienzellen werden, wie in Kapitel 2.2.12 beschrieben, angezogen und abzentrifugiert bevor das Bakterienpellet in 250 µl P1 vollständig gelöst wird. Für die Lysis werden 250 µl P2 zugegeben und gemischt bis die Lösung klar ist. Nach Zugabe von 350 µl N3 folgt eine Zentrifugation von 10 Min. bei 13000 UpM, um die denaturierten Bestandteile aus der Lösung zu entfernen. Der Überstand wird in eine Minispin-Säule überführt und durch Zentrifugation für 60 Sek. durch die Membran geleitet. Zur Reinigung der an der Membran gebundenen Plasmid-DNA von Nukleasen werden 500 µl PB zugegeben und die Säule für 30 Sek. zentrifugiert. Nach Zugabe von 750 µl PE folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt von 30 Sek.. Das Entfernen von

Resten des Waschpuffers aus der Membran wird durch eine einminütige Zentrifugation erreicht. Die Säule wird dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Membran zur Lösung der Plasmid-DNA mit 50 µl EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation für 1 Min. liegt die gereinigte Plasmid-DNA im abzentrifugierten EB vor. Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA, die aus der unter 2.2.12 beschriebenen Methode gewonnen wurde, wird die Probe mit dem 5-fachen Volumen an PB gemischt und auf eine Miniprep-Säule gegeben. Die Probe wird ab der Zugabe von PB bis zur Elution der Plasmid-DNA behandelt wie oben beschrieben.

2.2.14 Auftragssequenzierung von Plasmid-DNA

Für eine erfolgreiche Sequenzierung ist die Reinheit der DNA-Probe von großer Wichtigkeit. Durch Kontamination der zu sequenzierenden Probe mit Salzen, Proteinen, Oligonukleotiden oder dNTPs werden die Sequenzierergebnisse negativ beeinflusst. Insbesondere bei der Verwendung von automatischen Sequenziermaschinen können Verunreinigungen der DNA-Probe zu Problemen bei der Beladung der Kapillare mit DNA führen. Für die Reinigung von Plasmid-DNA wird das kommerziell erhältliche Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit (siehe 2.2.13) verwendet.

Für die Auftragssequenzierung wird nach visueller Abschätzung der DNA-Menge bei der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.10.5) 1-4 µl Plasmid-DNA Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Sequenzierung wird von der MWG-Biotech AG durchgeführt. Für Sequenzierungen von DNA-Fragmenten bis zu 1000 bp, die in einem Polylinker eines Vektors mit dem N-terminalen Bereich des *lacZ*-Gens inseriert sind (siehe 2.2.11), können die von MWG-Biotech zur Verfügung gestellten universellen Standardsequenzier-Primer M13uni und M13rev verwendet werden. Die für die Sequenzierung von längeren DNA-Fragmenten erforderlichen spezifischen Primer werden über das internetgestützte Primerauswahlprogramm Webprimer (Dolinski *et al.*, 2003) selektiert. Hierbei müssen die von MWG-Biotech angegebenen Spezifikationen für Sequenzier-Primer, wie eine optimale Primerlänge von 20-24 bp, ein GC-Gehalt von 40-60%, eine Schmelztemperatur von 55°C-75°C und eine möglichst geringe Fähigkeit zur Selbsthybridisierung, beachtet werden. Die spezifischen Primer, die für die vollständige Sequenzierung der *full-length* Klone verwendet werden, sind so ausgewählt, dass sich sequenzierte Teilabschnitte an ihren 5'- und 3'-Enden überschneiden. Die Sequenzierung eines Teilabschnittes mittels *Value Read* (MWG-Biotech) liefert eine deutlich zuordnungsfähige Sequenzinformation von durchschnittlich 500 nt. Um eine Überschneidung der sequenzierten Teilabschnitte zu erreichen, wird alle 400-500 nt ein neuer spezifischer Sequenzierprimer ausgewählt. Alle Sequenzinformationen

werden unter Verwendung der jeweiligen Chromatogramme überprüft und gegebenenfalls manuell nachbearbeitet.

2.2.15 Herstellung von Dauerkulturen

Für die Lagerung von Bakterienzellen wird die Bakteriensuspension mit Glycerin vermischt, um eine Lagerung der Bakterien bei -20°C als Dauerkultur für mehrere Jahre zu ermöglichen. Für die Lagerung von *E. coli*-Bakterienzellen werden 500 μl der Bakteriensuspension mit 675 μl sterilem 87%igem Glycerin gut vermischt. Die Herstellung von *A. tumefaciens* Dauerkulturen erfolgt durch Zugabe von 150 μl 87%igem Glycerin auf 850 μl Bakteriensuspension.

2.2.16 Herstellung viraler *full-length* Klone

Der Aufbau von viralen *full-length* cDNA Klonen von Viren mit einem RNA-Genom, die für Infektionsuntersuchungen in Pflanzen hergestellt werden, beinhaltet zwei wesentliche Komponenten: das virale Genom als cDNA und einen stromaufwärts liegenden Promotor für die Einleitung der Transkription. Wenn der Klon mittels Agroinfektion (siehe 2.2.19) auf Pflanzen übertragen wird, muss die gesamte Expressionskassette als Transfer-DNA (T-DNA) in einen binären Vektor mit linker und rechter Bordersequenz integriert werden.

Zur Einleitung der Transkription in Pflanzen wird ein verdoppelter *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S-RNA Promotor eingesetzt. Die Duplikation der Promotorsequenz kann eine verbesserte Transkriptionseffizienz bewirken. Die Verwendung des CaMV 35S-Promotors bietet den Vorteil, dass er in den meisten Zelltypen, unter anderem auch in vaskulären Zellen, von dikotylen Pflanzen exprimiert wird. Der einer viralen cDNA vorgeschaltete Transkriptionspromotor dient einer pflanzeigenen RNA-Polymerase als Initialisierungspunkt für die Synthese eines viralen RNA-Transkripts. Die Eliminierung von 3'-terminalen nicht viralen Sequenzen im primären Transkript wird durch ein der viralen cDNA nachgeschaltetes Ribozym erreicht. Die Integration der viralen cDNA unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und eines Ribozyms ermöglicht somit die exakte Synthese von viraler *full-length* RNA. Die virale cDNA wird, wie unter 2.2.7 und 2.2.8 beschrieben, nach reverser Transkription von sinnpositiver viraler RNA und nachfolgender PCR erzeugt. Hierbei wird das virale Genom durch Wahl der Primer in Segmente geteilt, die nach Zwischenklonierung in Subklone zur Erzeugung des *full-length* Klon unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen wieder zusammengeführt werden. Die Herstellung von Subklonen erhöht zum einen den Amplifikationserfolg während der PCR durch verringerte Fragmentlängen und den

Wegfall von zeitaufwendigen PCR Optimierungen für die Amplifikation von sehr langen Fragmenten.

Für die Synthese der cDNA dient eine Population von viralen RNA Molekülen als Grundlage. Da virale RNA-Polymerasen keine Möglichkeit zur Korrektur von Fehlinsertionen haben, zeigen sie bei der Replikation eine Fehlerrate von bis zu einer falsch eingebauten Base pro 1000 Basen. Dies führt in einer viralen Population, auch innerhalb einer Pflanze, zu RNA-Molekülen die sich, wenn auch nur minimal, von der Grundmatrize unterscheiden (*quasispecies*-Natur von RNA-Viren; Domingo, 2003). Eine Änderung der viralen Grundmatrize durch solche Fehlinsertionen kann z.B. durch Verschiebung des Leserahmens oder Einfügen eines Transkriptionsstops zu nicht-infektiöser RNA führen. Es ist davon auszugehen, dass nach Extraktion viraler RNA und reverser Transkription zur Herstellung von cDNA eine Population aus Fragmenten vorliegt, die sich in ihrer Sequenz minimal unterscheiden. Durch die Verwendung einer DNA-Polymerase mit *proof-reading* Aktivität (siehe 2.2.8) sollen additive Fehler in der nachfolgenden PCR-Reaktion verhindert werden. Da eine nachträgliche Eliminierung von Sequenzfehlern bei der Herstellung infektiöser *full-length* Klone sehr zeitaufwändig ist, wird durch Erhöhung der Anzahl von selektierten Einzelklonen nach der Ligation von PCR-Fragmenten in Plasmid-Vektoren versucht, die Wahrscheinlichkeit einer Selektion von Fragmenten ohne Fehlinsertionen oder Deletionen zu erhöhen. Solche Subklon-Populationen bestehen aus einer Mischung von durchschnittlich 10 Einzellysaten, die erstmals nach Klonierung des PCR-Fragmentes in einen Plasmid-Vektor selektiert werden. Nach allen weiteren Klonierungsschritten werden ebenfalls Populationen von Lysaten gebildet und weiterverarbeitet, bis eine entsprechende Anzahl von *full-length* Klonen in einem binären Vektor selektiert werden können. Diese Klone werden dann in *A. tumefaciens*-Zellen überführt und auf ihre Infektiosität hin getestet.

2.2.17 Transformation von *N. benthamiana*

Für eine Pflanzentransformation wird die Agrobakterien-vermittelte Blattscheibentransformation nach einer veränderten Methode nach Horsch *et al.* (1985) durchgeführt. Hierbei nutzt man die Fähigkeit von *A. tumefaciens* unter bestimmten Voraussetzungen einen als Transfer-DNA (T-DNA) bezeichneten Abschnitt von einem Ti-Plasmid in das pflanzliche Genom zu übertragen. Die T-DNA wird über spezifische 25 bp lange Erkennungssequenzen, der sogenannten linken und rechten Bordersequenz, definiert. Zwischen diesen Begrenzungen kann eine beliebige DNA-Sequenz eingefügt und somit in das Pflanzengenom integriert werden.

Vor einer Mobilisierung der T-DNA findet eine Anlagerung von *A. tumefaciens* an die Pflanzenzelle statt. Die auf dem *Agrobacterium*-Chromosom lokalisierten Gene *chvA*, *chvB*, *pscA* und *att* steuern eine Erkennungsreaktion zwischen Bakterien- und Pflanzenzelle durch Bildung von bakteriellen Adhesinen. Mutationen in diesen an der Erkennung beteiligten Genen führen zu einer verringerten Virulenz gegenüber zahlreichen Pflanzenarten. Nach der Anlagerungs- und Erkennungsreaktion wird der Vorgang des T-DNA-Transfers von der Bakterien- zu der Pflanzenzelle durch eine Reihe von bakteriellen Virulenzgenen auf dem Ti-Plasmid (*virA-H* Genen) gesteuert. Deren optimale Expression findet bei niedrigem pH-Wert, einer Temperatur unter 28°C und der Anwesenheit von phenolischen Substanzen, wie sie bei Verletzung von Pflanzengewebe gebildet werden, statt (Alt-Mörbe *et al.*, 1988 & 1989). Bei Temperaturen über 29°C wird die Proteinstruktur des VirA verändert und VirA inaktiviert, wodurch keine Expression der *vir*-Genkette stattfindet (Jin *et al.*, 1993; Fullner & Nester, 1996). Das konstitutiv exprimierte *virA*-Gen produziert das in der inneren Membran des Bakteriums lokalisierte Protein (VirA), welches auf Pflanzenwundmetabolite oder phenolische Substanzen an seinem periplasmatischen "Sensorbereich" reagiert. Eine resultierende Autophosphorylierung von VirA führt zur Aktivierung durch Phosphorylierung des intrazellulären VirG Proteins. VirG ist der transkriptionelle Aktivator für alle anderen *vir*-Gene, inklusive des eigenen. Nach der Induktion der *vir*-Genexpression binden zwei Proteine des *virD* Operons (VirD1 und VirD2) an die linke und rechte Bordersequenz, wobei VirD2 den unteren Strang der Bordersequenz zwischen Basenpaar 3 und 4 sequenzspezifisch ablöst. VirD2 lagert sich dabei kovalent an das 5'-Ende des abgelösten DNA-Einzelstranges (T-DNA) an und gibt dem Komplex damit in nachfolgenden Transferschritten einen polaren Charakter. Es wird vermutet, dass die Ablösung der gesamten T-DNA nach einem ähnlichen System stattfindet wie bei dem Vorgang der bakteriellen Konjugation. Der T-DNA Transfer von der Bakterien- in die Pflanzenzelle wird von den elf Genen des *virB* Operons gesteuert. Alle elf Proteinprodukte (VirB1-11) sind essentiell an der Bildung eines pilusähnlichen Exportkomplexes zwischen Bakterienmembran und Pflanzenzelle beteiligt. Dieser Exportkomplex ist ein bakterielles Segregationssystem des Typs IV (T4SS), welches Virulenzfaktoren von Gram-negativen Bakterien in pflanzliche, tierische oder humane Wirtszellen einschleusen kann und damit Abwehrmechanismen des Wirtes modifizieren und/oder umgehen kann. Das an die T-DNA angelagerte VirD2-Molekül katalysiert vermutlich die Erkennungsreaktion für eine Passage durch diesen Komplex. Der T-DNA Komplex gelangt über das T4SS in das Zytoplasma der Pflanzenzelle, wo er vollständig mit VirE2 Proteinen umhüllt wird. VirE2 schützt dabei den T-DNA Komplex, insbesondere das 3'-Ende der T-DNA, vor Degradierung durch

pflanzliche Nukleasen im Zytoplasma. Der aktive Import von Proteinen in den eukaryotischen Zellkern benötigt spezifische *nuclear localization signals* (NLS). Die beiden Agrobakterien-Proteine VirD2 und VirE2 besitzen solche NLS-Funktionen, die von pflanzlichen Zellkernimport-Proteinen erkannt werden. Das mit Importin β komplexierte Importin α erkennt die NLS des VirD2 und leitet den Komplex an eine in der Zellkernmembran lokalisierte Kernpore, wo die Aufnahme des Komplexes über Importin β ermöglicht wird. Dagegen wird VirE2 durch das pflanzeneigene Protein VIP1 erkannt, welches als Adapter für die NLS-Erkennung durch Importin α fungiert. Nach der Passage durch die Kernporen werden Importin α und β durch das GTP-bindende Protein Ran vom T-DNA Komplex gelöst. Das pflanzeneigene Protein VIP2 assoziiert wie VIP1 mit VirE2 Molekülen des T-DNA Komplexes. Die VIP1 und VIP2 Proteine leiten den Komplex vermutlich zu transkriptionell aktiven Chromatinregionen im Zellkern. Der genaue Vorgang der Integration durch illegitime Rekombination in diesen Bereichen, bei dem sowohl *Agrobacterium* kodierte Proteine (wie VirD2 und VirE2) als auch pflanzliche Kernproteine und DNA-Ligasen eine wichtige Rolle spielen, ist noch nicht vollständig geklärt. Der bisherigen Annahme, dass die Integration durch Ligation des 5'-Endes des T-DNA Einzelstranges mit der pflanzlichen genomischen DNA gefolgt von der Zweitstrangsynthese durch DNA-Reparaturmechanismen stattfindet (Tinland *et al.*, 1995), steht ein neueres Modell gegenüber, das von einer Zweitstrangsynthese am T-DNA Strang vor der Integration in Doppelstrangbrüche der genomischen Pflanzen-DNA ausgeht (Chilton & Que, 2003; Tzfira *et al.*, 2003).

Für die Pflanzentransformation werden *A. tumefaciens*-Zellen mit einem rekombinanten binären Plasmidvektor pBIN_SN, der zwischen seinen Bordersequenzen den BMYV_{fl} als T-DNA integriert hat, elektroporiert. Dieser binäre Vektor repliziert sowohl in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens*. Der verwendete *A. tumefaciens*-Stamm ATHV besitzt, wie der Stamm LBA4404, ein Ti-Plasmid auf dem die für den T-DNA Transfer benötigten *vir*-Genen lokalisiert sind. Der binäre Plasmidvektor pBIN_SN besitzt zwischen der rechten und linken Bordersequenz ein *nptII*-Gen, das für eine Selektion erfolgreich transformierter Pflanzen verwendet wird. Da die gesamte T-DNA in das pflanzliche Genom integriert wird, enthalten transgene Zellen das *nptII*-Gen und den BMYV_{fl}.

Zur Transformation werden *in vitro* angezogene *N. benthamiana* Pflanzen verwendet. Hierfür werden *N. benthamiana*-Samen für 10 Min. in 1,3 %igem Natriumhypochlorid invertiert, zweimal in EtOH_{70%} und dreimal in H₂O_{bidest} gewaschen, bevor sie auf MS-Medium ausgelegt werden. Die Anzucht der Pflanzen erfolgt in einem Gewebekulturschrank bei 26°C und 16 Std. Licht (Osram Leuchtstofflampe L36 W/11,

Tageslicht Lumilux). Einige der jüngsten Blätter dieser Pflanzen werden von Blattmittelrippe und Blatträndern befreit und 10-15 Blattstücke von 0,25-0,5 cm² mit der Blattunterseite nach oben in 20 ml MS0 zusammen mit 200 µl einer *A. tumefaciens*-Suspension in einer Petrischale bei 26°C und Dunkelheit für 2 Tage inkubiert. Für die Herstellung der *A. tumefaciens*-Suspension wird eine BMV_{fi} rekombinante *A. tumefaciens*-Dauerkultur auf LB-Kn Medium fraktioniert ausgestrichen und für 48 Stunden bei 28°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wird mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und in 20 ml LB-Kn bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 herangezogen. Von dieser Suspension werden für die Inkubation mit den Blattscheiben 200 µl in eine Petrischale mit 20 ml MS0 überführt.

Während der Inkubation der Blattstücke mit den rekombinanten Agrobakterien wird durch phenolische Substanzen, die durch die Verwundung der Blattstücke freigesetzt werden, die *vir*-Gen Kette aktiviert. Der BMV_{fi} und der *nptII*-Selektionsmarker wird dabei als T-DNA in das Genom von Pflanzenzellen überführt. Die Blattstücke werden in einer Petrischale mit 20 ml Claforanlösung unter leichtem Schwenken gewaschen. Die Claforanlösung enthält antibiotisch wirkendes Cefotaxim-Natrium, welches eine weitere Vermehrung von Agrobakterien verhindern soll. Die Claforanlösung wird abgenommen und der Waschschrift viermal wiederholt. Die gewaschenen Blattstücke werden mit der Blattunterseite nach oben so auf T1-Medium gelegt, dass die Ränder der Blattstücke Kontakt zum Medium besitzen. Neben der Zuführung von Nährstoffen und Pflanzenhormonen für die Sprossregeneration können durch das im T1-Medium enthaltene Kanamycin Pflanzenzellen selektiert werden, in deren Genom das *nptII*-Gen und damit auch der BMV_{fi} integriert worden ist. Die Petrischalen werden mit Parafilm verschlossen und im Gewebekulturschrank inkubiert. Nach 4 bis 7 Tagen werden die Blattstücke auf neues T1-Medium überführt und für 3 bis 4 Wochen im Gewebekulturschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wachsen die ersten Sprosse aus undifferenziertem Kallusgewebe. Diese Sprosse werden möglichst ohne Kallusgewebe zur Streckung in Gewebekulturröhrchen mit T0-Medium überführt. Hier werden die Pflanzen im Gewebekulturschrank bis zur Bewurzelung herangezogen, bevor sie zum weiteren Wachstum in feuchte Erde getopft werden. Für das Topfen wird das T0-Medium vorsichtig mit warmen Wasser von den Wurzeln abgelöst und diese in 0,15% Previcur[®] N (Wirkstoff Propamocarb-Hydrochlorid, Bayer Crop Science) getaucht. Zur Adaption an das Gewächshausklima werden die getopften Pflanzen zum Verdunstungsschutz mit einer Plastiktüte umhüllt. Nach 3 Tagen kann die Plastiktüte an einer Ecke mit einer Schere geöffnet werden. Die Öffnung wird in den nachfolgenden Tagen weiter vergrößert bevor die Tüte ganz entfernt wird. Diese

Mutterpflanzen werden unter Gewächshausbedingungen (siehe 2.2.1) bis zur Samenreife herangezogen und beerntet.

2.2.17.1 Selektion von transgenen *N. benthamiana*

Eine erste Selektion von potentiell transgenen Pflanzen findet bereits während der Phase der Gewebekultur statt. Für eine Selektion von transgenen Pflanzen, die das *nptII*-Gen exprimieren, enthalten die Gewebekulturmedien stets Kanamycin. Der Nachweis der Integration und Expression des BMVYV_{fi} erfolgt durch Nukleinsäurenachweis oder über serologische Verfahren. Hierbei wird zum einen überprüft, ob das Transgen nach Nukleinsäure-Extraktion (2.2.6.1) mittels spezifischer Primer und PCR (2.2.8) nachgewiesen werden kann und zum anderen, ob das jeweilige Transgen exprimiert wird, d.h. das ein Genprodukt vorliegt. Für den serologischen Nachweis des Hüllproteins als ein Transgenprodukt werden DAS-ELISA (2.2.3.1) und TPIA (2.2.3.2) durchgeführt. Die transgenen Mutterpflanzen werden beerntet und die Nachkommen ebenfalls auf die Integration des Transgens überprüft. Neben den oben beschriebenen Nachweismethoden erfolgt bei den Nachkommen eine zusätzliche Selektion auf kanamycinhaltigem MS-Medium (400 mg Kn/l, 2.1.8.2). Die Samen werden oberflächensterilisiert (2.2.17) und auf dem Selektionsmedium gleichmäßig ausgelegt. Nach der Samenkeimung und der Ausbildung der Keimblätter können nach 2-3 Wochen transgene und nicht transgene Sämlinge anhand der Blattfärbung im Vergleich zu einer nicht transgenen Kontrolle (*N. benthamiana* 27/1) visuell unterschieden werden. Sämlinge die das *nptII*-Gen nicht exprimieren, zeigen starke Chlorosen, die die Blätter chlorophyllfrei erscheinen lassen und bilden keine Wurzeln im Medium aus. Die Keimblätter transgener Sämlinge bleiben dagegen kräftig grün, und das Wachstum ist nicht beeinträchtigt. Die Anzahl der Sämlinge beider Phänotypen wird bestimmt.

2.2.18 Southern-Blot und Hybridisierung pflanzlicher DNA

Die Detektion von Transgensequenzen im pflanzlichen Genom und die Bestimmung ihrer Kopienzahl wird nach Extraktion der Gesamt-DNA von *N. benthamiana* Pflanzen durch Southern-Blot (Southern, 1975) und Hybridisierung mit spezifischen DIG-markierten Sonden in Anlehnung an Sambrook & Russel (2001) durchgeführt. Zum Nachweis der Anzahl von Transgenkopien (T-DNA Kopien) wird die Gesamt-DNA mit einer Restriktionsendonuklease verdaut, die zwischen dem durch die DIG-PCR Sonde nachzuweisenden Sequenzbereich und der rechten bzw. linken Border des T-DNA Abschnittes keine Erkennungssequenz mehr besitzt.

2.2.18.1 Southern-Blot und Fixierung durch UV-crosslinking

Durch einen Southern-Transfer werden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nukleinsäure-Bindende Trägermembran überführt. Nach Gesamt-DNA Extraktion aus jungen Blättern von *N. benthamiana* Pflanzen durch das DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen) wird das gesamte Eluat (~100 µl, 20-25 µg DNA) mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* V (10U/µl) geschnitten. Hierfür wird zu den 100 µl in AE Puffer gelöster DNA 164 µl H₂O_{bidest}, 30 µl 10x RE Puffer Promega D und 6 µl *EcoR* V gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nachfolgenden Tag werden weitere 2 µl *EcoR* V zugegeben und der Ansatz für weitere 2 Std. bei 37°C inkubiert. Für die Ausfällung der DNA werden 200 µl des Restriktionsansatzes mit 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 3,5 Vol. EtOH_{abs} (-20°C) vermischt und für 20 Min. bei 4°C und 13000 UpM (Sigma 4K5, Rotor 12130H) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat mit 500 µl 70% EtOH für 5 Min. bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird im Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend in 30 µl TE 10/0,1 aufgenommen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt über Agarose-Gelelektrophorese (2.2.10.5) in einem 1%igem Agarosegel ohne Ethidiumbromid. Als Größenstandard werden 5 µl des DIG-markierten DNA-Längenstandards II (Roche) verwendet. Dieser Längenstandard zeigt acht Fragmente mit einer Größe von 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 und 125 bp. Nach Erreichen der maximalen Auftrennungsweite wird das Agarosegel mit einem Skalpell von den Geltaschen und nicht benötigten Gelbereichen befreit und für 10 Min. in 1 M HCl Lösung in einer flachen Schale geschwenkt. Anschließend wird das Gel zweimal mit H₂O_{bidest} gewaschen, zweimal für jeweils 15 Min. in Denaturierungspuffer und zweimal für je 15 Min. in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Nach kurzer Spülung mit 2x SSC Lösung kann das Gel in den Blot überführt werden. Im Blot wird die DNA aus dem Agarosegel mittels Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Qiabran, Qiagen) übertragen. Die im Blot verwendeten saugfähigen Papiere (Einmalhandtücher), Filterpapiere und die Membran müssen auf Gelgröße zugeschnitten werden. Der Blotaufbau beinhaltet (von unten nach oben): eine in 20x SSC getränkte 2 cm dicke Lage mit Whatmann Filterpapier auf die das zugeschnittene Gel überführt wird, auf das Gel wird eine in 2x SSC eingeweichte Hybridisierungsmembran blasenfrei gelegt, dann zwei Blatt mit 2x SSC behandeltem feuchtem Whatmann Filterpapier, ein Blatt trockenes Whatmann Filterpapier, eine ca. 5 cm dicke Schicht aus trockenem saugfähigen Papier und eine Glasscheibe mit aufliegendem Gewicht. Der Blot wird zur Verringerung der Verdunstung mit Haushaltsfolie abgedeckt. Der Transfer wird über Nacht bei Raumtemperatur

durchgeführt. Nach dem Abbau des Blot wird die Gelseite der Membran markiert und ohne die Membran trocknen zu lassen mit der Gelseite nach oben auf in 20x SSC getränktes Filterpapier gelegt. Für die Fixierung der DNA wird die Membran mit dem feuchten Filterpapier für 90 Sek. unter einen UV-crosslinker (302 nm) gelegt. Um ein Austrocknen zu vermeiden wird die Membran vor der Prähybridisierung kurz in 20x SSC abgelegt.

2.2.18.2 Herstellung einer DIG-PCR Sonde

Für die Detektion von spezifischen Sequenzbereichen des Transgens werden Digoxigenin-markierte PCR Sonden verwendet. Für die Herstellung der Sonden wird der PCR DIG Labeling Mix (Roche) verwendet. Der Mix enthält neben dATP, dGTP, dCTP (je 2 mM) und dTTP (1,9 mM) auch 0,1 mM Digoxigenin-11-dUTP (DIG-UTP) und wird anstelle des normalen Nukleotidgemisches zu einem PCR-Reaktionsansatz gegeben. Während der PCR-Reaktion wird neben dTTP in geringerem Umfang auch das DIG-UTP in das amplifizierte DNA-Fragment eingebaut. Das eingebaute Digoxigenin lässt sich über spezifische Antikörper nachweisen.

Für den Nachweis von Transgenen im pflanzlichen Genom wurden zwei verschiedene DIG-markierte Sonden hergestellt: eine Sonde die spezifisch einen CaMV 35S Promotor (DIG-35S) nachweist, und eine Sonde, die mit dem *npII*-Gen des pBIN19 (DIG-*npII*) hybridisieren kann. Hierzu wurden ein verdoppelter CaMV 35 Promotor und das *npII*-Gen jeweils in die MCS von Plasmidvektoren überführt in denen eine Amplifikation mit den universellen Standardprimern M13 R49 und M13 U43 möglich ist (siehe Anhang). Ein 100 µl PCR-Reaktionsansatz mit Verwendung des PCR DIG Labeling Mix ist nachfolgenden angegeben:

1,0 µl	Plasmid-DNA (1:10 verdünnt in H ₂ O _{bidest})
10 µl	10x PCR Puffer
10 µl	50 mM MgCl ₂
10 µl	PCR DIG Labeling Mix
1,5 µl	M13 R49
1,5 µl	M13 U43
1,0 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (~5 U)
65,0 µl	H ₂ O _{bidest}

Die PCR-Reaktion findet bei Standardbedingungen (2.2.8) mit fünf unspezifischen PCR-Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 37°C, einer anschließenden Erhöhung auf 53°C für 35 Zyklen und einer Amplifikationszeit von 1 Min. 30 Sek. statt.

Das amplifizierte Fragment wird in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft und mit dem Qiaquick® PCR Purification Kit (2.2.10.7) gereinigt. Die Eluierung der DIG-markierten Sonde von der Silicamembran erfolgt in zwei Zentrifugationsschritten mit jeweils 50 µl EB Puffer.

2.2.18.3 Prähybridisierung und Hybridisierung

Nach dem UV-crosslinking der DNA auf der Membran kann die Hybridisierung mit der hergestellten DIG-markierten PCR-Sonde erfolgen. Die Hybridisierung wird mit den Reagenzien des DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) durchgeführt. Für den Nachweis von DNA-Sequenzen auf der Membran wird die DIG-markierte Sonde mit der Zielsequenz hybridisiert. An die hybridisierte Sonde bindet dann ein mit Alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-DIG Antikörper. Die Alkalische Phosphatase setzt abschließend ein Chemilumineszenz-Substrat (CSDP) um, welches durch Abspaltung einer Phosphatgruppe Licht emittiert. Diese Reaktion kann auf lichtempfindlichen Röntgenfilmen nachgewiesen werden.

Für eine Prähybridisierung wird die Membran blasenfrei mit der Gelseite nach innen in eine Hybridisierungsflasche überführt. Nach Zugabe von 10 ml DIG Easy Hyb Puffer (42°C) wird die Hybridisierungsflasche bei 42°C im Hybridisierungssofen für 30 Min. unter Rotation inkubiert.

Für die Hybridisierung werden 15 µl der DIG-markierten Sonde für 5 Min. bei 100°C im Wasserbad denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die denaturierte Sonde wird zu 3 ml DIG Easy Hyb Puffer (42°C) gegeben und die Prähybridisierungslösung gegen dieses Gemisch ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgt unter gleichen Bedingungen wie die Prähybridisierung über Nacht. Die Hybridisierungslösung wird abgegossen und die Membran in der Hybridisierungsflasche zweimal für jeweils 5 Min. mit 2x SSC-SDS Lösung bei Raumtemperatur unter Rotation gewaschen. Anschließend folgen zwei Waschschrte unter Rotation für jeweils 15 Min. mit einer auf 65°C erwärmten 0,1x SSC-SDS Lösung bei 65°C im Hybridisierungssofen. Die Waschlösung wird anschließend abgegossen.

Die Blockierungs- und Antikörper-Lösungen werden nach der Vorschrift im Kit vorbereitet. Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte erfolgen unter Rotation auf einem Rolltisch bei Raumtemperatur. Für die Blockierung von freien Bindungsstellen werden nach den Waschschrten 30 ml der Blockierungs-Lösung auf die Membran in der Hybridisierungsflasche gegeben und für 30 Min. inkubiert. Anschließend erfolgt die Bindung des anti-Digoxigenin-AP Antikörpers an die hybridisierte DIG-markierte Sonde durch Inkubation der Membran für 30 Min. in der Antikörper-Lösung. Nach zweimaligem Waschen, um ungebundene Antikörper zu

entfernen, für je 15 Min. in 100 ml MT-Waschpuffer folgt die Inkubation der Membran für 5 Min. in 100 ml Detektionspuffer (pH 9,5). Die Membran wird blasenfrei auf eine zugeschnittene Klarsichtfolie gelegt und darauf gleichmäßig einige Tropfen des chemilumineszenten CSDP verteilt. Sofort danach wird die Membran mit einer zweiten Klarsichtfolie abgedeckt und überschüssiges CSDP-Substrat zu den Rändern hin kräftig ausgestrichen. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte finden in einer Dunkelkammer unter Rotlicht statt. Die umhüllte Membran wird mit der Gelseite nach oben in eine Filmkassette eingelegt und für die Autoradiographie mit einem Röntgenfilm bedeckt. Nach 2 Std. kann der Film entwickelt werden.

Denaturierungspuffer

- o 1,5 M NaCl
 - o 0,5 N NaOH
- in H₂O_{bidest}, autoklaviert.

Neutralisierungspuffer

- o 1 M Tris-HCl
 - o 3 M NaCl
- in H₂O_{bidest}, pH 5,5, autoklaviert.

20x SSC

- o 3 M NaCl
 - o 300 mM Natriumcitrat
- in H₂O_{bidest}, pH 7,0, autoklaviert.

Maleinsäurepuffer

- o 0,1 M Maleinsäure
 - o 0,15 M NaCl
- in H₂O_{bidest}, pH 7,5, autoklaviert.

MT-Waschpuffer

- o 0,3% Tween 20
- in Maleinsäurepuffer.

Detektionspuffer

- o 0,1 M Tris-base
 - o 0,1 M NaCl
- in H₂O_{bidest}, pH 9,5 (HCl).

2x SSC-SDS / 0,1x SSC-SDS

- o 0,1% SDS
- mit 20x SSC und H₂O_{bidest} herstellen.

2.2.19 Agroinfektion

Die Infektion verschiedener Testpflanzen mit den hergestellten *full-length*-Klonen erfolgt durch Agroinfektion (Grimsley *et al.*, 1986). Bei dieser Methode wird, wie bei der Pflanzentransformation (2.2.17) beschrieben, die Fähigkeit von *A. tumefaciens* genutzt, den als T-DNA integrierten *full-length* Klon in eine Pflanzenzelle zu übertragen. Eine erfolgreiche Virusinfektion kann dabei durch Integration der T-DNA in das Pflanzengenom und Expression des Transgens oder vor der Integration durch Bildung replikationsfähiger viraler Zwischenstufen etabliert werden. Die Induktion der *vir*-Genkette ist die Voraussetzung für einen erfolgreichen T-DNA Transfer. Eine Induktion wird bei Temperaturen unter 28°C, bei niedrigem pH-Wert und in Anwesenheit von phenolischen Substanzen, wie Acetosyringon, stimuliert (Stachel *et al.*, 1985; Alt-Mörbe *et al.*, 1988,1989). Für Agroinfektionen werden Versuchspflanzen im 4-8-Blattstadium verwendet. Die Applikation der Bakteriensuspension erfolgt auf voll ausgebildeten Blättern aus dem mittleren Stängelbereich.

Im Verlauf der Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden der Agroinfektion durchgeführt. Während die Herstellung der Inokulationssuspension bei beiden identisch ist, unterscheiden sich diese Methoden in der Art der Applikation der Bakteriensuspension auf die Versuchspflanzen.

2.2.19.1 Herstellung der Inokulationssuspension

Für eine Agroinfektion werden rekombinante Agrobakterien aus Dauerkulturen auf LB-Kn fraktioniert ausgestrichen und für 24 bis 48 Stunden bei 28°C inkubiert. Es werden fünf Einzelkolonien in 30 ml LB-Kn überführt und für 14 bis 16 Std. (OD_{600} von 1,0) bei 28°C und 250 UpM inkubiert. Von der Bakteriensuspension werden 2 ml in einem Eppendorfgefäß bei 13000 UpM für 1 Min. pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird vorsichtig in 2 ml Induktionspuffer gelöst und 3 bis 4 Std. bei Raumtemperatur unter gelegentlichem leichtem Schwenken zur Induktion der *vir*-Genkette inkubiert.

Inokulationspuffer

- o 10 mM MgCl₂
- o 10 mM MES
- o 100 µM Acetosyringon

in H₂O_{dest.}

2.2.19.2 Methode A: Agroinfektion mittels Blattverletzung

Bei dieser Inokulationsmethode werden die Blätter der Versuchspflanzen mit einem Skalpell verletzt und die Wundbereiche mit der Inokulationssuspension in Kontakt gebracht. Hierfür werden 5 ml der Inokulationssuspension in eine Petrischale pipettiert. Mit einem Skalpell werden Blätter aus dem mittleren Stängelbereich im rechten Winkel zur Blattmittelrippe halbiert und die gesamte Wundfläche für 5-10 Sek. in die Inokulationssuspension getaucht. Die Wundfläche wird anschließend mit Parafilm vor Verdunstung geschützt.

2.2.19.3 Methode B: Agroinfektion mittels Injektion

Die Inokulationssuspension wird mit einer 2 ml Einwegspritze ohne Nadel aufgenommen und in die Blattunterseite der Versuchspflanze injiziert. Dabei wird die Spritzenöffnung mit leichtem Druck an die Blattunterseite angelegt und mit einem Finger auf der gegenüberliegenden Blattoberseite stabilisiert. Durch langsames Senken des Spritzenkolbens können so große Blattflächen, vermutlich über Stomataöffnungen im Andruckbereich, mit der Bakteriensuspension infiltriert werden. Pro Versuchspflanze werden 2 ml Inokulationssuspension auf mindestens zwei Blätter verteilt. Für eine großflächige Infiltration werden Blätter aus dem mittleren Stängelbereich verwendet.

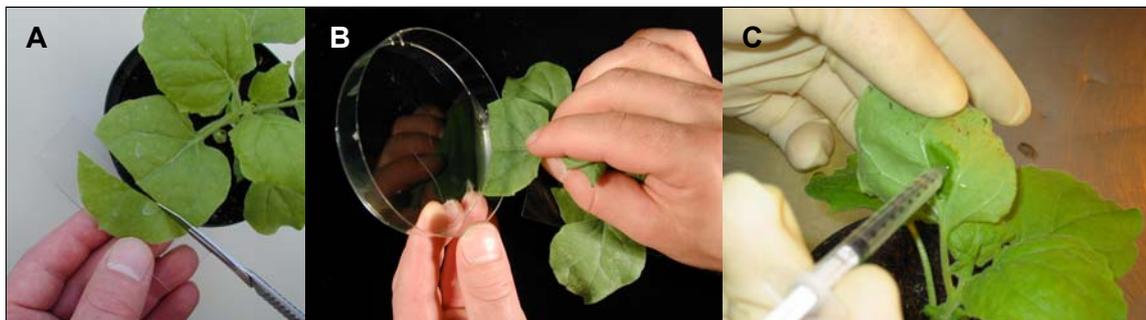


Abbildung 2.2: Methoden der Agroinfektion: Bei Methode A wird ein halbiertes Blatt (A) in die Inokulationssuspension getaucht (B). Durch Injektion der Inokulationssuspension wird bei Methode B die Infiltration von Blattgewebe erreicht (C).

2.2.20 Konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM)

Die mikroskopische Untersuchung von pflanzlichem Blattgewebe wird an einem Konfokalen Laser Scan Mikroskop (CLSM, TCS SP2 System, Leica) durchgeführt. Die

Untersuchung am CLSM erlaubt die Abbildung von Fluoreszenz- oder Reflexionslicht aus einer Ebene der Probe, wobei Licht aus anderen Ebenen von der Detektion ausgeschlossen ist. Durch einen Laser werden hierbei alle Punkte einer Ebene der Probe abgetastet, und das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv zurückgeleitet. Die einzelnen Bildpunkte werden an einem Detektor registriert und digital an einen Computer weitergeleitet. Durch entsprechende Software (Leica Confocal Software TCS SP2) wird aus den digitalen Signalen ein Bild generiert. Die Detektion von GFP-Fluoreszenz (510-515 nm) in pflanzlichen Geweben erfolgt nach Anregung durch einen Argonlaser (Laserlinie 488 nm; Laserleistung 15-20 %) und Verwendung eines Farbteilers (488/543). Die Eliminierung von pflanzlicher Autofluoreszenz (hauptsächlich über 620 nm) wird durch die Auswahl des korrekten Emissionsspektrums gewährleistet. Die Untersuchungen am CLSM und die Aufnahmen von GFP-Fluoreszenz in pflanzlichem Gewebe wurden in Zusammenarbeit mit Christof Dietrich (IPP, Hannover) durchgeführt.

2.2.21 Statistische Auswertungen

Ein Nachweis signifikanter Unterschiede bei den durch DAS-ELISA festgestellten BMVYV-Virustitern zwischen verschiedenen Varianten wird mit dem Softwareprogramm SPSS 11.0 durchgeführt. Hierbei werden aufgrund einer nicht vorliegenden Normalverteilung nichtparametrische Testverfahren für einen Vergleich innerhalb der Varianten (Wilcoxon-Test für paarige/verbundene Stichproben) und für einen Vergleich zwischen den Varianten (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney) durchgeführt. Für einen Vergleich von erwarteten Häufigkeiten mit festgestellten Häufigkeiten (Samenselektion auf kanamycinhaltigem Medium) wird der Chi-Quadrat-Homogenitätstest durchgeführt. Wenn Vergleiche zwischen mehreren Einzeltests durchgeführt werden erfolgt eine α -Adjustierung:

α -Adjustierung: $\alpha^* = \alpha/k$ (k = Anzahl der Einzelvergleiche)

d.h. bei einem Einzelvergleich $\alpha = 0,05$, bei zwei Einzelvergleichen $\alpha = 0,025$ und bei drei Einzelvergleichen $\alpha = 0,017$.

Die statistischen Auswertungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Seidel (Bioinformatik, Universität Hannover) durchgeführt.

2.2.21.1 Wilcoxon-Test für paarige/verbundene Stichproben

Dieser meist nur als Wilcoxon-Test bezeichnete Test ist das verteilungsfreie Analogon zum t-Test für paarige Stichproben. Es gelten dieselben Voraussetzungen wie beim U-

Test. Bei dem Wilcoxon-Test werden zuerst die Differenzen aus den Wertepaaren gebildet und mit Vorzeichen aufgelistet. Anschließend erstellt man eine Rangliste aus den Absolutwerten der Differenzen. Dann werden die Ränge addiert, die zu den Differenzen mit den selteneren Vorzeichen gehören; sind also z.B. die Minuszeichen weniger häufig als die Pluszeichen, werden die Ränge der Minusdifferenzen addiert. Schließlich werden wie beim U-Test die entsprechenden Formeln und Tabellen benötigt, um die Signifikanzen zu erhalten.

2.2.21.2 U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney

Der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney wird für einen statistischen Vergleich von unpaarigen/unverbundenen Stichproben angewandt. Die Werte aus beiden Stichprobengruppen werden zusammengeführt und eine Rangliste nach Absolutwerten aufgestellt. Allen Daten wird so eine Rangzahl zugeordnet. Nach Trennung der beiden Stichproben werden die Rangzahlen in jeder Gruppe addiert. Durch Einsatz in Formeln und Hinzuziehen von Tabellen ergibt sich die Signifikanz.

2.2.21.3 Chi-Quadrat-Test

Der Chi-Quadrat-Homogenitätstest zur Ermittlung von relativen Häufigkeiten wird verwendet, um erwartete Mendelsche Aufspaltungsverhältnisse in T₁- und T₂-Generationen mit den festgestellten Werten zu vergleichen. Um das gewählte α einhalten zu können ist die Anwendung der Yates-Korrektur angezeigt, da $n=1$ und damit $n < 20$.

$$\chi^2_{\text{Yates}} = \sum \frac{[|(Anzahl\ beobachtet - Anzahl\ erwartet)| - 1/2]^2}{Anzahl\ erwartet}$$

Die Hypothese wird abgelehnt, wenn $\chi^2_{\text{Yates}} > \chi^2_{df=1, 1-\alpha}$ gilt. Der kritische Wert für den Chi-Quadrat-Test ($df=1$) und $\alpha=0,05$ bei zweiseitigem Vergleich beträgt 3,841.

3 Ergebnisse

3.1 Blattlausübertragung von BMV und BChV mittels *Myzus persicae*

Ein Ziel dieser Arbeit war es, virale *full-length* Klone des BMV (BMV_{fl}) und des BChV (BChV_{fl}) zu erstellen und beide Klone molekular und biologisch zu charakterisieren. Für die Herstellung der BMV_{fl} und BChV_{fl} sollten Virusisolate verwendet werden, die seit einigen Jahren in einer mischinfizierten *B. vulgaris* Pflanze unter Gewächshausbedingungen erhalten wurden. Diese beiden deutschen Virusisolate werden im Weiteren als BMV-IPP und BChV-IPP bezeichnet. Die *B. vulgaris* Pflanze wurde von Dr. K. Graichen (Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Aschersleben) zur Verfügung gestellt. Durch DAS-ELISA und TPIA konnte in dieser Pflanze eine BMV-Infektion nachgewiesen werden (Abbildung 3.3, A). Nach RT-PCR mit BMV-, BChV- und BYV-spezifischen Oligonukleotiden wurde festgestellt, dass die *B. vulgaris* Pflanze sowohl mit BMV als auch mit BChV und BYV infiziert war (Abbildung 3.1).

Tabelle 3.1: Durch RT-PCR und TPIA (MAb5G4) festgestellte Virusinfektionen in Testpflanzen acht Wochen nach Blattlausübertragung von einer BMV-, BChV- und BYV-mischinfizierten *B. vulgaris*.

	Anzahl infizierter / Anzahl getesteter Pflanzen			
	TPIA (MAb5G4)	BMV	BChV	BYV
<i>N. benthamiana</i> *	3 / 4	4 / 4	0 / 4	3 / 4
<i>B. vulgaris</i>	4 / 4	4 / 4	0 / 4	4 / 4
<i>C. capitatum</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	4 / 4
<i>C. bursa-pastoris</i>	4 / 4	4 / 4	0 / 4	4 / 4

*Ergebnisse nach 4 Wochen, 2/4 Pflanzen zeigten starke BYV-Symptome und waren nach 8 Wochen abgestorben.

Durch Blattlausübertragung mit *Myzus persicae* von dieser mischinfizierten *B. vulgaris* Pflanze sollte untersucht werden, ob das BMV-IPP und BChV-IPP Virusisolat Unterschiede in ihrem Wirtspflanzenspektrum zeigten. Hierzu wurden Blattläuse von der *B. vulgaris* Spenderpflanze auf *N. benthamiana*, *B. vulgaris*, *C. capitatum*, *N. benthamiana* und *C. bursa-pastoris* Pflanzen überführt und nach 72 Std. durch Insektizidbehandlung abgetötet. Die Testung systemischer Virusinfektionen erfolgte acht Wochen nach der Blattlausübertragung mittels TPIA (MAb5G4) und RT-PCR mit BMV-, BChV- oder BYV-spezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 3.1 und Abbildung

3.1). Vier Wochen nach der Blattlausübertragung wurden an zwei *N. benthamiana* Pflanzen die für eine Infektion mit dem BYV typischen Symptome in Form von Blattvergilbungen der jüngsten Blätter im oberen Stängelbereich und schließlich das Absterben des Triebes beobachtet. An den BMV/BYV-infizierten *N. benthamiana* wurden nach vier Wochen Vergilbungen an Blättern aus dem unteren und mittleren Stängelbereich beobachtet.

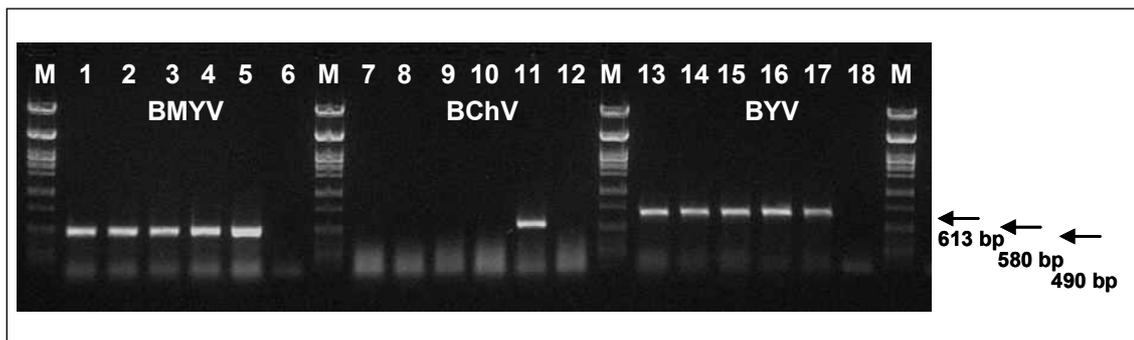


Abbildung 3.1: Virusnachweis durch RT-PCR mit BMV- (BMVVP0s/BMVVP0as, Spur 1-6), BChV- (BChVP0s/BChVP0as, Spur 7-12) und BYV- (BYVCPNTR1/BYVCPNTR2, Spur 13-18) spezifischen Oligonukleotiden nach Gesamt-RNA Extraktion aus vier *B. vulgaris* Pflanzen acht Wochen nach Virusübertragung durch *Myzus persicae*; M: λ -PstI DNA-Standard; Positivkontrolle: RNA aus BMV/BChV/BYV mischinfizierter *B. vulgaris* (Spur 5, 11, 17); Negativkontrolle: RNA aus nicht infizierter *B. vulgaris* (Spur 6, 12, 18).

Bei zwei *B. vulgaris* Pflanzen wurde zur gleichen Zeit eine starke Adernaufhellung an jüngeren Blättern bonitiert. Nach acht Wochen konnte bei diesen Pflanzen ebenfalls eine Vergilbung der ältesten Blätter und Raublättrigkeit beobachtet werden (Abbildung 3.2). An virusinfizierten *C. bursa-pastoris* wurden drei Wochen nach der Blattlausübertragung ein Rollen der älteren Blätter und Blattvergilbungen beobachtet.



Abbildung 3.2: Vergilbungen der Interkostalflächen an *B. vulgaris* Blättern von BMV/BYV-mischinfizierten (rechts) und virusfreien (links) Pflanzen acht Wochen nach Infektion über *Myzus persicae*.

An BYV-infizierten *C. capitatum* Pflanzen konnten vier Wochen nach der Infektion Blattverformungen festgestellt werden. Diese Pflanzen waren nach zehn Wochen abgestorben.

Wie in Tabelle 3.1 dargestellt, konnte mit Ausnahme von *C. capitatum* in allen Versuchspflanzen eine Infektion mit BMVYV-IPP nach Blattlausübertragung nachgewiesen werden. In einem Großteil der BMVYV-infizierten Pflanzen wurde durch RT-PCR auch eine Infektion mit dem BYV dokumentiert. In keiner der Versuchspflanzen konnte dagegen eine Infektion mit BChV-IPP etabliert werden. Da eine Übertragung des BMVYV mittels *Myzus persicae* auf *B. vulgaris* möglich war (Abbildung 3.1), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das vorliegende BChV-Isolat die Fähigkeit zur Blattlausübertragung aufgrund mehrjähriger Erhaltung in einer *B. vulgaris* Pflanze verloren hatte.

In allen *C. capitatum* Pflanzen konnte eine BYV-Infektion durch RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen werden. In dieser Pflanzenart konnte durch TPIA keine BMVYV-IPP Infektion detektiert werden (Abbildung 3.3, D).

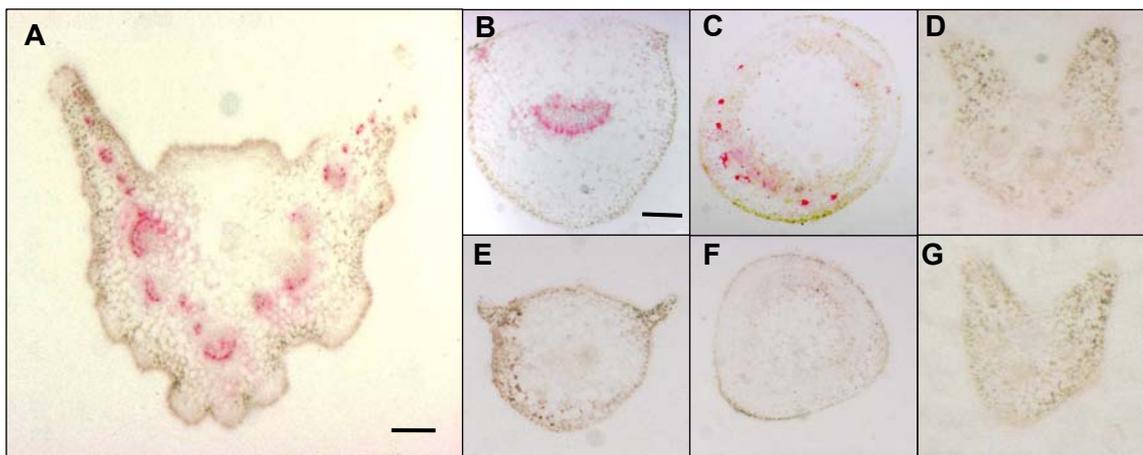


Abbildung 3.3: TPIA-Aufnahmen (MAb5G4) einer BMVYV/BChV-mischinfizierten *B. vulgaris* (A) und nach Virusübertragung durch *Myzus persicae* BMVYV-infizierten *N. benthamiana* (B+C) und *C. capitatum* (D) Blattstiel- und Stängelquerschnitte (C) mit TPIA-Aufnahmen nicht-infizierter Kontrollpflanzen (E-G). Der Größenstandard (A und B-G) entspricht 1 mm.

Es konnte eine sehr gute Übereinstimmung des serologischen BMVYV-Nachweises durch TPIA von Blattstielen mit den Ergebnissen eines Virusnachweises durch spezifische Oligonukleotide und RT-PCR festgestellt werden. Die serologische Markierung des Virusantigens mit den Antiseren MAb5G4/RAM-AP und die Detektion durch Fast Red-Naphtol im TPIA zeigte deutlich violett gefärbtes Pflanzengewebe. Die verfärbten Bereiche wurden als BMVYV-infiziertes Gewebe, vermutlich Phloemgewebe,

klassifiziert und grenzten sich klar von nicht infizierten Zellbereichen ab (Abbildung 3.3).

3.2 Herstellung von BMYV und BChV *full-length* Klonen

In den im vorstehenden Kapitel dargestellten Untersuchungen konnte das BChV-IPP, im Gegensatz zu dem Isolat BMYV-IPP, nicht durch Blattläuse auf *B. vulgaris* als beschriebene Wirtspflanze (Hauser *et al.*, 2002) übertragen werden. Für eine molekulare und biologische Untersuchung der beiden Virusisolate sollten cDNA *full-length* Klone hergestellt werden. Durch die Methode der Agroinfektion mit *full-length* Klonen können Virusinfektionen in Pflanzen etabliert werden ohne auf eine Virusübertragung durch Blattläuse als Virusvektor angewiesen zu sein.

3.2.1 Klonierung eines BMYV *full-length* Klon (BMYV_{fl})

Die Grundlage für die Herstellung des BMYV_{fl} war die von Guilley *et al.* (1995) veröffentlichte Sequenz des BMYV Isolates 2ITB (GenBank #X83110). Anhand dieser Sequenzinformationen wurden spezifische Oligonukleotide ausgewählt und vier PCR-Fragmente (Abbildung 3.4, I-IV), die das gesamte BMYV Genom abdecken, mittels reverser Transkription und PCR amplifiziert.

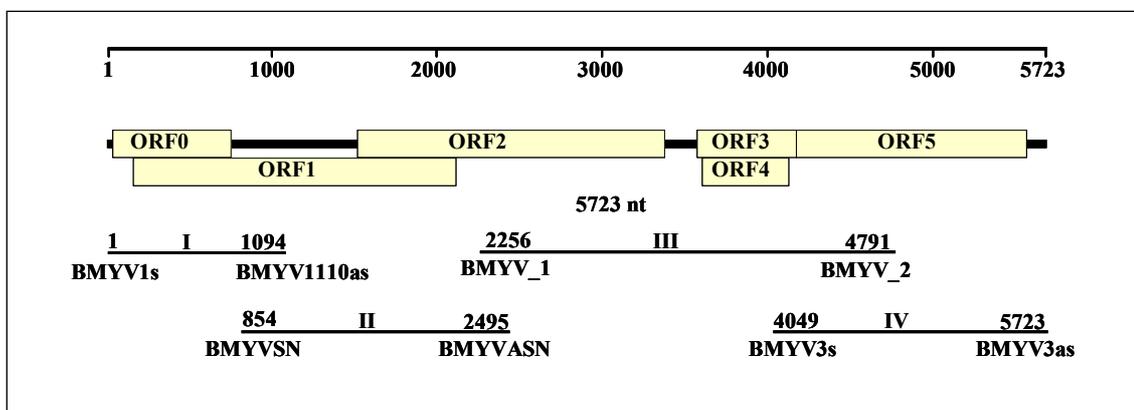


Abbildung 3.4: Genetische Karte der BMYV-IPP RNA mit Angabe der ORF in den Rahmen. Die RT-PCR Produkte I-IV werden durch Linien dargestellt an deren Enden die verwendeten Oligonukleotidbezeichnungen und -positionen angegeben sind.

Die Fragmente wurden durch die Auswahl der Oligonukleotide so amplifiziert, dass sie sich in Sequenzbereichen überschneiden in denen Restriktionsschnittstellen enthalten sind, die für die Zusammenführung der Einzelfragmente zum BMYV_{fl} während der Klonierung verwendet wurden.

Das verwendete BMVYV-IPP Isolat wurde seit einigen Jahren unter Gewächshausbedingungen in *B. vulgaris* Pflanzen erhalten und für die Extraktion der viralen RNA mittels *Myzus persicae* auf *N. benthamiana* Pflanzen übertragen. Alle vier amplifizierten Fragmente wurden unter Verwendung von Restriktionendonukleasen in verschiedene Plasmidvektoren kloniert. Hierbei wurden sowohl die über Oligonukleotide eingebrachten, als auch BMVYV-cDNA interne Restriktionsschnittstellen verwendet. Die Bestätigung von erfolgreichen Klonierungen erfolgte über Restriktionsspaltungen. Von jedem der vier Subfragmente wurden Populationen aus 10 bis 14 Einzellysaten gebildet, die für weitere Klonierungsschritte verwendet wurden. Nach allen anschließenden Klonierungen, mit dem Ziel die Subklone zu einem BMVYV_{fi} zu vereinen, wurden ebenfalls Populationen aus Einzellysaten gebildet. Die im folgenden angegebenen Positionen der Restriktionsschnittstellen beziehen sich auf die BMVYV_{fi} cDNA.

Die PCR-Subfragmente I (BMVYV 1-1094 nt) und II (BMVYV 845-2495 nt) überschneiden sich in einem Sequenzbereich der eine BMVYV-interne *Nsi* I (Nukleotidposition 1040) Restriktionsschnittstelle enthält. Über diese *Nsi* I Schnittstelle und eine über Oligonukleotide eingebrachte *Bam*H I Schnittstelle konnten beide Fragmente zusammengeführt werden. Das PCR-Subfragment II enthält zusätzlich die BMVYV-interne *Ngo*M IV Schnittstelle an der BMVYV-Nukleotidposition 2340. Das PCR-Subfragment IV (BMVYV 4049-5723 nt) wurde so amplifiziert, dass es die BMVYV-interne 3'-*Sac* I Restriktionsschnittstelle an der BMVYV Nukleotidposition 4680 enthält. In diese Schnittstelle ist aus Subfragment III (BMVYV 2256-4791 nt) ein *Sac* I-Fragment (BMVYV Nukleotidposition 2235 bis 4680) nach Dephosphorylierung des Empfängervektors integriert worden. Zusätzlich zur Überprüfung der erfolgreichen Integration wurde die richtige Orientierung mittels Restriktionsspaltung überprüft. Die zusammengeführten Fragmente III und IV sind in den Vektor L140 (siehe Anhang) zwischen eine verdoppelte CaMV 35S-Promotor- und eine Ribozymsequenz überführt worden. Über die von Fragment II eingebrachte interne *Ngo*M IV Restriktionsschnittstelle und eine über Oligonukleotide integrierte *Asc* I Schnittstelle, als Erweiterung des direkten BMVYV 5'-Endes, konnten alle vier Fragmente zum BMVYV_{fi} unter CaMV 35S-Promotor- und Ribozym-Kontrolle vereint werden (L156-L175). Aufgrund einer *Asc* I Restriktionsschnittstelle befinden sich zwischen dem CaMV 35S-Transkriptionsstart und dem Beginn der viralen Sequenz sechs Fremdnukleotide. Die als Terminationssignal verwendete Ribozymsequenz verlängert das 3'-terminale Ende des BMVYV_{fi} um elf Fremdnukleotide (Abbildung 3.6). Den Abschluss der Klonierungsarbeiten bildete die Integration des BMVYV_{fi} aus einer Population von 20 Einzellysaten in das pBIN19 Derivat (Bevan, 1984) pBIN_SN.

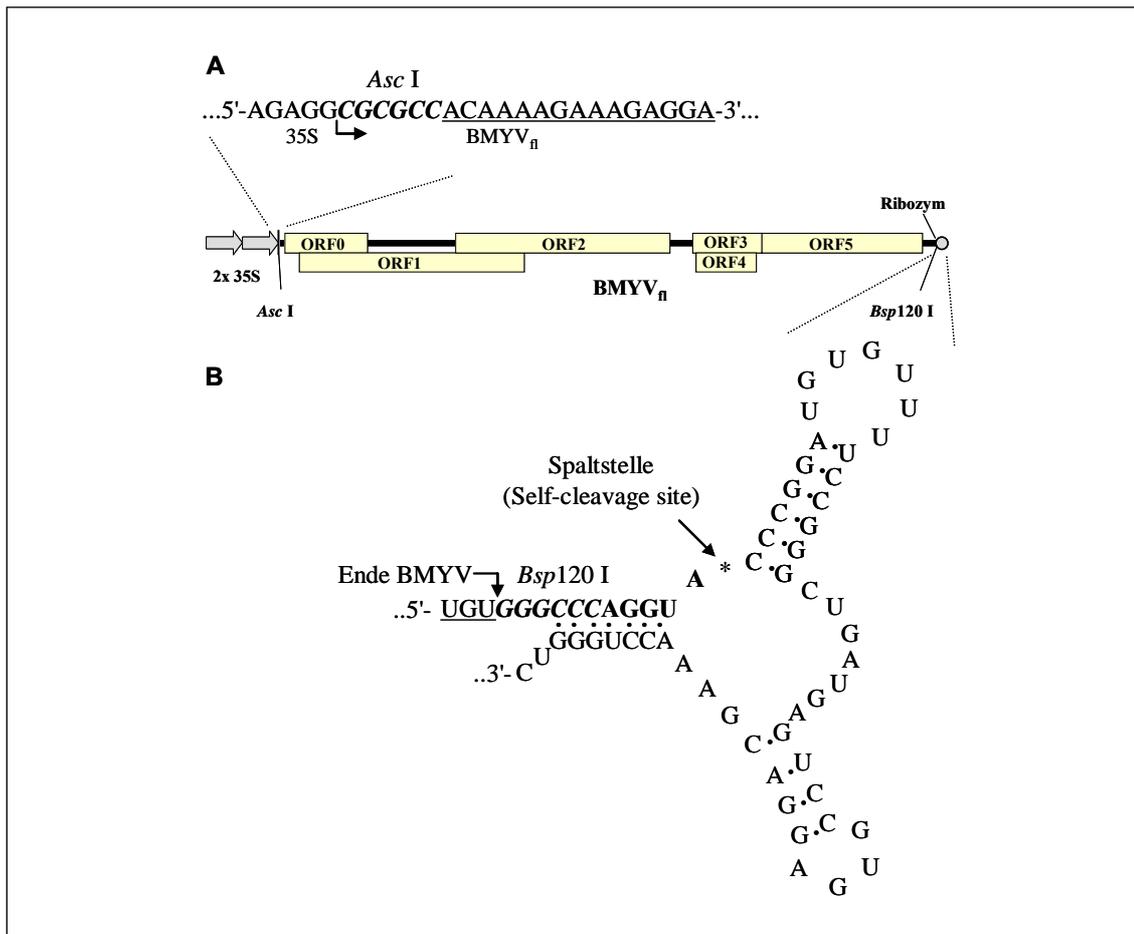


Abbildung 3.5: Darstellung der Fremdnukeotide, die zu einer 5'- und 3'-terminalen Verlängerung (fett) der BMV_{fl}-RNA (unterstrichen) führen. **A:** Zwischen dem CaMV 35S-Promotor Transkriptionsstart (Pfeil) und der viralen Sequenz befinden sich sechs Fremdnukeotide. **B:** Darstellung der RNA-Sekundärstruktur (nach Hofacker, 2003) der *hammerhead*-Ribozymsequenz am 3'-Terminus der BMV_{fl}-RNA mit Angabe der Spaltstelle (*). Nach der ribozymalen Selbstprozessierung verbleiben elf 3'-terminale Fremdnukeotide.

Aus diesem Klonierungsschritt konnten sieben Einzelklone selektiert werden, die separat in Zellen des *A. tumefaciens* Stammes ATHV elektroporiert und auf ihre Infektiosität hin getestet wurden. Eine Übersicht über die Klonierungsstrategie gibt Abbildung 3.6 mit Angabe der Anzahl und Bezeichnungen der Lysatpopulationen und der verwendeten Restriktionsschnittstellen.

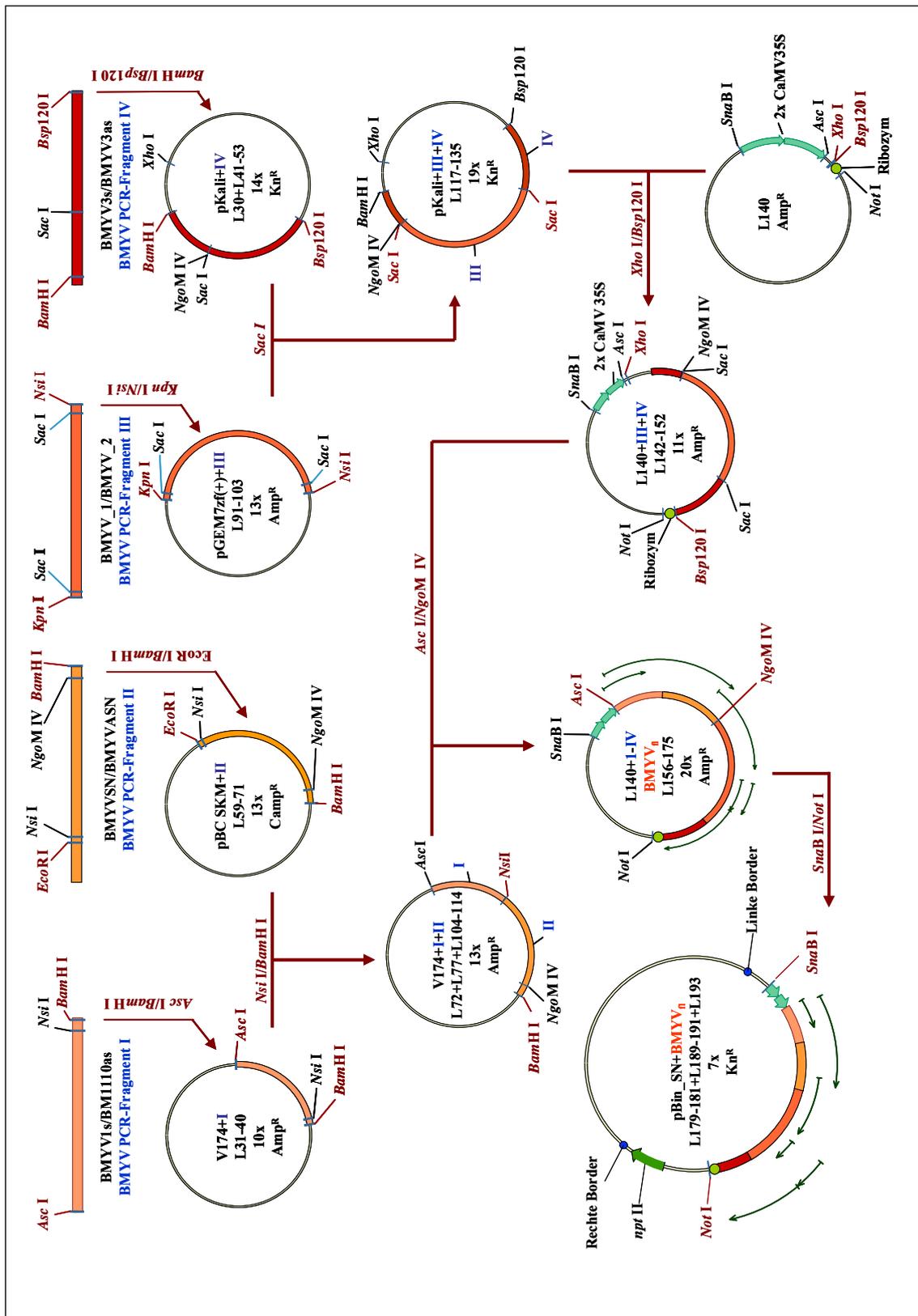


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des BMV_{fl} mit Angabe der verwendeten Oligonukleotide, Vektoren, Restriktionsschnittstellen und Anzahl der selektierten Einzellsate in den Lysatpopulationen.

3.2.2 Klonierung eines BChV *full-length* Klon (BChV_{fl})

Die Klonierungsstrategie zur Herstellung des BChV_{fl} beruht auf Sequenzinformationen verschiedener BChV-Isolate, die durch Hauser *et al.* (2002) bereitgestellt wurden. Die Oligonukleotide für die Amplifikation von BChV-IPP cDNA-Fragmenten wurden so gewählt, dass sie eine möglichst vollständige Übereinstimmung mit allen drei bekannten kompletten BChV-Genomsequenzen der Isolate BChV-CR (kalifornisches Isolat; GenBank #AF352025), BChV-2a (englisches Isolat; GenBank #AF352024) und einem Isolat mit nicht beschriebener Herkunft (GenBank #NC_002766) zeigten. Durch die Selektion von Oligonukleotiden aus konservierten Genombereichen sollten Oligonukleotid-basierende Sequenzunterschiede zwischen dem BChV-IPP und dem cDNA-Klon BChV_{fl} ausgeschlossen werden. Die BChV-RNA des verwendeten Isolats wurde aus einer unter Gewächshausbedingungen gehaltenen, mit BChV, BMV und BYV mischinfizierten *B. vulgaris* Pflanze extrahiert. Da die BChV und BMV 3'-Genombereiche hohe Homologien aufweisen (Hauser *et al.*, 2002), wurden die Oligonukleotide so ausgewählt, dass nur BChV-RNA revers transkribiert und anschließend amplifiziert werden kann. Durch Sequenzierung von Teilabschnitten jedes Fragments wurde sichergestellt, dass nur BChV-IPP und nicht BMV-IPP cDNA amplifiziert worden war.

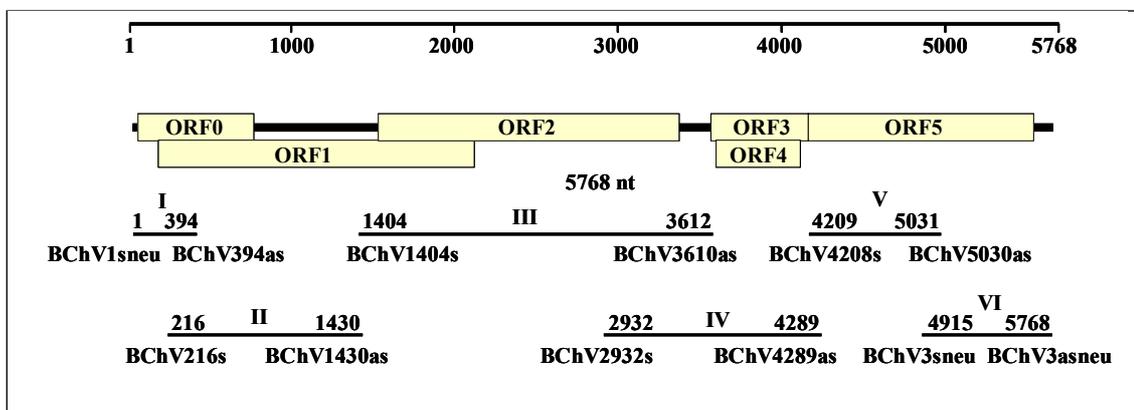


Abbildung 3.7: Genetische Karte der BChV_{fl}-RNA mit Angabe der Leserahmen in Boxen. Die RT-PCR Produkte I-VI werden durch Linien dargestellt an deren Enden die verwendeten Oligonukleotidbezeichnungen und -positionen angegeben sind.

Der BChV_{fl} wurde nach reverser Transkription und PCR-Amplifikation aus sechs Subfragmenten (Abbildung 3.7, I-VI), die das gesamte BChV-Genom abdecken, zusammengeführt. Die für die Amplifikation der Subfragmente verwendeten Oligonukleotide wurden, wie bereits zuvor für die Klonierung des BMV_{fl} beschrieben, so gewählt, dass die Amplifikate BChV-interne Restriktionsschnittstellen enthielten, die

für die Zusammenführung der Subfragmente verwendet werden konnten. Mit den über die Oligonukleotide eingebrachten Restriktionsschnittstellen an den 5'- und 3'-Enden der Amplifikate wurden die Subfragmente in Plasmidvektoren zwischenkloniert.

Die Überprüfung der Klonierungen erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen. Von jedem der klonierten Subfragmente wurde für die Herstellung einer Population eine möglichst hohe Anzahl von Einzellysaten selektiert. Während von den Subfragmenten I und V jeweils 17 bzw. 18 Einzellysate für eine anschließende Populationsklonierung selektiert wurden, konnten von den Fragmenten II-IV und VI nur zwei bzw. sechs Einzellysate weiter verwendet werden. In den folgenden Klonierungsschritten, mit dem Ziel, die Subfragmente zu einem BChV_{fl} zu vereinen, wurden ebenfalls Lysatpopulationen verwendet. Die nachstehend angegebenen Nukleotidpositionen der BChV internen Restriktionsschnittstellen beziehen sich auf die BChV_{fl} cDNA.

Die Klonierung des BChV Subfragmentes I über *Rsa* I (blunt)/ *Bam*H I in den verdoppelten CaMV 35S-Promotor enthaltenden Plasmidvektor p442 (*Stu* I (blunt)/ *Bam*H I), ermöglichte eine 3'-terminal fremdnukleotidfreie Integration des BChV Subfragmentes I hinter die CaMV 35S-Promotorsequenz. Die BChV Subfragmente I (BChV 1-394 nt) und II (216-1430 nt) überschneiden sich in einem Bereich, der eine BChV interne *Nco* I (Nukleotidposition 217) Restriktionsschnittstelle enthielt. Mit dieser Restriktionsschnittstelle und vektorinternen *Hind* III Restriktionsschnittstellen wurden die beiden Subfragmente in p442 zusammengeführt. Das BChV Subfragment III (1404-3610 nt) überschneidet sich mit dem II. Fragment in einem Bereich mit einer BChV internen *Xho* I (Nukleotidposition 1409) Restriktionsschnittstelle. Da innerhalb des Subfragmentes III eine zweite *Xho* I (Nukleotidposition 1841) vorlag, wurde dieses Fragment nach einer unvollständigen *Xho* I und *Hind* III Restriktionsspaltung in die Populationsklone mit den ersten beiden Fragmenten integriert. Die Subfragmente III und IV (2932-4289 nt) beinhalteten beide einen Bereich mit einer BChV internen *Nsi* I (Nukleotidposition 2938) Restriktionsschnittstelle. Diese *Nsi* I und die plasmidinterne *Hind* III Schnittstelle ermöglichten die Zusammenführung mit den Populationsklonen, die den restlichen 5'-Bereich des BChV-Genoms enthielten.

Das direkte 3'-Ende des BChV_{fl} (Subfragment VI, 4915-5768 nt) wurde über die Oligonukleotid-integrierten Restriktionsschnittstellen *Asc* I und *Bsp*120 I in den Plasmidvektor L140 vor eine Ribozymsequenz überführt (Abbildung 3.5, B). Nach der ribozymalen Selbstprozessierung verlängert sich die BChV-IPP RNA im BChV_{fl} um elf Nukleotide. Die Subfragmente V (4209-5031 nt) und VI wurden durch Nutzung einer BChV internen *Nsi* I und der plasmidinternen *Asc* I zusammengeführt. Diese beiden Subfragmente konnten dann über eine BChV interne *Eco*N I (Nukleotidposition

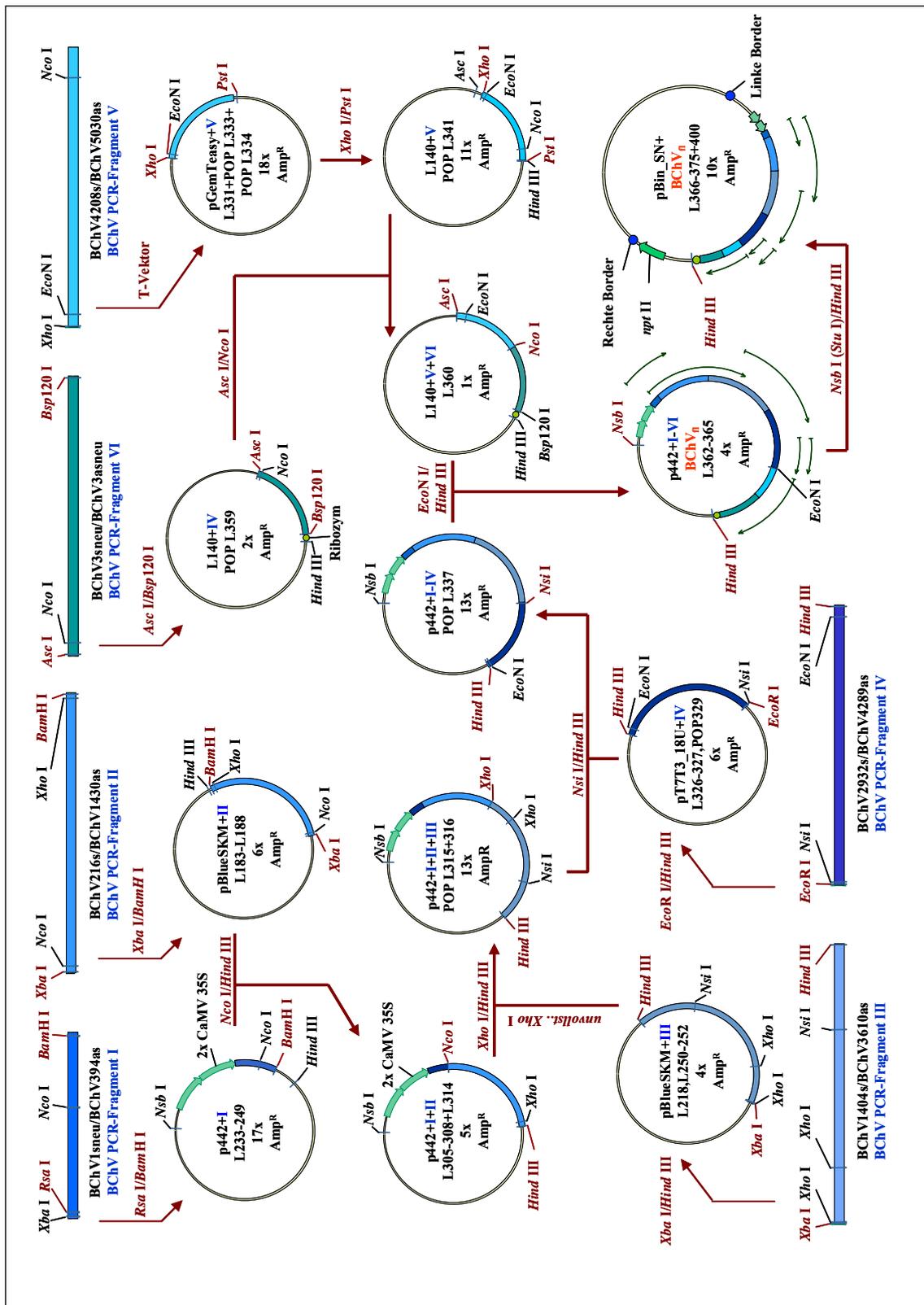


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des BChV_{fl} mit Angabe der verwendeten Oligonukleotide, Vektoren, Restriktionsschnittstellen und Anzahl der selektierten Einzellsate in den Lysatpopulationen.

4240) aus überschneidenden Bereichen der Fragmente IV und V und einer der Ribozymsequenz nachfolgenden plasmidinternen *Hind* III-Restriktionsschnittstelle mit den Subklonen I-IV zu dem vollständigen BChV_{fl} zusammengeführt werden. Eine Übersicht über die durchgeführte Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Es konnten insgesamt vier BChV_{fl} unter CaMV 35S-Promotor- und Ribozymkontrolle selektiert werden. Einer dieser Klone (L362) wurde vollständig sequenziert. Für die Testung der Infektiosität mittels Agroinfection wurden alle vier BChV_{fl} als Population, und der sequenzierte BChV_{fl} auch separat, in das pBIN19 Derivat (Bevan, 1984) pBIN_SN überführt.

3.3 Sequenzanalyse des BMV-IPP und des BChV-IPP

Aus den Populationen der BMV-IPP und BChV-IPP cDNA Klone wurde jeweils ein Klon vollständig sequenziert. Für die Sequenzbestimmung wurden L189 (BMV-IPP) und L362 (BChV-IPP) ausgewählt. Mit den in Kapitel 2.1.6.2 und 2.1.6.7 angeführten Oligonukleotiden konnte die cDNA Nukleotidsequenz des BMV_{fl} bzw. des BChV_{fl} vom 3'-Bereich des CaMV 35S-Promotors bis zur terminierenden Ribozymsequenz vollständig bestimmt werden. Durch die Sequenzanalyse sollte überprüft werden, ob im BMV_{fl} und BChV_{fl} die für Polioviren charakteristische Anordnung der Leserahmen, Start- und Terminationskodons und Motive, die an der Genomexpression und der Replikation beteiligt sein können, vorliegen. Dies war von besonderem Interesse, da die erstellten *full-length* Klone auf ihre Infektiosität getestet werden sollten.

Die Genomgröße des BMV umfasst 5723 nt. Ein zusätzliches Thymin an Nukleotidposition 3520 innerhalb der nicht kodierenden Region zwischen dem 5'- und 3'-Genblock verlängert das Genom im Vergleich zu dem Isolat BMV-2ITB um ein Nukleotid. Die festgestellte Genomgröße des BChV-IPP beträgt 5768 nt und liegt damit zwischen den Genomgrößen der BChV-Isolate BChV-CR (5742 nt) und BChV-2a (5776 nt). Bei beiden Klone wurden die direkten 5'- und 3'-Genomsequenzen nicht durch eine 5'- und 3'-RACE bestimmt, sondern ergaben sich aufgrund der verwendeten Oligonukleotide BMV1s (24 nt) und BChV1sneu (20 nt) für die 5'- bzw. BMV3as (16 nt) und BChV3asneu (33 nt) für die 3'-terminalen Genombereiche.

Die nachfolgend angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf die sequenzierte cDNA Sequenz des BMV-IPP bzw. BChV-IPP. Die Sequenzanalyse des BMV-IPP und BChV-IPP zeigte die für Polioviren charakteristische Genomstruktur mit sechs großen ORFs auf dem positiven RNA-Strang. Dabei werden ORF0, ORF1 und ORF2 im 5'-Bereich des Genoms durch einen nicht-kodierenden Bereich (*non-coding region*, NCR) von 228 nt (BMV-IPP) und 203 nt (BChV-IPP) von dem 3'-Genblock mit ORF3, ORF4 und ORF5 getrennt. Der Vergleich der Größe der sechs ORFs (Tabelle 3.2)

ergab für die Isolate BMYV-IPP und BMYV-2ITB keine Unterschiede. Das Isolat BChV-IPP zeigte im Vergleich zu anderen BChV-Isolaten eine hohe Homologie in Bezug auf die Größe der identifizierten sechs ORFs. Allerdings variierte hier die Größe des ORF5 bei Isolaten verschiedener Herkunft.

Der Größenvergleich der ORFs zwischen den beiden Viren BMYV und BChV zeigte identische Größen für die ORF1, ORF3 und ORF4 und einen um 27 nt größeren BChV-ORF0. Diese Daten geben einen ersten Hinweis auf die phylogenetisch nahe Verwandtschaft von BMYV und BChV, die in Kapitel 3.13 intensiver analysiert wird. Der Vergleich zeigt auch, dass die Unterschiede in der Genomlänge, sowohl zwischen den BMYV- als auch zwischen den BChV-Isolaten, nicht alleine durch Unterschiede in kodierenden Bereichen erklärt werden können. Diese Differenzen sind hauptsächlich durch Unterschiede in nicht-kodierenden Regionen des Genoms, wie die 5'- und 3'-terminale Region und der NCR, zu erklären.

Tabelle 3.2: Vergleich der Genom- und Leserahmengröße des BMYV-IPP und des BChV-IPP mit denen verschiedener BMYV- und BChV-Isolate.

	BMYV-IPP	BMYV-2ITB X83110	BChV-IPP	BChV-CR AF352025	BChV-2a AF352024	BChV NC002677
Genomgröße	5723 nt	5722 nt	5768 nt	5742 nt	5776 nt	5776 nt
ORF0	720 nt	720 nt	747 nt	747 nt	747 nt	747 nt
ORF1	1971 nt	1971 nt	1971 nt	1971 nt	1971 nt	1971 nt
ORF2	1875 nt	1875 nt	1857 nt	1857 nt	1857 nt	1857 nt
ORF3	609 nt	609 nt	609 nt	609 nt	609 nt	609 nt
ORF4	528 nt	528 nt	528 nt	528 nt	528 nt	528 nt
ORF5	1401 nt	1401 nt	1407 nt	1401 nt	1392 nt	1392 nt

Der erste ORF (ORF0) beginnt mit AUG (BMYV-IPP 32-34 nt bzw. BChV-IPP 27-29 nt) und terminiert mit UGA (BMYV-IPP 749-751 nt) bzw. UAA (BChV-IPP 771-773 nt). Die berechnete relative Molekülmasse (M_r) des putativen Proteins P0 beträgt ~28 kDa. Der zweite ORF (ORF1) befindet sich in einem anderen Leseraster und beginnt mit AUG (BMYV-IPP 156-158 nt bzw. BChV-IPP 163-165 nt) und endet am Stopkodon UGA (BMYV-IPP 2124-2126 nt) bzw. UAA (BChV-IPP 2131-2133 nt) und kodiert für das putative Protein P1 mit einer M_r von ~72 kDa. Der ORF2 überschneidet sich in seiner 5'-Region mit dem ORF1 und befindet sich im gleichen Leseraster wie der ORF0. Der ORF2 beginnt an der BMYV-IPP Nukleotidposition 1522 (BChV-IPP 1547) und terminiert mit UAA an Position 3398-3400 bzw. BChV-IPP Position 3402-3404. Der ORF2 wird vermutlich nur durch einen -1 Leserasterwechsel von ORF1

	A ^{250/263}	A ^{290/294}
PLRV	ALVTAETHCLEG-----AFATSLKTGN--RIPMSTFFPIFKSARNDISILVGP	
CYDY	AIVTVAHNIIEEGC-----SFYSSRTSG---SIPITEFRVIFESKTMEDIAILVGP	
BWYV-FL1	ALMTATHVLRDCP-----NAVAVSAKGLKTRIPLAEFKTIAKSDKGDVTLRLRGP	
BMYV-2ITB	GLLTAQHVVDDFYEGDPRKTLKVVSTRNGN--KIPLDEFRVTYTSEKRDQLLMHGP	
BMYV-IPP	GLLTAQHVVDDFYEGDPRKTLKVVSTRNGN--KIPLDEFRVTYTSEKRDQLLMHGP	
CABYV	GLLTAYHVA---VPGS-----KVVSTRNGN--KVPLSEFRSIMESEKRDVLVLLAGP	
BChV-CR	GLITCSHAPIN-----GSVFSTVTGN--KIKMESFKTLYDDAETDVKILFGP	
BChV-2a	GLITCSHAPIN-----GSVFSTVTGN--KIKMESFKTLYDDAETDVKILFGP	
BChV-IPP	GLITCSHAPIN-----GSVFSTVTGN--KIKMESFKTLYDDAETDVKILFGP	
	. : : * *	. * : : * . * : : **
PLRV	PNWEGLLSVKGAHFITADKIGKGPASFYTLEK-GEWMCHSATIDGAHH--QFVSVL	
CYDY	INWESILGCKGVHFTTADRLAECPAALYLLDSDGQWRSNSAKICGHFD--NFAQVL	
BWYV-FL1	PNWEGLLGCKAANVITAANLAKCKASIYSFDR-DGWVSSYAEIVGSEG--TDMVL	
BMYV-2ITB	PNWEGVLACKAVHMIPASSVAKSKATFFALSD-GEWHSSNAELVGTSKCGKFI SVL	
BMYV-IPP	PNWEGVLACKAVHMIPASSVAKSKATFFALSD-GEWHSSNAELVGTSKCGKFI SVL	
CABYV	PNWEGTLACKAVQFQSAQNLCKSKASFYAYDG-EGWISSNAEIVGIAEGKTHASVL	
BChV-CR	PNWESVMGCKALKLVTRDSLAKGPATIIYTFGD-NGWTSSQASISGAYD-KNKASVL	
BChV-2a	PNWESVMGCKALKLVTRDSLAKGPATIIYTFGD-NGWTSSQASISGAYD-KNKASVL	
BChV-IPP	PNWESVMGCKALKLVTRDSLAKGPATIIYTFGD-NGWTSSQASISGAYD-KNKASVL	
	***. :. *. :. . : : *::: * * : * **	
	A ^{355/358}	A ^{406/406}
PLRV	CNTGPGYSGTGFWSSKNLLGLVKGFPL-EEECNYNVMSVIPSIPIGITSPPNYVFE S	
CYDY	SNTKVGHSGAGYFYGKTLVGLHKGHP--GKDFNFMPLMAPLPGIPGLTSPQYVVE S	
BWYV-FL1	SHTEGGHSGSPYFNGKTI LGVHSGAS---ATGNYNLMAPIPSLPGLTSPTYVFE T	
BMYV-2ITB	SDTKSGHSGTPYFNGKSVLGVHIGSPKEFESENVNYMSPIPRFPGLTSPNYIFE T	
BMYV-IPP	SDTKSGHSGTPYFNGKSVLGVHIGSPKEFESENVNYMSPIPRFPGLTSPNYIFE T	
CABYV	SNTDAGHSGTPYFNGRTVLGVHVGAK---DENFNYPMAPIPPVYGLTSPSYEFE T	
BChV-CR	SITDKGHSGAPYISGKNVIGIHSGGD---IVDNVNV CSTIPKIVNL TTPQLVFE T	
BChV-2a	SITDKGHSGAPYISGKNVIGIHSGGD---VVDNVNV CSTIPKIVNL TTPQLVFE T	
BChV-IPP	SITDKGHSGAPYISGKNVIGIHSGGD---VVDNVNV CSTIPKIVNL TTPRLVFE T	
	. * *::: : . : : : : * * * : : * . : : : * . * :	

Abbildung 3.9: Alignment von P1 Aminosäuresequenzen verschiedener Poleroviren und BMYV_{fl} und BChV_{fl}, die das putative Proteasemotiv (grau) und die proteolytische N-terminale Prozessierungsstelle des VPg (unterstrichen) enthalten. Die Aminosäureposition innerhalb des BMYV-IPP und BChV-IPP P1 ist über dem Alignment angegeben (A^{BMYV-IPP/BChV-IPP}).

gelesen. Die kalkulierte M_r des resultierenden putativen P1-P2 Fusionsproteins beträgt ~121 kDa. Die an den 3'-Bereich des ORF2 angrenzende nicht-kodierende Region trennt den 5'-Genblock vom 3'-Genblock, in dem die ORF3, ORF4 und ORF5 lokalisiert sind. Der für das P3 (~22 kDa) kodierende ORF3 beginnt mit AUG (BMYV-IPP 3598-3600 nt und BChV-IPP 3608-3610 nt) und endet mit UAG an der BMYV-IPP Nukleotidposition 4204-4206 bzw. BChV-IPP Nukleotidposition 4214-4216. Der fünfte Leserahmen (ORF4) liegt innerhalb des ORF3 in einem anderen Leseraster und beginnt mit AUG (BMYV-IPP 3629-3631 bzw. BChV-IPP 3639-3641) und terminiert mit UAG (BMYV-IPP 4154-4156 bzw. BChV-IPP 4164-4166). Der ORF4 kodiert für das

putative Protein P4 mit einer M_r von ~20 kDa. Der Start des ORF5 grenzt direkt an das 3'-Ende des ORF3 und endet mit UGA für BMV_{fl} (5608-5610) bzw. UAG für BChV_{fl} (5624-2626). Der ORF5 wird nach Überlesen (*readthrough*) des ORF3 Stopkodons als P3-P5 *readthrough*-Fusionsprotein mit einer M_r von ~74 kDa translatiert.

In dem durch ORF1 kodierten P1 von Poleroviren befindet sich das konservierte Aminosäuremotiv des aktiven Zentrums einer Chymotrypsin-ähnlichen Serin-Protease: H(x₋₂₅)[D/E](x₇₀₋₈₀)T[R/K]xGxSG. Diese Serin-Protease ist vermutlich für die proteolytische Prozessierung des VPg innerhalb des P1 verantwortlich. Für die Isolate BMV-IPP (H(x₃₉)D(x₆₄)TKSGHSG) und BChV-IPP (H(x₃₀)D(x₆₃)TDKGHSG) konnte dieses Motiv identifiziert werden (Abbildung 3.9). Ebenso konnte die putative N-terminale proteolytische Prozessierungsstelle E⁴⁰⁶-S/T⁴⁰⁷ des VPg in der putativen BMV-IPP und BChV-IPP P1-Aminosäuresequenz identifiziert werden (Abbildung 3.9). Aufgrund fehlender Vergleichsdaten von Aminosäuresequenzierungen des C-terminalen Endes von poleroviralen VPg konnte eine mögliche zweite Prozessierungsstelle innerhalb des P1 nicht bestimmt werden.

Das hochkonservierte Aminosäuremotiv GXXXTXXXN(x₂₅₋₄₀)GDD von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen konnte sowohl im P1-P2 Fusionsprotein des BMV-IPP (GDD-Position 522-524) als auch im BChV-IPP (GDD-Position 516-518) festgestellt werden.

Für einen Leserasterwechsel, der zur Translation dieses Fusionsproteins führt, wird vermutlich das konservierte Heptanukleotid-Motiv (*shifty sequence*) 5'-XXXYYYZ, wobei X jede Base, Y A oder T und Z nicht G sein darf, kurz vor einer Pseudoknot-Struktur benötigt. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, konnte die Nukleotidsequenz, die diese Pseudoknot-Struktur ermöglicht, auf der genomischen RNA des BMV-IPP und BChV-IPP nachgewiesen werden. Während bei allen bekannten Poleroviren eine Heptanukleotid-Sequenz vorliegt, kann diese bei den Isolaten BMV-2ITB und BMV-IPP nicht im unmittelbaren Bereich des vermuteten Leserasterwechsels gefunden werden. Ein Vergleich der vor dem Pseudoknot gelegenen BMV-Nukleotidsequenz mit anderen Sequenzmotiven, die einen Leserasterwechsel stimulieren, ergab keine Übereinstimmung in der von Baranov *et al.* (2001) beschriebenen Datenbank RECODE.

Die im 3'-Genblock von Poleroviren kodierten Proteine werden von subgenomischer RNA translatiert. Der 5'-Bereich der sgRNA von Poleroviren ist mit dem Beginn der gRNA Nukleotidsequenz 5'-ACAAAA identisch (Abbildung 3.11). Ein konserviertes AAAAA-Motiv findet sich als interne Wiederholung der direkten 5'-Startsequenz im ORF2 von Poleroviren und bildet vermutlich den Beginn der sgRNA. Dieses Motiv konnte im Isolat BMV-IPP (Nukleotidposition 3388-3393) und BChV-IPP (3395-3400)

detektiert werden. Der Transkriptionsstart an dieser Motivposition spricht für die Bildung einer sgRNA mit einer Größe von ~ 2,4 kB.

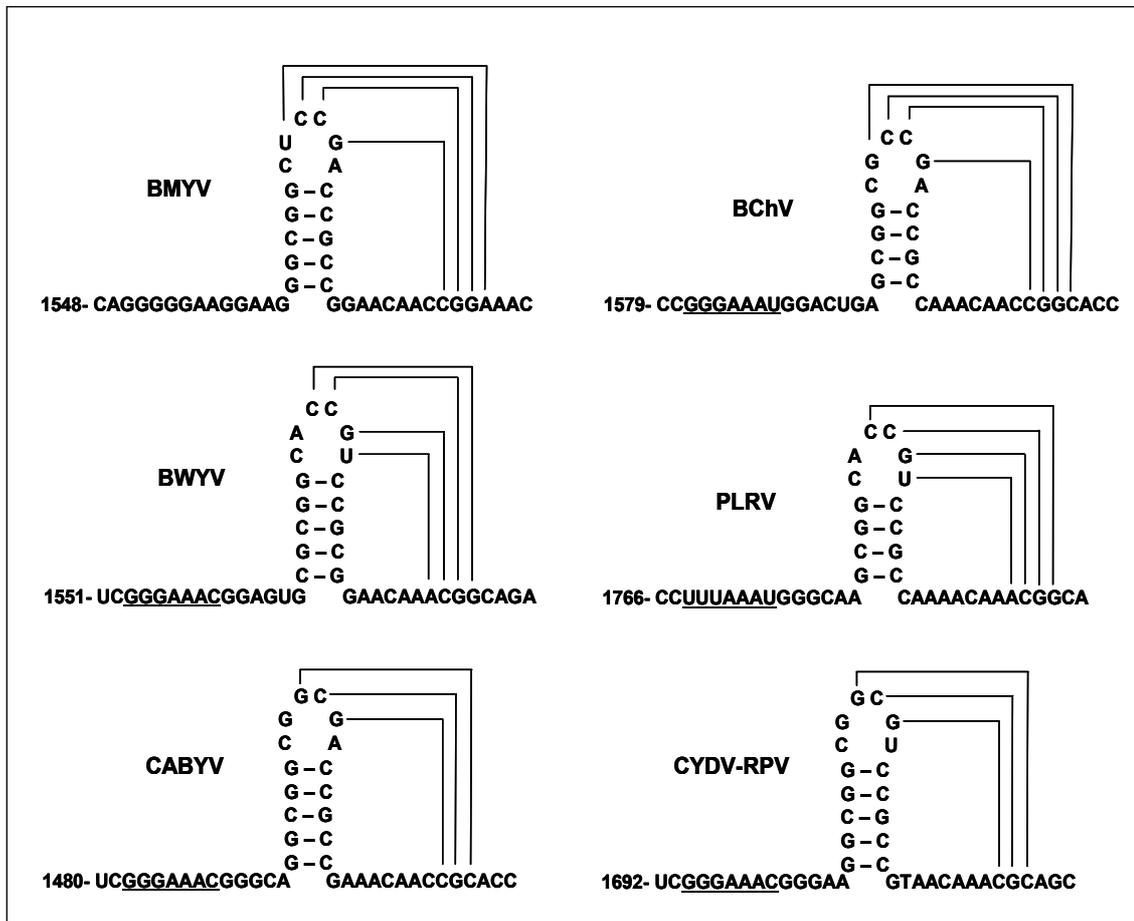


Abbildung 3.10: Putative Pseudoknot-Strukturen verschiedener Poleroviren in der Nähe des 5'-Terminus des Überschneidungsbereiches von ORF1 und ORF2. Die *shifty*-Heptamersequenz ist unterstrichen. Die angegebenen Sequenzen sind für BMYV-IPP und BMYV-2ITB bzw. BChV-IPP und alle bekannten BChV-Isolate identisch.

Die Translation des P3-P5 Fusionsproteins erfolgt von subgenomischer RNA durch Überlesen des ORF3 Terminationskodons UAG. Dieser *readthrough*-Vorgang erfolgt bei allen Luteoviren im Kontext des UAG einschließenden konservierten Sequenzabschnittes AAUAGGUAGAC. Zusätzlich hat ein stromabwärts gelegener C-reicher Sequenzbereich mit dem sich 7 bis 16 Mal ununterbrochen wiederholenden Motiv CCXXXX einen Einfluss auf das Überlesen des Stopkodons (Mayo & Ziegler-Graff, 1996). Sowohl der das UAG einschließende konservierte Sequenzabschnitt als auch acht nicht unterbrochene CCXXXX-Motive liegen in den Isolaten BMYV-IPP und BChV-IPP vor.

BMVYV-IPP:	(1) ACAAAA GAAACCAGCGAGGAUCUAGCAGUCUAUG-ORF0...
BMVYV-2ITB:	(1) ACAAAA GAAACCAGCGAGGAUCUAGCAGUCUAUG-ORF0...
BChV-IPP:	(1) ACAAAA GAAUAGCAGGAGGACAGCGAAUG-ORF0...
BCHV-2a:	(1) ACAAAA GAAUAGCAGGAGGACAGUGAAUG-ORF0...
BWYV-FL1:	(1) ACAAAA GAAACCAGGAGGGAAUCCUUAGUUGAUG-ORF0...
PLRV:	(1) ACAAAA GAAUACCAGGAGAAAUUGAUG-ORF0...
BMVYV-IPP:	... (3385)GCC ACAAAA GAUAUAA-3'Ende ORF2-CGAGG...
BMVYV-2ITB:	... (3385)GCC ACAAAA GAUAUAA-3'Ende ORF2-CGAGG...
BChV-IPP:	... (3392)ACC ACAAAA CUAA-3'Ende ORF2-UUCAGGAG...
BCHV-2a:	... (3392)ACC ACAAAA CUAA-3'Ende ORF2-UUCAGGAG...
BWYV-FL1:	... (3256)ACC ACAAAA GAUACCAGGAGAGUAA-3'Ende ORF2-AGAA...
PLRV:	... (3373)ACC ACAAAA GAACACUGA-3'Ende ORF2-AGG...

Abbildung 3.11: Vergleich der 5'-terminalen Nukleotidsequenzen der genomischen RNA mit einem internen Ausschnitt am 3'-Ende des ORF2 als putativer transkriptioneller Start der sgRNA am konservierten Motiv ACAAAA verschiedener Poleroviren. In Klammern ist die Position des ersten aufgeführten Nukleotids angegeben.

Die Sequenzanalyse der BMVYV-IPP und BChV-IPP cDNA *full-length* Klone zeigte, dass alle untersuchten Motive und Strukturen in beiden Klonen mit denen der bereits bekannten Nukleotidsequenzen von BMVYV-2ITB, BChV-2a bzw. BChV-CR und anderer Poleroviren übereinstimmen. Die Isolate BMVYV-IPP und BMVYV-2ITB besitzen keine vor dem Pseudoknot liegenden Heptanukleotid-Sequenz (*shifty sequence*).

3.4 BMVYV_{fl}-Agroinokulationen zur Testung der Infektiosität

Die Testung der Infektiosität des BMVYV_{fl} und des BChV_{fl} erfolgt durch die Methode der Agroinfektion. Um eine Vergleichbarkeit von Infektionsversuchen an verschiedenen Terminen zu ermöglichen ist es von Vorteil, bei identischen Versuchsbedingungen eine gleichbleibend hohe Infektionsrate zu erreichen. Bei Agroinfektionen kann die zu erreichende Infektionsrate bei konstanten Anzuchtbedingungen und Aufarbeitungen der Agrobakterien vor allem von der Methode der Agroinfektion, d.h. der Form in der rekombinante Agrobakterien mit der Pflanze in Kontakt gebracht werden und der Kompatibilität der Methode der Agroinfektion mit der gewählten Wirtspflanze, abhängig sein. Bei den in dieser Arbeit untersuchten phloemgebundenen Poleroviren ist dabei von besonderer Bedeutung, dass die Agrobaktériensuspension in Kontakt mit phloemassoziierten Zellen gelangt, um eine systemische Infektion zu ermöglichen.

Die ersten Agroinfektionsversuche wurden mit dem BMVYV_{fl} durchgeführt, der nach Integration in den binären Vektor in *A. tumefaciens* ATHV Zellen elektroporiert worden war. Hierbei wurden mit der angewendeten Inokulationsmethode (Kapitel 3.4.1) nur geringe Infektionsraten erreicht. Durch Optimierungsversuche sollte die Infektionsrate

erhöht werden. Neben der Optimierung der Inokulationsmethode kann auch der Kontext, in dem der virale *full-length* Klon zwischen dem CaMV 35S-Promotor und dem verwendeten Ribozym als Terminationspunkt liegt, einen Einfluss auf die Infektiosität besitzen. Alle Versuche zur Erhöhung der Infektionsrate wurden an *N. benthamiana* als Wirtspflanze durchgeführt. Die Schwerpunkte bei der Optimierung lagen dabei in einer Variation der Inokulationsmethode, der Kontextoptimierung zwischen dem CaMV 35S-Promotor und dem Start des BMV_{fl}, sowie in der Überführung der Klone in LBA4404-Zellen als einen weiteren *A. tumefaciens* Stamm.

3.4.1 Optimierung der Agroinokulationsmethode

Die Testungen der Infektiosität von selektierten BMV_{fl} erfolgte durch zwei verschiedene Agroinokulationsmethoden (A und B) an *N. benthamiana* Pflanzen. Der Nachweis von erfolgreichen Agroinfektionen wurde vier Wochen nach der Inokulation durch DAS-ELISA überprüft.

Tabelle 3.3: Zusammenfassende Übersicht über Agroinfektionsversuche mit Methode A (halbiertes Blatt) oder B (Injektion) der in den binären Vektor pBIN_SN integrierten und in *A. tumefaciens* ATHV überführten BMV_{fl}.

BMV _{fl} in ATHV	Agroinfektionsmethode	Anzahl systemisch infizierter Pflanzen / Anzahl inokulierter Pflanzen
ATHV_L179	A	0 / 16 (0%)
ATHV_L180	A	1 / 16 (6,3%)
ATHV_L181	A	5 / 41 (12,2%)
	B	24 / 24 (100%)
ATHV_L189	A	0 / 13 (0%)
	B	5 / 5 (100%)
ATHV_L190	A	1 / 13 (7,7%)
ATHV_L191	A	2 / 33 (6,1%)
ATHV_L193	A	1 / 13 (7,7%)

Die ersten BMV_{fl} Agroinfektionsversuche wurden mit der Methode A, bei der die Wundfläche eines quer zur Blattmittlerippe halbierten Blattes in die Inokulations-suspension eingetaucht wurde, durchgeführt. Durch dieses Vorgehen sollte eine möglichst große Anzahl von phloemassoziierten Zellen über den gesamten Querschnitt des Blattes mit den BMV_{fl}-rekombinanten Agrobakterien in Kontakt gebracht werden. Mit dieser Methode konnten infektiöse Klone selektiert werden, allerdings wurden nur Infektionsraten von maximal 12% erreicht (Tabelle 3.3). Die durch Anwendung der Methode A als infektiös eingestufteten BMV_{fl} L181 und ein BMV_{fl} mit dem nach

Durchführung der Methode A keine Infektionen etabliert werden konnten (L189), wurden für Agroinfektionsversuche mit Methode B verwendet. Bei Anwendung der Methode B, bei der durch Injektion das Blattgewebe großflächig mit der Inokulationssuspension infiltriert wurde, konnte mit beiden BMV_{fi} -rekombinanten ATHV_L181 und ATHV_L189 Infektionsraten von 100% festgestellt werden.

Nach Durchführung der Methode A konnten fünf infektiöse BMV_{fi} selektiert werden. Durch Infiltration der Bakteriensuspension mit Methode B konnte ein weiterer BMV_{fi} (L189) als infektiös eingestuft werden. Bei Anwendung der Methode B konnte eine Infektionsrate von 100% erreicht werden. Alle nachfolgenden Agroinokulationen in dieser Arbeit wurden mit Methode B durchgeführt.

3.4.2 Vergleich zwischen ATHV und LBA4404 als BMV_{fi} Wirtsbakterien

Der als infektiös getestete BMV_{fi} (L181) wurde sowohl in den *A. tumefaciens* Stamm ATHV als auch in den Stamm LBA4404 überführt. Die beiden Bakterienstämme sollten auf Unterschiede in Bezug auf die zu erreichenden BMV_{fi} -Infektionsraten untersucht werden. Die Agroinokulation erfolgte hierbei durch Infiltration der Bakteriensuspension in das Blattgewebe von *N. benthamiana* Pflanzen (Methode B). Der Nachweis einer systemischen Infektion erfolgte mittels DAS-ELISA oder TPIA.

Wie in Tabelle 3.4 dargestellt, konnten keine Unterschiede in den Agroinfektionsraten zwischen den *A. tumefaciens* Stämmen ATHV und LBA4404 festgestellt werden. Mit beiden Stämmen wurden an unterschiedlichen Inokulationsterminen Infektionsraten von 100% erreicht.

Tabelle 3.4: Agroinfektionsraten in *N. benthamiana* bei Verwendung von BMV_{fi} (L181) rekombinanten ATHV- oder LBA4404-Zellen als Wirtsbakterien.

<i>A. tumefaciens</i> -Stamm		Anzahl systemisch infizierter Pflanzen / Anzahl inokulierter Pflanzen
ATHV_L181	Versuch I	16 / 16 (100%)
	Versuch II	5 / 5 (100%)
	Versuch III	4 / 4 (100%)
LBA4404_L181	Versuch IV	6 / 6 (100%)
	Versuch V	4 / 4 (100%)

Im Vergleich zu LBA4404- zeigten ATHV-Zellen ein schnelleres und gleichmäßigeres Wachstum bei der Anzucht und eine geringere Neigung zur Bildung von agglutinierten Bakterienzellen. Diese Agglutinationen verursachten, vermutlich durch den Verschluss von Stomata, Probleme bei der gleichmäßigen Injektion der Suspension in das

Pflanzengewebe. Die Verwendung der *A. tumefaciens* Stämme LBA4404 oder ATHV hatte keinen Einfluss auf die in *N. benthamiana* Pflanzen festgestellten BMV_{fl}-Agroinfectionsraten.

3.4.3 Mutagenese des BMV_{fl} zur Deletion von 5'-Fremdnukleotiden

Der Kontext zwischen dem CaMV 35S-Promotor und der viralen cDNA-Sequenz kann entscheidenden Einfluss auf die Infektiosität von viralen cDNA-Klonen haben. Befinden sich bei viralen cDNA-Klonen zwischen dem Transkriptionsstart und dem Beginn der viralen Sequenz Fremdnukleotide, wird die primär transkribierte RNA um die entsprechende Anzahl an Nukleotiden 5'-terminal verlängert. Dies hat möglicherweise einen Einfluss auf die Infektiosität von viralen *full-length* Klonen.

Der BMV_{fl} besitzt zwischen dem CaMV 35S-Transkriptionsstart und dem Beginn der viralen cDNA eine in der Klonierung verwendete *Asc* I Restriktionsschnittstelle. Diese Restriktionsschnittstelle führt zu sechs zusätzlichen Nukleotiden am 5'-terminalen Ende der primär transkribierten BMV_{fl}-RNA (Abbildung 3.12). Durch die Deletion dieser nicht-viralen Nukleotide sollte der Einfluss auf die BMV_{fl}-Infektionsrate untersucht werden.

Durch Hybridisierung der Oligonukleotide Mut1s und Mut1as wurde ein Dimer gebildet, das den ersten 37 bp (inklusive einer internen *Bst*AP I Restriktionsschnittstelle) der BMV_{fl} cDNA entspricht. Eine integrierte *Rsa* I Restriktionsschnittstelle ermöglichte die fremdnukleotidfreie Integration des Mut1-Fragmentes vor dem Transkriptionsstart eines CaMV 35S-Promotors. Das Mut1 DNA-Fragment wurde über *Rsa* I und *Xba* I an das 3'-Ende des CaMV 35S-Promotors im Vektor p616 angefügt. Nach einer Zwischenklonierung in pLitmus28 konnte der verdoppelte CaMV 35S-Promotor mit dem Mut1-Fragment über *Sna*B I und *Bst*AP I in den BMV_{fl} überführt werden und ergab *Asc*IΔBMV_{fl}. Wie bei der Klonierung des BMV_{fl} wurden auch für die Herstellung des *Asc*IΔBMV_{fl} Populationen aus Einzellsaten verwendet. Der *Asc*IΔBMV_{fl} wurde in den binären Vektor pBIN_SN überführt und in *A. tumefaciens* ATHV und LBA4404 elektroporiert. Es konnten sieben *Asc*IΔBMV_{fl} in *A. tumefaciens* LBA4404 Zellen überführt und ihre Infektiosität mittels Agroinfection getestet werden. Es ist nicht gelungen, die *Asc*IΔBMV_{fl} in *A. tumefaciens* Zellen des Stammes ATHV zu elektroporieren. Alle *Asc*IΔBMV_{fl}-Agroinokulationen wurden ausschließlich durch die zuvor beschriebene Infiltration der Agrobakteriensuspension in die Blattlamina durchgeführt.

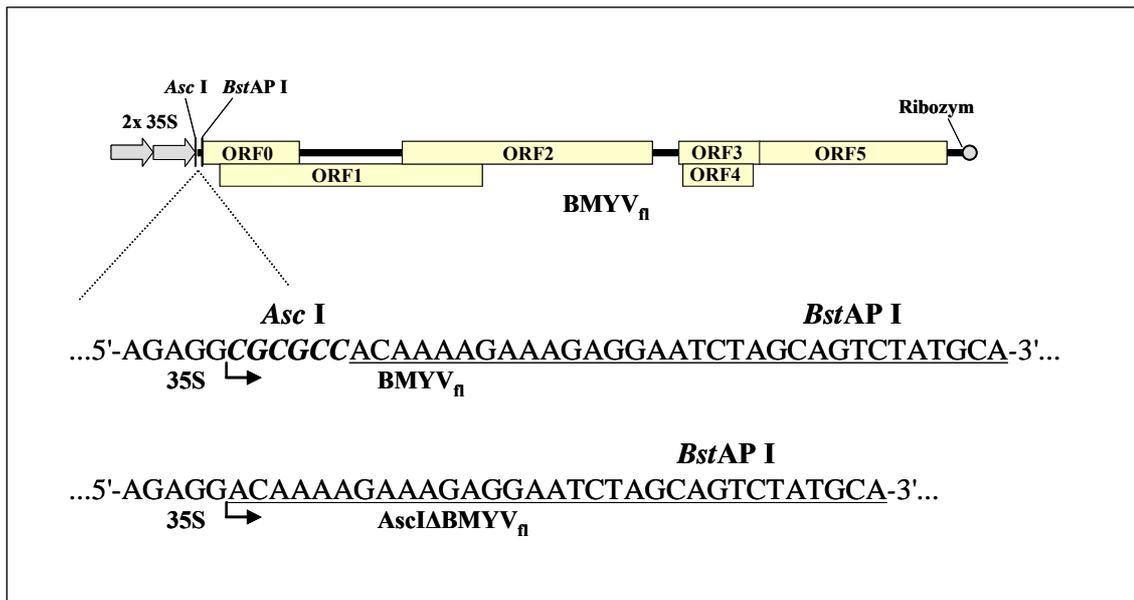


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des BMVYV_{fi} mit Ausschnitt der Region zwischen dem CaMV 35S-Promotor 3'-Terminus und dem Beginn der viralen Sequenz (unterstrichen). Der Transkriptionsstart (Pfeil) des AscIΔBMVYV_{fi} liegt nach Deletion von sechs 5'-Fremdnukleotiden (kursiv) am direkten BMVYV 5'-Terminus.

Der Nachweis von systemischen Infektionen durch den AscIΔBMVYV_{fi} erfolgte vier Wochen nach der Agroinokulation durch TPIA von Blattstielen, die oberhalb der Inokulationsstelle entnommen wurden. Von den sieben getesteten AscIΔBMVYV_{fi} konnte mit vier Klonen eine systemische Infektion etabliert werden. Nach Entfernung der unteren Blattepidermis von AscIΔBMVYV_{fi}-agroinokulierten *N. benthamiana* Pflanzen eine Woche nach der Agroinokulation konnten durch TPIA BMVYV-infizierte Mesophyllzellen detektiert werden. Durch den verbliebenen Gewebeabdruck auf der Nitrozellulosemembran waren einzelne BMVYV-infizierte Zellen aufgrund der violetten Färbung deutlich von nicht-infizierten Zellen abgegrenzt. Diese nicht-infizierten Zellen wurden auf der Membran als grün-braune Punkte identifiziert, die durch Abdrucke von Zellinhaltsstoffen entstehen. Bei AscIΔBMVYV_{fi}- und BMVYV_{fi}-Klonen, mit denen systemische Infektionen etabliert werden konnten, war ein Großteil der Mesophyllzellen infiziert (Abbildung 3.13, C). Bei der Untersuchung des agroinokulierten Gewebes von *N. benthamiana* Pflanzen, in denen keine systemische Infektion nachgewiesen wurde, konnten keine oder nur einzelne Cluster von infizierten Zellen detektiert werden. Eine großflächige Infektion von Mesophyllgewebe konnte in diesen Proben nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.13, A+B).

Tabelle 3.5: Übersicht über durchgeführte Agroinokulationen von *N. benthamiana* mit $\text{Asci}\Delta\text{BMV}_{\text{fi}}$ und BMV_{fi} und Anzahl mittels TPIA detektierter systemisch infizierter Pflanzen vier Wochen nach der Inokulation.

	Anzahl systemisch infizierter / Anzahl getesteter Pflanzen
$\text{Asci}\Delta\text{BMV}_{\text{fi}}$	
LBA4404_L388	0 / 3
LBA4404_L389	1 / 3
LBA4404_L390	0 / 3
LBA4404_L391	0 / 3
LBA4404_L392	3 / 3
LBA4404_L393	3 / 3
LBA4404_L395	2 / 3
BMV_{fi}	
LBA4404_L181	3/3

Der Nachweis einer durch TPIA von Blattstielen nachgewiesenen systemischen Infektion korrelierte mit einer im Agroinokulationsbereich festgestellten großflächigen Infektion von Mesophyllgewebe. Durch Untersuchung dieser Gewebeproben eine Woche nach der Inokulation konnten bereits Pflanzen selektiert werden, in denen nach vier Wochen eine systemische Infektion nachgewiesen wurde. Eine geringe Anzahl an infizierten Mesophyllzellen führte zu einer verminderten Infektionsrate (LBA4404_L389).

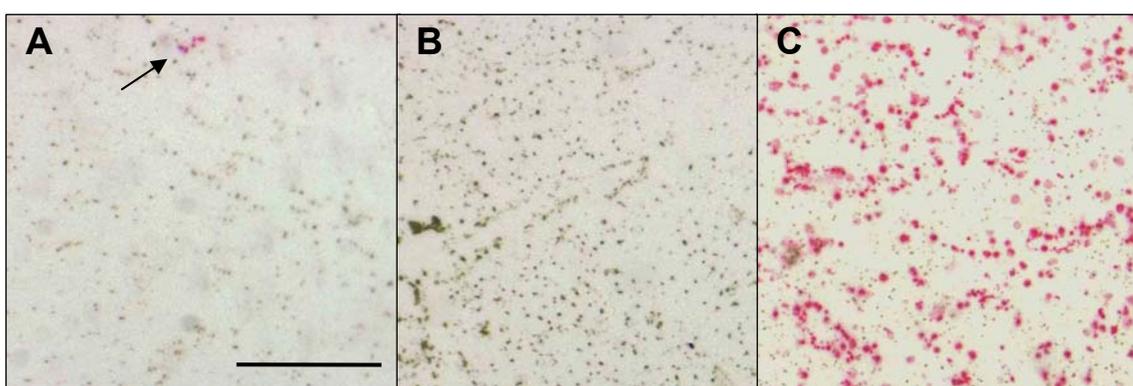


Abbildung 3.13: TPIA (Mab5G4) Aufnahmen von $\text{Asci}\Delta\text{BMV}_{\text{fi}}$ (A: LBA4404_L389; B: LBA4404_L388) und C: BMV_{fi} (LBA4404_L181) agroinokuliertem Mesophyllgewebe. Ein Cluster von infizierten Zellen ist durch den Pfeil gekennzeichnet (A). Der Größenstandard (A-C) entspricht 0,5 mm.

Die durchgeführten Optimierungsversuche zur Steigerung der BMVY_{fl}-Infektionsrate haben gezeigt, dass die höchsten Infektionsraten durch Injektion von infektiösen Klonen in die Blattlamina erreicht werden konnten. Sowohl mit dem *A. tumefaciens* Stamm ATHV als auch mit dem Stamm LBA4404 wurden mit dieser Methode Infektionsraten von 100% erreicht. Nach einer Deletion von 5'-terminalen Fremdnukleotiden im BMVY_{fl} konnten infektiöse AsclΔBMVY_{fl} selektiert werden, mit denen vergleichbare Infektionsraten erreicht wurden wie bei BMVY_{fl}-agroinfizierten *N. benthamiana*.

3.5 Blattlausübertragung des BMVY_{fl}

Für die biologische Charakterisierung des BMVY_{fl} wurde die Blattlausübertragbarkeit durch *Myzus persicae* untersucht. Hierzu wurde eine BMVY_{fl}-agroinfinzierte *N. benthamiana* (ATHV_L181) mit Blattläusen besetzt, die nach 42 Stunden auf verschiedene Testpflanzen übersiedelt wurden. Der Nachweis von systemischen BMVY-Infektionen erfolgte durch TPIA (Mab5G4) von Blattstielen sechs Wochen nach Aufsetzen der Blattläuse.

Der BMVY_{fl} ist, wie das BMVY-IPP Isolat, blattlausübertragbar und konnte erfolgreich auf verschiedene Testpflanzen übertragen werden. Es konnten BMVY-Infektionen in *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *B. vulgaris* und *C. bursa-pastoris* mittels TPIA von Blattstielen nachgewiesen werden.

Tabelle 3.6: Durch TPIA (Mab5G4) von Blattstielen nachgewiesene systemische BMVY-Infektionen in verschiedenen Testpflanzen nach Blattlausübertragung (*Myzus persicae*) von BMVY_{fl}-agroinfinzierten *N. benthamiana*.

Pflanzenfamilie und Pflanzenart	Anzahl BMVY _{fl} -infizierter / Anzahl Testpflanzen
<i>Solanaceae</i>	
<i>N. benthamiana</i>	2 / 4
<i>N. glutinosa</i>	0 / 4
<i>N. clevelandii</i>	1 / 4
<i>N. edwardsonii</i>	0 / 4
<i>Chenopodiaceae</i>	
<i>B. vulgaris</i>	4 / 4
<i>C. capitatum</i>	0 / 4
<i>Brassicaceae</i>	
<i>C. bursa-pastoris</i>	3 / 4

An BMYV_{fl}-infizierten *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *C. bursa-pastoris* und *B. vulgaris* konnten sechs Wochen nach der Blattlausübertragung Vergilbungssymptome an den älteren Blättern beobachtet werden. Die an BMYV-IPP/BYV mischinfizierten *B. vulgaris* festgestellte Raublättrigkeit (Kapitel 3.1) wurde an BMYV_{fl}-infizierten *B. vulgaris* nicht beobachtet. In *C. capitatum*, *N. glutinosa* und *N. edwardsonii* Pflanzen konnte durch TPIA keine Virusinfektion detektiert werden. Diese Versuchspflanzen waren sechs Wochen nach der Blattlausübertragung von virusfreien Pflanzen nicht zu unterscheiden.

Mit dem cDNA *full-length* Klon BMYV_{fl} konnten die gleichen Pflanzenarten infiziert werden, wie in Kapitel 3.1 bei einer BMYV-IPP/BYV Mischinfektion bereits dargestellt wurde. Zusätzlich konnten *N. clevelandii* als BMYV_{fl}-Wirtspflanze und *N. glutinosa* und *N. edwardsonii* als Nicht-Wirtspflanzen beschrieben werden.

3.6 Wirtspflanzendiagnose des BMYV_{fl} mittels Agroinfektion

Die natürliche Übertragung des Polerovirus BMYV erfolgt persistent über Blattlausvektoren wie *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* und anderen *Myzus*-Arten. Die Untersuchungen zur Bestimmung des BMYV-Wirtspflanzenspektrums erfolgte bisher durch Übertragung des Virus von einer BMYV-infizierten Spenderpflanze auf virusfreie Testpflanzen mittels Blattläusen. Mit dem Vorliegen des in dieser Arbeit erstellten BMYV_{fl} ist eine Infektion von *N. benthamiana* ohne die Verwendung von Blattläusen möglich (Kapitel 3.4). Durch Anwendung der Methode der Agroinfektion wurden 14 Pflanzenarten aus vier verschiedenen Familien mit dem BMYV_{fl} (ATHV_L181) agroinokuliert. Durch BMYV_{fl}-Agroinfektionen sollte das zuvor durch Blattlausübertragung festgestellte Wirtspflanzenspektrum (Kapitel 3.1 und 3.5) des BMYV_{fl} und BMYV-IPP überprüft werden.

Das durch BMYV_{fl}-Agroinfektionen, BMYV_{fl}⁻ und BMYV-IPP-Blattlausübertragungen festgestellte Wirtspflanzenspektrum wurde mit den in der Literatur beschriebenen Wirtspflanzenspektra verglichen. Von besonderem Interesse war dabei eine mögliche Agrobakterien-vermittelte Erweiterung des BMYV-Wirtspflanzenspektrums. Um eine Vergleichbarkeit der in der Literatur beschriebenen Spektra (siehe Anhang), die ausschließlich durch ELISA-Varianten (Stevens *et al.*, 1994; Graichen & Rabenstein, 1996; Mayo *et al.*, 2000 und Hauser *et al.*, 2002) oder Bonitur von Symptomen (Russel, 1965 und Björling & Nilsson, 1966) festgestellt wurden, zu gewährleisten, wurde BMYV in infizierten Pflanzen durch serologische Methoden nachgewiesen.

Die Testpflanzen wurden fünf Wochen (*Beta vulgaris* sieben Wochen) nach der Aussaat mit dem BMYV_{fl} ATHV_L181 agroinokuliert. Die Detektion einer erfolgreichen BMYV-Agroinfektion erfolgte 4-6 Wochen nach der Inokulation mittels DAS-ELISA

Tabelle 3.7: Übersicht über Ergebnisse der Wirtspflanzen diagnose des BMV_{fi} durch ATHV_L181-Agroinfection von verschiedenen Pflanzenarten. Der Nachweis einer systemischen Infektion erfolgte durch DAS-ELISA oder TPIA 4-6 Wochen nach der Agroinokulation.

Pflanzenfamilie und Pflanzenart	Anzahl BMV_{fi} agroinfizierter / Anzahl inokulierter Pflanzen	DAS-ELISA A_{415nm}
Solanaceae		
<i>Nicotiana benthamiana</i>	37 / 39*	0.79 [†] (0.13)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	3 / 12*	
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. 'Xanthi'	0 / 12*§	
<i>Nicotiana edwardsonii</i>	0 / 12*	
<i>Nicotina rustica</i>	0 / 12*	
<i>Nicotiana glutinosa</i>	0 / 12*	
<i>Nicotiana occidentalis</i>	0 / 12*§	
Chenopodiaceae		
<i>Beta vulgaris</i>	3 / 14*	1.75 (0.04)
<i>Chenopodium capitatum</i>	0 / 12§	0.11 (0.04)
<i>Chenopodium foliosum</i>	0 / 12	0.10 (0.01)
<i>Chenopodium quinoa</i>	0 / 12*	
Brassicaceae		
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	6 / 14	0.72 (0.21)
<i>Brassica napus</i>	0 / 11*	0.10 [‡] (0.01)
Lamiaceae		
<i>Lamium purpureum</i>	4 / 9*	

Gemittelte DAS-ELISA Extinktion von positiv getesteten Pflanzen (A_{415} nm, 2 h Inkubation) und Standardabweichung (in Klammern) sind angegeben.

* Infektionsrate ermittelt durch TPIA.

† Gemittelte DAS-ELISA Extinktionen von 6 Pflanzen; ‡ Gemittelte DAS-ELISA Extinktionen von 4 Pflanzen.

§ Untersuchung der Inokulationsstelle zeigt lokal infizierte Mesophyllzellen, aber es konnte keine systemische Infektion durch TPIA/DAS-ELISA festgestellt werden.

und/oder TPIA. Durch BMV_{fl}-Agroinfection konnten in Pflanzen aus vier verschiedenen Familien systemische Infektionen etabliert werden, die mittels serologischer Nachweisverfahren bestätigt wurden (Tabelle 3.7).

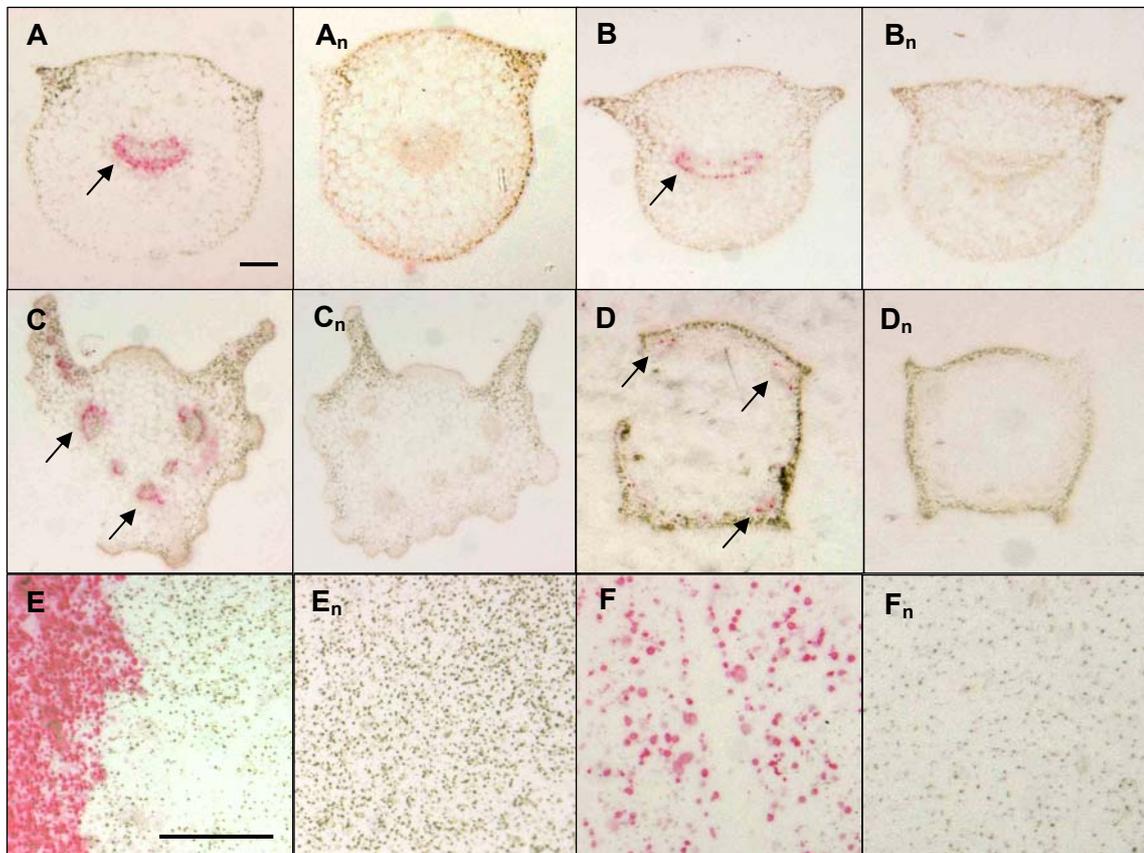


Abbildung 3.14: TPIA (MAb5G4) Aufnahmen von BMV_{fl}-agroinfiltrierten (A) *N. benthamiana*, (B) *N. clevelandii*, (C) *B. vulgaris* und (D) *L. purpureum* Blattstiel- oder Stängelquerschnitten mit entsprechenden Gewebeabdrücken nicht agroinfiltrierter Kontrollpflanzen (A_n-F_n). TPIA-Abdrucke von BMV_{fl}-agroinfiltriertem (links) und nicht inokuliertem (rechts) Mesophyllgewebe von (E) *B. vulgaris* und (F) *N. tabacum* cv. 'Xanthi'. Der Größenstandard (A-D und E+F) entspricht 1 mm. Die Pfeile zeigen Bereiche mit violetter Färbung an.

Die an *N. benthamiana* festgestellten hohen Infektionsraten konnten bei keiner anderen untersuchten Pflanzenart erreicht werden. Mit der optimierten Agroinfiltrationsmethode (Kapitel 3.4.1) konnte leicht die gesamte Blattfläche von *N. benthamiana* Pflanzen mit der Inokulationssuspension infiltriert werden. Eine großflächige Infiltration von Blattgewebe war insbesondere bei den inokulierten Pflanzenarten aus der Familie der Chenopodiaceae nicht möglich. Die aus diesem Grund durch mehrmaliges Ansetzen der Injektionsspritze durchgeführte Infiltration

vieler kleiner Gewebebereiche hat bei *B. vulgaris* nicht zu der bei *N. benthamiana* erreichten hohen BMVYV_{fl}-Infektionsrate geführt, obgleich eine große Anzahl BMVYV_{fl}-infizierter Mesophyllzellen im Inokulationsbereich nachgewiesen wurde (Abbildung 3.14, E). Das agroinfiltrierte Gewebe grenzt sich dabei deutlich von nicht infiltrierten Zellen ab (Abbildung 3.14, E).

In *N. tabacum* cv. 'Xanthi', *C. capitatum* und *N. occidentalis* konnten durch serologischen Nachweis keine systemischen BMVYV_{fl}-Infektionen festgestellt werden. Die TPIA-Abdrucke von agroinokuliertem Mesophyllgewebe zeigten jedoch, dass sowohl in *N. tabacum* cv. 'Xanthi' (Abbildung 3.14, F) als auch in *C. capitatum* und *N. occidentalis* eine lokale Infektion in einzelnen Zellen möglich ist. Solche infizierten Zellbereiche konnten bei *N. glutinosa* nicht nachgewiesen werden.

An BMVYV_{fl}-agroinfiltrierten *N. benthamiana* konnte frühestens nach drei bis vier Wochen der Beginn einer Vergilbung von Interkostalflächen im Bereich des Blattrandes von älteren Blättern beobachtet werden (Abbildung 3.15, A). Im Infektionsverlauf nahm die vergilbte Blattfläche zu und gleiche Symptome konnten auch an Blättern aus dem mittleren und oberen Stängelbereich festgestellt werden. Der Zeitpunkt des Auftretens und die Intensität der Vergilbungen variierte zwischen einzelnen BMVYV_{fl}-agroinfiltrierten Versuchspflanzen vier Wochen nach der Inokulation. Nach acht Wochen konnten aber bei allen BMVYV_{fl}-agroinfiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen Vergilbungssymptome bonitiert werden.

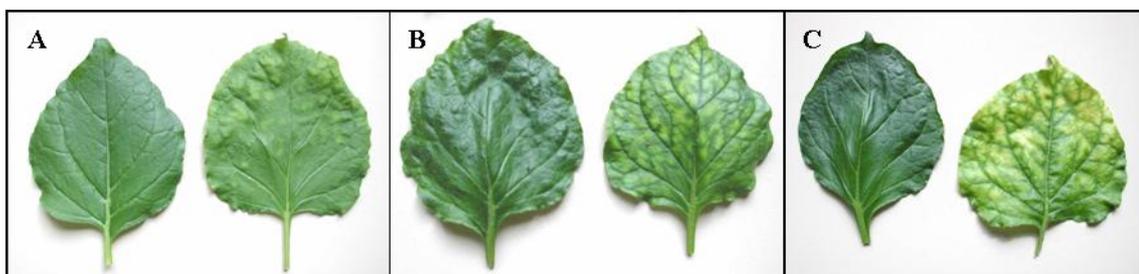


Abbildung 3.15: Vergilbungssymptome der Interkostalflächen an BMVYV_{fl}-agroinfiltrierten *N. benthamiana* (A) vier Wochen, (B) sechs Wochen und (C) acht Wochen nach der Inokulation im Vergleich zu symptomfreien Blättern von nicht infizierten *N. benthamiana* (jeweils links).

Diese Blattsymptome wurden auch bei BMVYV_{fl}- und BMVYV-IPP blattlausinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen festgestellt. Eine Vergilbung von älteren Blättern konnte auch an BMVYV_{fl}-agroinfiltrierten *N. clevelandii*, *C. bursa-pastoris* und *L. purpureum* diagnostiziert werden. An infizierten *C. bursa-pastoris* Pflanzen wurde ein Blattrollen der älteren Blätter beobachtet. Die BMVYV_{fl}-infizierten *B. vulgaris* Pflanzen zeigten unter

gegebenen Gewächshausbedingungen acht Wochen nach der Inokulation keine Symptome einer BMVYV-Infektion. Der Vergleich der durch BMVYV-IPP oder BMVYV_{f1} Blattlausübertragungen festgestellten Wirtspflanzenspektra (Kapitel 3.1 und 3.5) zeigt keine Unterschiede zu dem durch BMVYV_{f1}-Agroinfektionen ermittelten Wirtspflanzenspektrum (Tabelle 3.8). In allen Pflanzenarten, die durch Blattläuse erfolgreich BMVYV-infiziert werden konnten, war auch eine BMVYV_{f1}-Agroinfektion erfolgreich.

Tabelle 3.8: Vergleich der durch serologischen Nachweis festgestellten BMVYV-IPP- und BMVYV_{f1}-Wirtspflanzenspektra nach BMVYV_{f1}-Agroinfektion oder BMVYV-IPP und BMVYV_{f1}-Blattlausübertragung.

	BMVYV _{f1} - Agroinfektion	BMVYV _{f1} - Blattlaus	BMVYV-IPP Blattlaus
<u>Solanaceae</u>			
<i>N. benthamiana</i>	+	+	+
<i>N. clevelandii</i>	+	+	+
<i>N. tabacum</i> cv. 'Xanthi'	-	-	-
<i>N. edwardsonii</i>	-	-	-
<i>N. rustica</i>	-	-	-
<i>N. glutinosa</i>	-	-	-
<i>N. occidentalis</i>	-	-	-
<u>Chenopodiaceae</u>			
<i>B. vulgaris</i>	+	+	+
<i>C. capitatum</i>	-	-	-
<i>C. foliosum</i>	-	-	-
<i>C. quinoa</i>	-	-	-
<u>Brassicaceae</u>			
<i>C. bursa-pastoris</i>	+	+	+
<i>B. napus</i>	-	-	-
<u>Lamiaceae</u>			
<i>L. purpureum</i>	+	-	-

bei freien Feldern wurde die entsprechende Pflanzenart nicht getestet.

+ = Wirtspflanze; - = keine Wirtspflanze.

Die angewandte Methode der Agroinfektion führte nicht zu einer serologisch nachweisbaren Erweiterung des untersuchten Wirtspflanzenspektrums. Obwohl in den Pflanzenarten *N. tabacum* cv. 'Xanthi', *C. capitatum* und *N. occidentalis* im Inokulationsbereich lokale BMVYV_{f1}-Infektionen nachgewiesen wurden, führte dies nicht zu einer systemischen Ausbreitung des Virus.

3.7 Markierung des BMVY_{fi} mit dem *Green fluorescent protein* (GFP)

Der infektiöse BMVY_{fi} konnte mittels TPIA verstärkt im Phloembereich, aber auch in agroinokulierten Mesophyllzellen von infizierten Pflanzen nachgewiesen werden. Eine genaue Bestimmung aller infizierten Zelltypen und die Darstellung der Virusausbreitung vom Ort der Agroinfektion ist durch TPIA nicht möglich gewesen. Durch Markierung des BMVY_{fi} mit einem für die Detektion im Pflanzengewebe optimierten *Green fluorescent protein* (GFP) und der Darstellung durch ein Konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) sollte die Ausbreitung des BMVY_{fi} vom Inokulationsort verfolgt und die infizierten Zelltypen bestimmt werden. Die Integration der GFP-Markierung in den BMVY_{fi} cDNA Klon sollte an zwei verschiedenen Genombereichen erfolgen: (i) als 5'-terminale Erweiterung des ORF0 und (ii) als 3'-terminale Verlängerung des ORF2.

Das verwendete GFP wurde in zwei Konstrukten im gleichen Leserahmen um den funktionellen P2A-Sequenzbereich des *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV, Familie *Picornaviridae*, Genus *Aphthovirus*) erweitert. Die 16 Aminosäuren umfassende P2A-Sequenz ermöglicht unter natürlichen Bedingungen die Prozessierung des FMDV-Polypeptids zwischen dem C-terminalen Glycin-Rest der P2A-Sequenz und dem N-terminalen Prolin-Rest der nachfolgenden P2B-Sequenz in zwei unabhängige Proteine aus dem gleichen Leserahmen (Ryan *et al.*, 1991). Die Prozessierung erfolgt hierbei nicht durch Proteolyse eines Polyproteins, sondern durch einen sequenzabhängigen Ribosomensprung ohne Ausbildung einer Peptidbindung bei der Translation (Donnelly *et al.*, 2001a & 2001b). Dabei bewirkt die P2A-Sequenz die Hydrolyse einer Glycyl-tRNA-Esterbindung am C-Terminus der P2A-Sequenz, was zu einer Entlassung des bereits synthetisierten Polypeptids aus dem ribosomalen Translationskomplex führt. Die Translation der nachfolgenden Sequenz verläuft normal und wird N-terminal mit Prolin neu begonnen. Eine Integration des P2A-Sequenzbereiches ermöglicht die autoproteolytische Prozessierung von zwei unabhängigen in einem Leserahmen befindlichen Proteinen, die durch die P2A-Sequenz verbunden sind.

Für eine Markierung des BMVY_{fi} wurde eine P2A-GFP Sequenz in den BMVY_{fi} integriert. In der 5'P0-BMVY_{fi}GFP Variante wurde der funktionelle P2A-Sequenzbereich im gleichen Leserahmen an das 3'-Ende der GFP-Sequenz angefügt und vor dem ORF0 des BMVY_{fi} integriert. Bei der 3'REP-BMVY_{fi}GFP Variante wurde der P2A-Sequenzbereich an das 5'-Ende des GFP kloniert und an den BMVY_{fi} ORF2 im gleichen Leserahmen angehängt.

Soweit nicht unter 3.7.1 und 3.7.2 dargestellt, finden sich im Anhang detaillierte Übersichten über einzelne Klonierungsschritte.

3.7.1 Klonierung des 5'P0-BMYV_{fl}GFP

Die Integration des P2A-GFP zur Herstellung des 5'P0-BMYV_{fl}GFP erfolgte über eine *Bst*AP I Restriktionsschnittstelle, die am 5'-terminalen Ende des BMYV_{fl} ORF0 lokalisiert ist (Abbildung 3.16). Hierzu wurde der funktionelle P2A-Sequenzbereich durch Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide P2 1 und P2 2 hergestellt (siehe Anhang) und das Dimer über die integrierten *Bam*H I und *Xba* I Restriktionsschnittstellen in den Vektor pSport (p1000/9) überführt. Aus p1000/9 wurde der P2A-Sequenzbereich über *Bam*H I und *Xba* I 3'-terminal an das GFP in dem zur Verfügung gestellten Vektor p996 angefügt. Nach Restriktionsspaltung mit *Bsp*1407 I (innerhalb der GFP-Sequenz) und *Ksp*A I (innerhalb der P2A-Sequenz), einer Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym und Ligation der glatten Enden, befanden sich die GFP- und funktionelle P2A-Sequenz im gleichen Leserahmen. Die Überführung beider Sequenzen in den gleichen Leserahmen bedingte die C-terminale Deletion eines GFP Lysin-Rests.

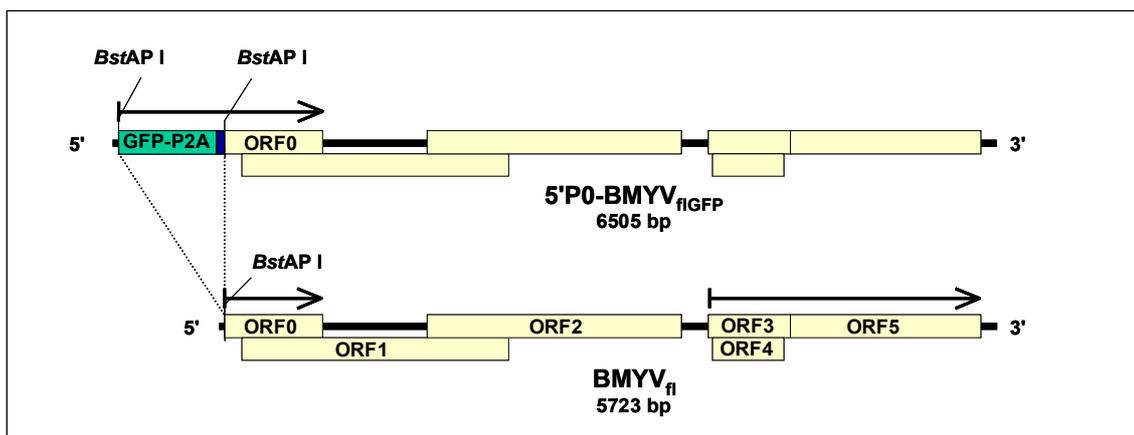


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der GFP-Insertionen zur Herstellung der 5'P0-BMYV_{fl}GFP durch Insertion einer GFP-P2A Sequenz in die BMYV_{fl}-interne *Bst*AP I-Restriktionsschnittstelle.

Der GFP-P2A Sequenzbereich wurde unter Verwendung der Oligonukleotide BMYVP0GFPs und BMYVGFP0as in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden so erstellt, dass die Integration des GFP-P2A Fragments in eine *Bst*AP I Restriktionsschnittstelle im BMYV_{fl} innerhalb des gleichen Leserahmens an das 5'-terminale Ende des ORF0 erfolgen konnte. Die Integration der GFP-P2A Sequenz führte dabei zu einer C-terminalen Verlängerung des GFP um 16 Aminosäuren aus der P2A-Sequenz und zu einer N-terminalen Verlängerung des P0 um 5 Aminosäuren (Abbildung 3.18, B).

Da eine Insertion des *BstAP* I-Fragments in *sense*- oder *antisense*-Orientierung möglich war, erfolgte eine Überprüfung der Orientierung durch Restriktionsspaltung. Es konnten zwei 5'P0-BMYV_{flGFP} (L254 und L255) selektiert werden, in denen das GFP-P2A Fragment in *sense*-Orientierung im gleichen Leserahmen vor den BMYV_{fl} ORF0 integriert war.

3.7.2 Klonierung des 3'REP-BMYV_{flGFP}

Die Klonierungsstrategie für die Herstellung des 3'REP-BMYV_{flGFP} basierte auf zwei nur einmal im BMYV_{fl} vorkommenden Restriktionsschnittstellen: Einer *Mro* I am 3'-terminalen Ende des ORF2 und einer *Eco47* III im Überschneidungsbereich der ORF3/4. Über diese Restriktionsschnittstellen wurde nach Modifikation des ORF2 Stopkodon die P2A-GFP Sequenz an das 5'-terminale Ende des ORF2 angefügt.

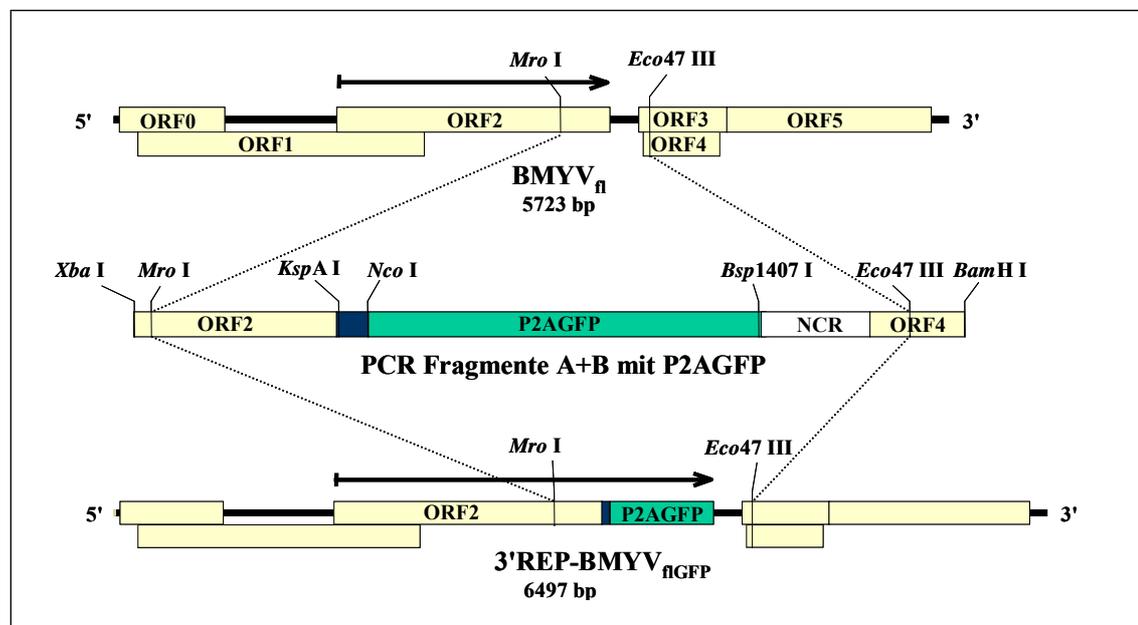


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der P2A-GFP Integration im 3'REP-BMYV_{flGFP} über die BMYV_{fl} internen Restriktionsschnittstellen *Mro* I und *Eco47* III.

Zu diesem Zweck wurde mittels PCR und Verwendung der Oligonukleotide BMYVREPs und BMYVREP2 am BMYV_{fl} ein Fragment amplifiziert, das eine im ORF2 lokalisierte *Xba* I und *Mro* I und das um eine *KspA* I, *Bsp1407* I und *BamH* I verlängerte 3'-terminale Ende des ORF2 umfasste. Dieses PCR-Fragment A wurde über *Xba* I und *BamH* I in den Vektor pT7T318U überführt. Das durch Verwendung der Oligonukleotide BMYVEco47s und BMYVEco47as am BMYV_{fl} amplifizierte PCR-Fragment B umfasste nach einer über BMYVEco47s integrierten *Bsp1407* I den BMYV_{fl} Sequenzbereich ab dem ORF2 Stopkodon bis zu der im ORF3/4 lokalisierten

Eco47 III und eine *BamH I* Restriktionsschnittstelle. Das Fragment B wurde über *Bsp1407 I* und *BamH I* an das PCR-Fragment A im Vektor pT7T318U kloniert. Der Vektor enthielt nun die *BMV_{fl}* Sequenz von der im ORF2 liegenden *Mro I* bis zu einer im ORF3/4 liegenden *Eco47 III*, wobei sich über die an den ORF2 angefügten *KspA* und *Bsp1407 I* Restriktionsschnittstellen ein P2A-GFP Fragment im gleichen Leserahmen einfügen ließ. Für die Integration des P2A-GFP Fragments wurde aus dem zur Verfügung gestellten p996 über *Nco I* und *Xba I* das GFP N-terminal an den funktionellen P2A-Sequenzbereich im p1000/9 im gleichen Leserahmen angehängt und ergab p1003. Aus p1003 konnte nun ein P2A-GFP Fragment über *KspA I* und *Bsp1407 I* in den pT7T318U mit den PCR Fragmenten A und B als Verlängerung des ORF2 Leserahmens integriert werden. Durch Verwendung der internen *Mro I* und *Eco47 III* Restriktionsschnittstellen konnte der um das P2A-GFP verlängerte Sequenzbereich des ORF2 in den *BMV_{fl}* kloniert werden (Abbildung 3.17). Durch die Integration des P2A-GFP wurde das durch den ORF2 kodierte P2 (bzw. P1/P2 Fusionsprotein) C-terminal um 17 Aminosäuren der P2A-Sequenz verlängert und das GFP N-terminal um 2 Aminosäuren erweitert (Abbildung 3.18, A). Nach Durchführung der Klonierung konnten vier 3'REP-*BMV_{fl}*_{GFP} (L309-L312) selektiert werden.

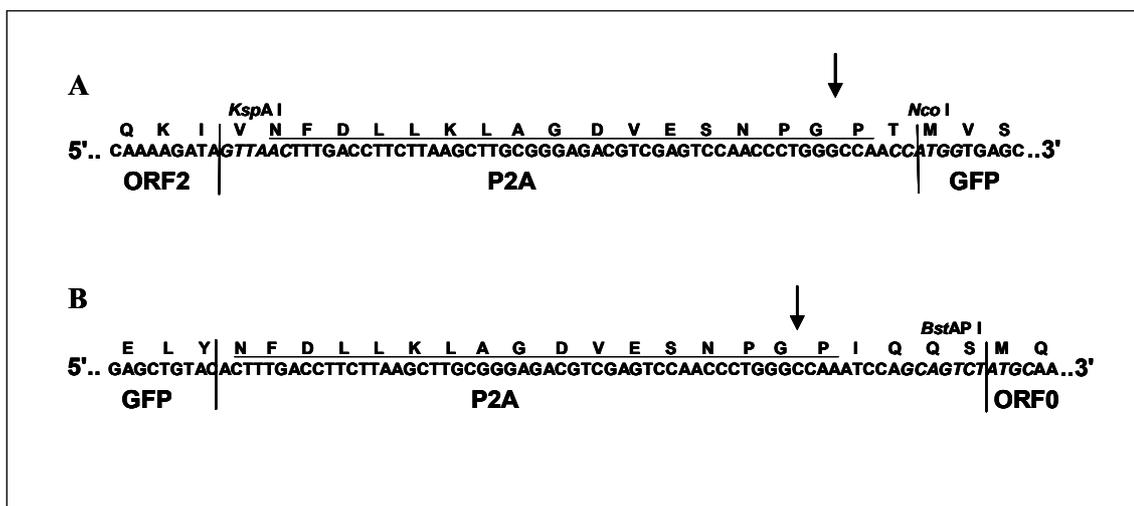


Abbildung 3.18: Ausschnitt aus dem das P2A umfassenden Sequenzbereich des A: 3'REP-*BMV_{fl}*_{GFP} und B: 5'P0-*BMV_{fl}*_{GFP}. Die putative P2A-Prozessierungsstelle (Ribosomensprung) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.8 Infektionstestungen mit den GFP-markierten *BMV_{fl}*

Die selektierten GFP-markierten *BMV_{fl}*-Varianten 5'P0-*BMV_{fl}*_{GFP} und 3'REP-*BMV_{fl}*_{GFP} wurden nach *SnaB I* und *Not I* Restriktionsspaltungen in den binären Vektor pBIN_SN integriert. Es konnten ein in den pBIN_SN als T-DNA klonierter 3'REP-

BMV_fGFP (L320) und ein 5'P0-BMV_fGFP (L321) selektiert werden. Mittels Elektroporation wurden L320 und L321 in *A. tumefaciens* LBA4404 Zellen überführt. Durch die Methode der Agroinfection wurden *N. benthamiana* Pflanzen mit beiden GFP-markierten BMV_f agroinokuliert. Zusätzlich wurde in einem Versuch der 3'REP-BMV_fGFP zusammen mit dem systemisch infizierenden BMV_f agroinokuliert. In diesen mischinokulierten Pflanzen sollte der BMV_f als 'Helfervirus' eine mögliche, aufgrund der GFP-Integration an die Replikase, herabgesetzte oder gestörte Replikation ausgleichen.

Der Nachweis von systemischen Infektionen erfolgte mittels TPIA, DAS-ELISA und RT-PCR. Durch TPIA von Mesophyllzellen im Bereich der Inokulationsstelle sollten infizierte Zellbereiche serologisch nachgewiesen werden. Die Detektion und Darstellung von GFP-markierten Zellen ist in Zusammenarbeit mit C. Dietrich (IPP, Universität Hannover) am CLSM durchgeführt worden.

Nach Agroinokulation konnten mit keinem der beiden GFP-markierten BMV_fGFP systemische Virusinfektionen in *N. benthamiana* etabliert werden (Tabelle 3.9). Durch TPIA von Blattstielen oberhalb des Inokulationsbereiches konnte keine systemische Infektion mit dem 5'P0-BMV_fGFP und 3'REP-BMV_fGFP nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Inokulationsbereiches durch TPIA zeigte jedoch, sowohl bei 5'P0-BMV_fGFP als auch bei 3'REP-BMV_fGFP, dass in einigen Mesophyllzellen BMV_f-Hüllprotein vorhanden war (Abbildung 3.19, F).

Tabelle 3.9: Übersicht über durchgeführte *N. benthamiana* Agroinokulationen mit 5'P0-BMV_fGFP und 3'REP-BMV_fGFP und Nachweis von systemischen Virusinfektionen mittels TPIA (Mab5G4).

	Anzahl systemisch infizierter / Anzahl agroinokulierter
5'P0-BMV _f GFP LBA4404_L321	0 / 13
3'REP-BMV _f GFP LBA4404_L320	0 / 30
3'REP-BMV _f GFP + BMV _f	5 / 5
BMV _f LBA4404_L181	4 / 4

Bei Untersuchungen von agroinfiziertem Blattgewebe durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass in Epidermiszellen im Agroinokulationsbereich des 5'P0-BMV_fGFP und des 3'REP-BMV_fGFP eine GFP-Expression

stattgefunden hatte (Abbildung 3.19, A-D). Diese stark fluoreszierenden Zellen waren nur innerhalb des agroinokulierten Blattgewebes nachweisbar und deutlich von autofluoreszierenden Epidermiszellen zu unterscheiden.

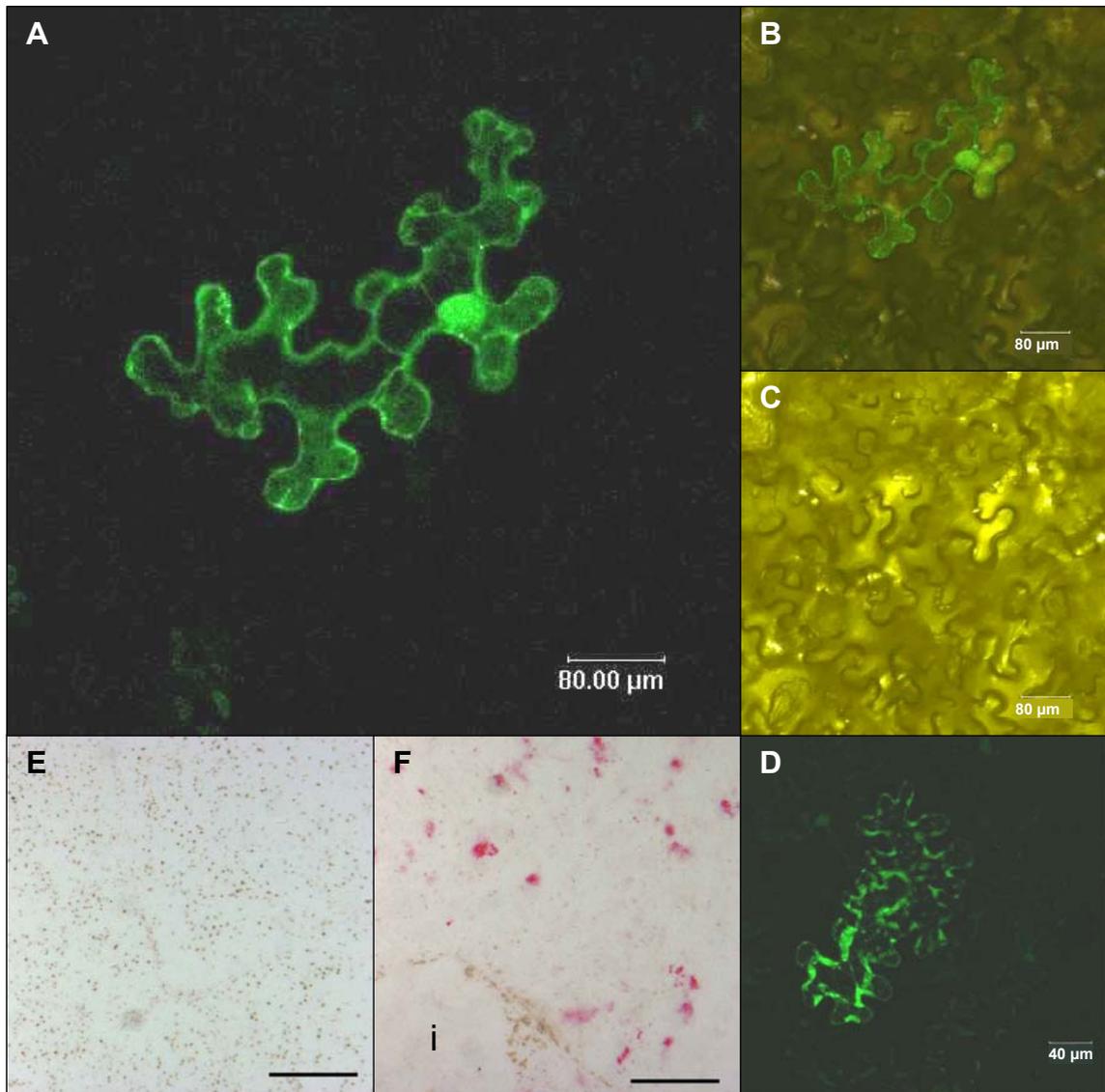


Abbildung 3.19: 5'P0-BMYV_{flGFP} und 3'REP-BMYV_{flGFP} infizierte *N. benthamiana* Epidermiszellen nach Agroinfektion. A-C: CLSM-Aufnahme acht Tage nach Agroinfektion von 5'P0-BMYV_{flGFP} infizierter GFP-markierter Epidermiszelle mit GFP-Anregung (A), als Durchlichtpräparat (C) und A+C im Overlay (B). D: Zwei durch 3'REP-BMYV_{flGFP} GFP-markierte Epidermiszellen. E-F: TPIA zum Nachweis von BMVY-Hüllprotein im Inokulationsbereich 14 Tage nach Agroinfektion des 3'REP-BMYV_{flGFP} (F) und nicht-inokuliertes Epidermisgewebe (E) (i bezeichnet die Ansatzposition der Injektionsspritze, Größenstandard 1mm (E+F)).

Im Vergleich zu der Anzahl von Mesophyllzellen, in denen Hüllprotein durch TPIA nachgewiesen werden konnte, waren diese GFP-markierten Zellen in geringerer Anzahl detektierbar. So konnten in einem Inokulationsbereich von 1 cm² nur durchschnittlich 1-2 deutlich GFP-markierte Epidermiszellen nachgewiesen werden. In keinem anderen Gewebe außerhalb des Agroinokulationsbereiches wurde GFP-Fluoreszenz detektiert. Nach der gemeinsamen Inokulation (eine Inokulationssuspension) des 3'REP-BMYV_{flGFP} und BMYV_{fl} konnte zwar in allen agroinfizierten *N. benthamiana* eine systemische BMYV_{fl}-Infektion nachgewiesen werden, jedoch wurde außerhalb der Inokulationsstelle keine GFP-Fluoreszenz detektiert. Nach RNA-Extraktion von Blattstielen oberhalb der Inokulationsstelle und RT-PCR mit GFP-spezifischen Oligonukleotiden konnte sechs Wochen nach der Agroinokulation keine systemische 3'REP-BMYV_{flGFP}-Infektion in den fünf untersuchten *N. benthamiana* nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Dagegen wurde mit BMYV-spezifischen Oligonukleotiden in der RT-PCR das bei einer BMYV_{fl}-Infektion erwartete Fragment mit einer Länge von 490 bp amplifiziert.

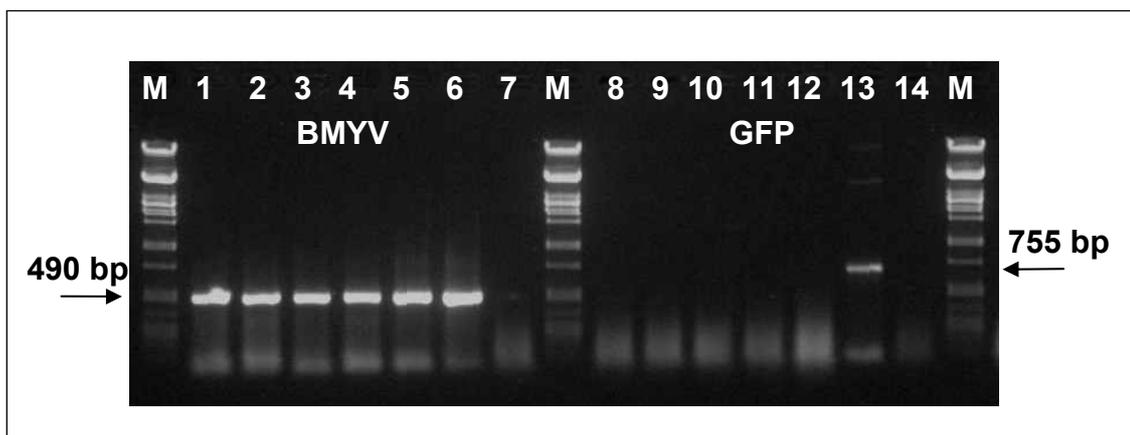


Abbildung 3.20: Systemischer Virusnachweis durch RT-PCR mit BMYV-(BMYVP0s/BMYVP0as, Spur 1-7) und GFP-spezifischen (Aflllgfps/Aflllgfps, Spur 8-14) Oligonukleotiden nach Gesamt-RNA Extraktion aus fünf BMYV_{fl}/3'REP-BMYV_{flGFP} mischinokulierten *N. benthamiana* Pflanzen sechs Wochen nach Agroinokulation. M: λ -PstI DNA-Standard; Positivkontrolle BMYV: RNA aus BMYV-infizierter *B. vulgaris* (Spur 6); Positivkontrolle GFP: Plasmid-DNA L320; Negativkontrolle RNA aus nicht infizierter *N. benthamiana* (Spur 7+14).

Sowohl mit dem 5'P0-BMYV_{flGFP} als auch mit dem 3'REP-BMYV_{flGFP} konnten in *N. benthamiana* Zellen lokal im Inokulationsbereich infiziert werden. Im Vergleich zu BMYV_{fl}-Agroinfektionen war die Anzahl an infizierten Zellen in diesem Bereich allerdings geringer (Vergleich Abbildung 3.13, C). Durch die Integration der GFP-

Sequenz in den infektiösen BMV_{fi} wird möglicherweise die Fähigkeit zur Replikation herabgesetzt, aber nicht vollkommen unterbunden. Eine systemische Ausbreitung der beiden GFP-markierten BMV_{fi} war allerdings nicht nachweisbar.

3.9 Herstellung und Selektion von *BMV Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* Linien

Der infektiöse BMV_{fi} wurde mittels Agrobakterien-vermittelter Blattscheiben-transformation in das Genom von *N. benthamiana* integriert. Nach einer Inkubation der Blattscheiben mit BMV_{fi} rekombinanten ATHV_L181 Zellen und anschließender Gewebekultur konnten vier T_0 -Pflanzen (Mutterpflanzen) auf kanamycinhaltigem Medium selektiert werden. Die Überprüfung der erfolgreichen Integration des BMV_{fi} als Transgen erfolgte nach Gesamt-DNA Extraktion durch PCR mit BMV spezifischen Oligonukleotiden. Der serologische Nachweis von BMV -Infektionen in transgenen Mutterpflanzen erfolgte mittels DAS-ELISA.

Tabelle 3.10: DAS-ELISA Absorptionsmesswerte und Standardabweichungen (in Klammern) aus Blattstielproben der *BMV Amplicon*-transgenen T_0 -Mutterpflanzen drei Wochen nach Akklimatisierung an Gewächshausbedingungen mit Vergleichswerten von BMV -infizierten und virusfreien *N. benthamiana*.

Testpflanzen	DAS-ELISA Messwerte	
	(A_{415nm})	
T_0 220A	0,475	(0,04)
T_0 220B	0,423	(0,02)
<i>BMV</i> -Blattlaus infizierte <i>N. benthamiana</i>	0,188	(0,01)
virusfreie <i>N. benthamiana</i>	0,050	(0,00)
T_0 221A	0,132	(0,02)
T_0 221B	0,119	(0,01)
BMV_{fi} -transgene Pflanze der Linie 220.02.13	0,937	(0,04)
virusfreie <i>N. benthamiana</i>	0,190	(0,01)

T_0 220A+B und T_0 221A+B Absorptionsmesswerte aus zwei getrennten Messungen.

Während in allen vier T_0 -Pflanzen der BMV_{fi} durch PCR mit den ORF0-spezifischen Oligonukleotiden $BMVVP_0s$ und $BMVVP_0as$ nachgewiesen werden konnte, wurden in

Blattstielproben der Mutterpflanzen 220A und 220B positive DAS-ELISA Werte festgestellt.

In den T₀-Pflanzen 221A und 221B, die zu einem späteren Zeitpunkt aus der Gewebekultur selektiert werden konnten, war mittels DAS-ELISA keine Infektion detektierbar. Durch die Agrobakterien-vermittelte Transformation konnten zwei T₀-Pflanzen (220A und 220B) selektiert werden, die den BMVYV_{fl} als Transgen nachweisbar exprimieren. In den T₀ Pflanzen 221A und 221B war die Transgenexpression unterbunden oder so stark reduziert, dass ein serologischer Nachweis mittels DAS-ELISA nicht möglich war. Von allen vier aus der Gewebekultur selektierten T₀-Pflanzen wurden Samen geerntet und die T₁- und T₂-Generationen weiter analysiert.

3.9.1 Genetische Analyse der BMVYV Amplicon-transgenen *N. benthamiana* T₁- und T₂- Linien

Nach Selbstung konnte von allen vier T₀-Pflanzen Samen geerntet und die resultierenden Linien 220.01 (aus T₀ 220A), 220.02 (aus T₀ 220B), 221.01 (aus T₀ 221A) und 221.02 (aus T₀ 221B) weiter analysiert werden. Dies erfolgte zum einen durch den serologischen Nachweis der Expression des BMVYV_{fl} Hüllproteins mittels DAS-ELISA, TPIA und Western-Blot Analyse und zum anderen durch eine Bestimmung der Transgenkopienanzahl und Segregation durch Southern-Hybridisierung und Selektion von Sämlingen aller vier Linien auf kanamycinhaltigem MS-Medium.

3.9.1.1 Analyse der BMVYV_{fl}-Expression in transgenen T₁-Pflanzen

Nach Gesamt-Protein Extraktion aus transgenen Pflanzen aller vier T₁-Linien und Western-Blot Analyse konnte durch serologischen Nachweis mit MAb5G4 nur bei transgenen Pflanzen der Linien 220.01 und 220.02 ein Protein zwischen 20-25 kDa und ein Signal bei ~75 kDa detektiert werden (Abbildung 3.21, Spalte 1 und 2). Durch Verwendung des Hüllprotein-spezifischen Antiserums Mab5G4 konnten diese Proteine als BMVYV Hüllprotein (~22 kDa) und als ORF3/5 Fusionsprotein (*read through* Protein, ~74 kDa) identifiziert werden. Das ORF3/5 Fusionsprotein konnte in geringerer Konzentration nachgewiesen werden als das Genprodukt des ORF3 alleine. Der spezifische Proteinnachweis war bei transgenen Pflanzen der Linien 221.01 und 221.02 (Abbildung 3.21, Spalte 3 und 4) nicht erfolgreich. Wie bei den beiden T₀-Linien bereits durch DAS-ELISA festgestellt, findet auch bei T₁-Pflanzen dieser beiden Linien

keine durch Western-Blot Analyse nachweisbare Expression des BMV_{f1} Hüllproteins statt.

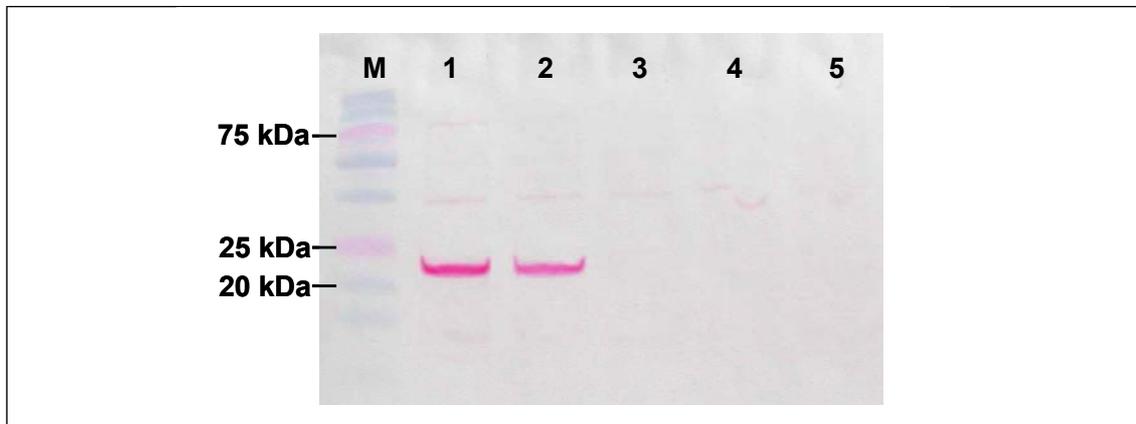


Abbildung 3.21: Western-Blot Analyse (Mab5G4) nach Gesamt-Protein Extraktion und Auftrennung in einem 15%igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgel aus BMV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen der Linien 220.01 (Spur 1), 220.02 (Spur 2), 221.01 (Spur 3), 221.02 (Spur 4) und einer nicht transgenen *N. benthamiana* Linie 27/1 (Spur 5). M = *prestained dual color* Proteinmarker (Biorad).

3.9.1.2 Segregationsanalyse von BMV *Amplicon*-transgenen T₁- und T₂-Pflanzen

Für die Bestimmung der Segregation innerhalb der T₁-Linien wurde die Anzahl von resistenten (Kn^R) und sensitiven (Kn^S) Sämlingen auf kanamycinhaltigem MS-Medium bestimmt. Durch TPIA von Blattstielen sollten die Ergebnisse der Kanamycin-Selektion (*npt II*-Nachweis) verifiziert werden und einen Hinweis auf die vollständige Integration der T-DNA geben. Durch Anwendung des Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstests ist die festgestellte Segregation mit möglichen Aufspaltungen verglichen worden. Die nach der Agrobakterien-vermittelten Pflanzentransformation selektierten Mutterpflanzen (T₀) sollten einen heterozygoten T-DNA Status besitzen. Nach der zweiten Mendelschen Regel wurde in der Nachkommenschaft (T₁), bei der Integration von einer Transgenkopie, eine Aufspaltung bezüglich der T-DNA von 1:2:1 (3:1 Phänotyp) erwartet. Bei einer Integration von zwei T-DNA Kopien musste eine 15:1, bei drei Insertionen eine 63:1 (usw.) erwartet werden.

Die Selektion der Sämlinge auf kanamycinhaltigem Medium zeigte für die Linien 220.02, 221.01 und 221.02 eine 3:1 (Kn^R:Kn^S) Aufspaltung (Tabelle 3.11). Diese 3:1 Segregation wurde für die Linie 220.02 auch durch serologischen Nachweis bestätigt.

Trotz der durch Kanamycinselektion festgestellten Aufspaltung konnte in keiner Pflanze der T₁-Linien 221.01 und 221.02 die Expression des BMV_{fl} mittels TPIA bestätigt werden. Dagegen wurde in der Segregationsanalyse der Linie 220.01 sowohl durch Kanamycinselektion als auch durch serologischen Nachweis eine abnormale Mendelsche 1:2 Aufspaltung der Nachkommenschaft (Kn^R:Kn^S und Ser^P:Ser^N) durch den Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest statistisch nachgewiesen.

Tabelle 3.11: Segregationsanalyse durch Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest mit Yates-Korrektur der BMV_{fl} Amplicon-transgenen *N. benthamiana* T₁-Linien und nicht transgenen *N. benthamiana* (Linie 27/1) durch serologischen Nachweis und Selektion von Sämlingen auf kanamycinhaltigem Medium.

	T ₁ 220.01	T ₁ 220.02	T ₁ 221.01	T ₁ 221.02	27/1
Kn-Selektion	550:1055	316:102	165:63	264:96	0:284
Kn ^R :Kn ^S	$\chi^2 = 0,62$ 1:2	$\chi^2 = 0,10$ 3:1	$\chi^2 = 0,76$ 3:1	$\chi^2 = 0,50$ 3:1	$\chi^2 = \text{n.d.}$
Serologischer Nachweis	20:38 ⁽¹⁾	46:15 ⁽¹⁾	0:35 ⁽¹⁺²⁾	0:35 ⁽¹⁺²⁾	0:34 ⁽²⁾
Ser ^P :Ser ^N	$\chi^2 = 0,04$ 1:2	$\chi^2 = 0,01$ 3:1	$\chi^2 = \text{n.d.}$	$\chi^2 = \text{n.d.}$	$\chi^2 = \text{n.d.}$

⁽¹⁾ TPIA; ⁽²⁾ DAS-ELISA; Chi-Quadrat Test $\chi^2_{1;0,05;Tab.} = 3,84$

n.d.: nicht durchgeführt; Kn^R: Kanamycin-resistent; Kn^S: Kanamycin-sensitiv;
Ser^P: DAS-ELISA/TPIA positiv; Ser^N: DAS-ELISA/TPIA negativ.

Von zwei T₁-Pflanzen der Linie 220.01 und einer Pflanze der Linie 220.02 wurde nach Selbstung der Samen geerntet und die Segregation der T₂-Pflanzen auf kanamycinhaltigem Medium untersucht. Nach Auszählung der Kanamycin-resistenten und Kanamycin-sensitiven Sämlinge konnten die homozygot dominante Linie 220.02.13 und die aufspaltenden Linien 220.01.06 und 220.01.12 selektiert werden (Tabelle 3.12).

Da alle Sämlinge der Linie 220.02.13 normales Wachstum auf kanamycinhaltigem Medium zeigten und auch in allen durch TPIA untersuchten Pflanzen eine Expression des Transgens nachgewiesen werden konnte, wurde die Linie 220.02.13 als homozygot dominant für das BMV_{fl}-Transgen und das *npfl*-Gen eingestuft. Die bei der Kanamycinselektion der Sämlinge ausgezählte 1:3 Segregation der T₂- Linie 220.01.06 und die 2:1 Aufspaltung der Linie 220.01.12 wurde auch durch serologischen Nachweis bestätigt. Einige Sämlinge der Linie 220.01.12 zeigten einen Phänotyp zwischen Kn^R (deutlich grün) und Kn^S (chlorophyllfrei). Da sie aber offensichtlich eine, wenn auch weniger stark ausgeprägte, Kanamycinresistenz

zeigten, wurden sie als Kn^R eingestuft (Tabelle 3.12). Wie zuvor bei der T₁-Linie festgestellt, zeigten auch die Nachkommen eine abnormale Mendelsche Aufspaltung. Die homozygote Linie 220.02.13 wurde für Versuche zur Erhöhung des BMYV-Virustiter durch Ko-Infektion (Kapitel 3.11) verwendet. Mit den Linien 220.01.06 und 220.01.12 wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Tabelle 3.12: Segregationsanalyse durch Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest mit Yates-Korrektur der T₂-Linien 220.02.13, 220.01.06 und 220.01.12 nach Selektion von Sämlingen auf kanamycinhaltigem Medium.

	T ₂ 220.02.13	T ₂ 220.01.06	T ₂ 220.01.12
Kn-Selektion	1740:0	336:1040	1009:489 ⁽²⁾
Kn ^R :Kn ^S	χ ² = n.d.	χ ² = 0,26 1:3	χ ² = 0,31 2:1
Serologischer Nachweis ⁽¹⁾	25:0	5:25	18:12
Ser ^P :Ser ^N	χ ² = n.d.	χ ² = 1,38 1:3	χ ² = 0,54 2:1

Chi-Quadrat Test $\chi^2_{1;0,05;Tab.} = 3,84$; ⁽¹⁾ TPIA ⁽²⁾ als Kn^R wurden auch Sämlinge mit einem Phänotyp zwischen Kn^R und Kn^S gezählt, die einzelne chlorophyllfreie Blätter aufwiesen. n.d.= nicht durchgeführt; Kn^R = Kanamycin-resistent; Kn^S = Kanamycin-sensitiv.

3.9.1.3 Southern-Blot Analyse zur Ermittlung der Anzahl von T-DNA Insertionen in BMYV *Amplicon*-transgenen Linien

Die durchgeführten Segregationsanalysen gaben nur einen ersten Hinweis auf die Anzahl der in das pflanzliche Genom integrierten T-DNA Kopien. Da durch die Agrobakterien-vermittelte Pflanzentransformation aber auch multiple oder unvollständige T-DNA Insertionen möglich waren die durch Segregationsanalysen nicht nachweisbar sind, wurde eine Southern-Blot Analyse von transgenen Pflanzen durchgeführt. Zusätzlich sollte die in der Linie 220.01 und ihren untersuchten T₂ Nachkommen festgestellte abnormale Mendelsche Aufspaltung weiter analysiert werden.

Für die Southern-Blot Analyse wurde die pflanzliche DNA extrahiert und mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* V verdaut. Für den Nachweis der DNA-Fragmente wurden DIG-markierte Sonden mit zwei verschiedenen Zielsequenzen verwendet. Um sicherzustellen, dass der gesamte BMYV_{fl} als T-DNA in das Pflanzengenom integriert

war, wurde eine für den CaMV 35S-Promotor (DIG-35S, 829 bp) und eine für das *npfl*-Gen (DIG-*npfl*) spezifische Sonde hergestellt.

Die in das Pflanzengenom integrierte transgene Sequenz entspricht der aus dem binären Vektor stammenden T-DNA, die durch die linke und rechte Bordersequenz begrenzt wird. Die DNA-Sonden und das Restriktionsenzym zum Verdau der pflanzlichen DNA wurden so gewählt, dass bei der Southern-Blot Analyse nur Fragmente abgebildet wurden, die der Anzahl der inserierten Kopien entsprachen. Nur wenn sich an den T-DNA Integrationsort im pflanzlichen Genom direkt an der linken bzw. rechten Border eine *EcoR V* Restriktionsschnittstelle anschließt, würden bei einer kompletten T-DNA Integration Fragmentlängen von 1409 bp (DIG-35S) und 1360 (DIG-*npfl*) nachgewiesen werden. In allen anderen Fällen würde sich die Fragmentlänge um den Abstand von der jeweiligen Border bis zur ersten *EcoR V* im pflanzlichen Genom verlängern.

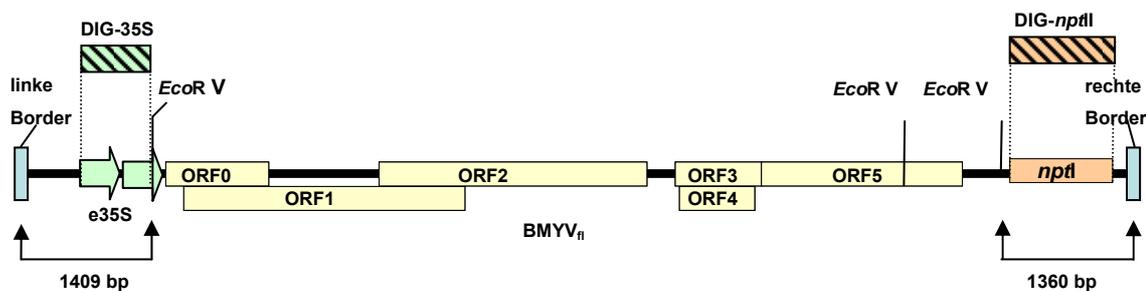


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der T-DNA zwischen deren linker und rechter Bordersequenz der CaMV 35S-Promotor, der *BMV_{fl}* und das *npfl*-Gen lokalisiert sind. Die Zielsequenzen der DIG-markierten Sonden DIG-35S oder DIG-*npfl* (schraffiert) und die minimal erwarteten Fragmentlängen bei Insertion direkt an eine pflanzliche *EcoR V* sind angegeben.

Für eine erste Southern-Blot Analyse (ohne Abbildung) wurden durch TPIA transgene Pflanzen der Linien 220.01, 220.02, 221.01, 221.02 und der homozygoten Linie 220.02.13 selektiert. Nach Restriktionsspaltung der pflanzlichen DNA durch *EcoR V* wurden alle Proben mit der DIG-35S Sonde hybridisiert. Bei den Linien 220.02, 221.01, 221.02 und 220.02.13, bei denen in der Segregationsanalyse eine 3:1 ($\text{Kn}^{\text{R}}:\text{Kn}^{\text{S}}$) festgestellt wurde, konnte nach Hybridisierung mit DIG-35S jeweils ein Fragment detektiert werden. In der Linie 220.01, die eine abnormale Mendelsche Segregation zeigte, wurden vier Transgenkopien nachgewiesen, von denen mindestens eine aktiv sein musste. Als homozygote T_2 -Linie besitzt die Linie 220.02.13 die Transgeninsertion am gleichen Loci wie die T_1 -Linie 220.02, was zu identischen Fragmentlängen in der Southern-Blot Analyse führte. Auch die T_1 -Linien 221.01 und

221.02 zeigten identische Fragmentlängen, weshalb davon ausgegangen werden musste, dass es sich nicht um verschiedene Linien, sondern um zwei Klone aus einem Transformationsereignis handelte.

In zwei weiteren Southern-Blot Analysen wurde die mit *EcoR* V verdaute pflanzliche DNA aus transgenen Pflanzen der Linien 220.01, 221.01 und 220.02.13 erneut mit der DIG-35S Sonde und zusätzlich mit der DIG-*npfl* Sonde hybridisiert (Abbildung 3.23). Beide Sonden zeigten keine Hybridisierungsreaktion mit der extrahierten DNA von nicht-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 27/1 (Abbildung 3.23, Spur 4). Da die Hybridisierungsreaktion mit der DIG-35S und der DIG-*npfl* Sonde bei der Linie 221.01 jeweils ein Fragment zeigte (Abbildung 3.23, Spur 3), besitzt diese Linie vermutlich eine vollständige Kopie des Transgens. Die Annahme einer dominant wirkenden Einzelkopie-Integration wurde durch die 3:1-Segregation von Sämlingen auf kanamycinhaltigem Medium bestätigt, eine Expression des BMVY_{fl} konnte aber nicht nachgewiesen werden. Bei den Linien 220.01 (Abbildung 3.23, Spur 1) und 220.02.13 (Abbildung 3.23, Spur 2) war die Anzahl der durch die DIG-35S oder DIG-*npfl* Sonden nachgewiesenen Kopienzahl verschieden.

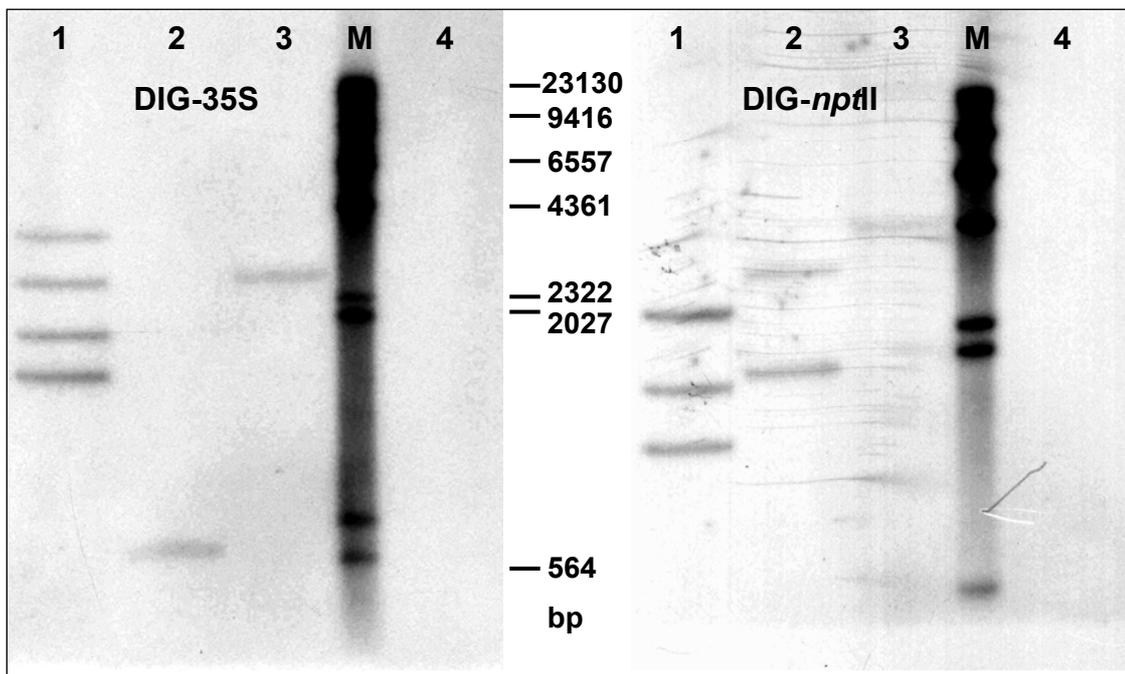


Abbildung 3.23: Southern-Blot Analyse der Linien 220.01 (Spur 1), 220.02.13 (Spur 2), 221.01 (Spur 3) und einer nicht-transgenen *N. benthamiana* der Linie 27/1 (Spur 4) nach Restriktionsspaltung der pflanzlichen DNA durch *EcoR* V und Hybridisierung mit den DIG-markierten Sonden DIG-35S und DIG-*npfl*. M=DIG-markierter DNA Längenstandard II (Roche) mit Angabe der Fragmentlängen (gilt für DIG-*npfl* Hybridisierung entsprechend).

Die Linie 220.02.13 besitzt vermutlich zwei unvollständige T-DNA Kopien an einem oder zwei Loci: eine Kopie, die einen verdoppelten 35S-Promotor und das *npflI*-Gen enthält und eine Kopie, die keine Zielsequenz der DIG-35S Sonde, aber das *npflI*-Gen enthält (Abbildung 3.24, A). Aufgrund der festgestellten 3:1 Segregation ist bei einer Integration an zwei Loci nur ein integriertes *npflI*-Gen aktiv oder beide *npflI*-Kopien, von denen mindestens eine aktiv ist, liegen am gleichen Locus wie der exprimierte *BMVYV_{fl}* vor. Das bei der Linie 220.02.13 durch DIG-35S nachgewiesene Fragment besaß eine Länge von ~650 bp und war damit kürzer als es bei einer Insertion der T-DNA mit dem vollständigen Bereich bis zu der linken Bordersequenz erwartet wurde (min. 1409 bp, Abbildung 3.22). Da die verdoppelte CaMV 35S-Promotorsequenz im *BMVYV_{fl}* eine Länge von 659 bp umfasst, liegt sie aber vermutlich vollständig an diesem Integrationsort vor. Die bei dieser Linie durch die DIG-*npflI* Sonde detektierten Fragmente von ~1800 bp und ~3300 bp zeigen eine vollständige Integration der T-DNA von der internen *EcoR V*-Restriktionsschnittstelle bis zur rechten Bordersequenz (min. 1360 bp, Abbildung 3.22) an.

Die Linie 220.01 besitzt vermutlich vier vollständige T-DNA Kopien, von denen zwei an einem Locus als Verdopplung in inverser Symmetrie (*inverted repeat*) organisiert sind (Abbildung 3.24, B). An diesem Integrationsort können zwei Bereiche der rechten Border, die nahe aneinander liegen und durch das Fehlen einer pflanzlichen *EcoR V* Erkennungssequenz zwischen beiden Kopien nicht getrennt werden, durch Hybridisierung mit der DIG-*npflI* Sonde als ein Fragment dargestellt werden. Die bei einer Integration als inverse Verdopplung erwartete Fragmentlänge von mindestens 2720 bp (2 x 1360 bp, Abbildung 3.22) konnte für das längste Fragment bei der DIG-*npflI* Hybridisierung angenommen werden (Abbildung 3.23, Spur 1).

Bei der Hybridisierung mit der DIG-35S Sonde wurde daher die tatsächlich vorliegende Anzahl von vier T-DNA Insertionen durch Fragmente mit einer Länge von ~3900 bp, ~2400 bp, ~1800 bp und ~1500 bp und bei der Hybridisierung mit der DIG-*npflI* Sonde nur eine Anzahl von drei T-DNA Insertionen durch Fragmente mit einer Länge von ~2700 bp, ~1700 bp und ~1400 bp abgebildet. Alle durch Hybridisierung mit DIG-35S oder DIG-*npflI* festgestellten Fragmente besaßen die Mindestlänge, die eine vollständige T-DNA Insertion im Bereich der linken Bordersequenz (min. 1409 bp) oder rechten Bordersequenz (min. 1330 bp) anzeigt.

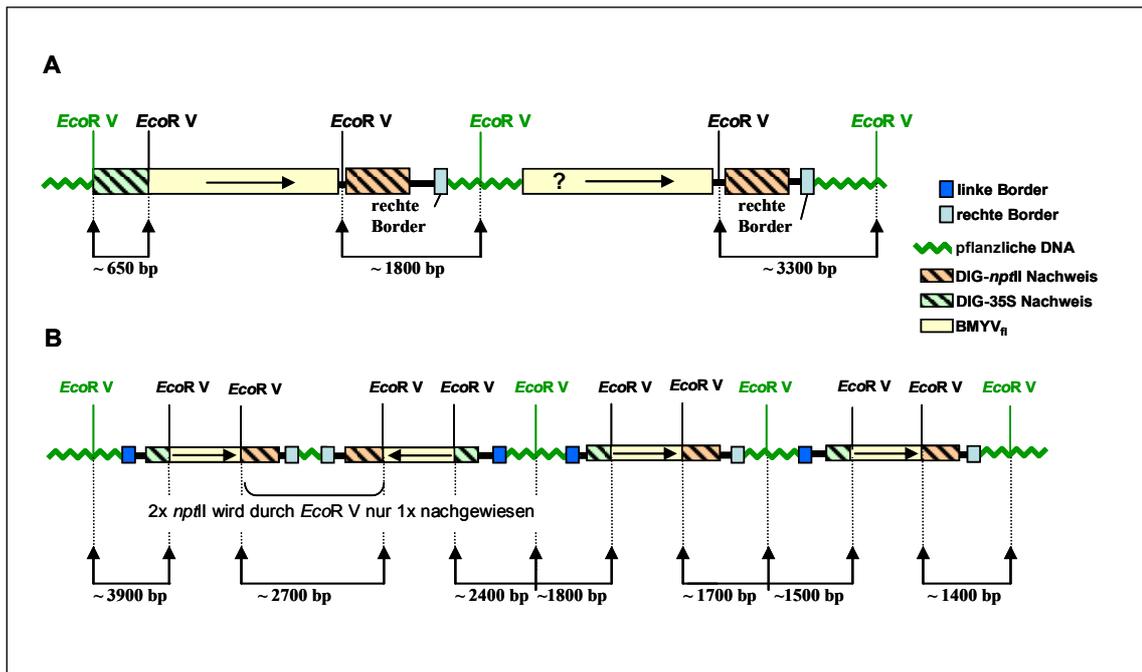


Abbildung 3.24: Modelle von möglichen Anordnungen der T-DNA Kopien in den BMYV_{fl}-transgenen Linien mit beispielhafter Zuordnung der durch Southern-Blot Analyse mit den Sonden DIG-35S oder DIG-*npfl* festgestellten Fragmentlängen (Abbildung 3.23): (A) Linie 220.02.13 mit zwei unvollständigen T-DNA Kopien an einem oder zwei Loci: ohne linke Borderregionen, einer Kopie mit CaMV 35S-Promotor und beide Kopien mit *npfl*-Sequenz. (B) Linie 220.01 mit vier durch DIG-35S nachweisbaren T-DNA Kopien an vermutlich verschiedenen Loci. Durch eine *inverted repeat* Insertion ohne eine trennende pflanzliche *EcoR V*-Restriktionsschnittstelle werden nur drei *npfl*-Sequenzbereiche nachgewiesen.

3.9.2 Vergleich des Virustiter der BMYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana*-Linien 220.01 und 220.02.13

Die selektierte BMYV_{fl}-transgene T₁-Linie 220.01 mit vier Transgenkopien und die homozygote T₂-Linie 220.02.13 mit einer Transgenkopie des BMYV_{fl} wurden auf Unterschiede in ihrem BMYV-Virustiter getestet. Hierzu wurde von transgenen Pflanzen beider Linien der Virustiter in Blattstielen aus dem mittleren Stängelbereich mittels DAS-ELISA bestimmt.

Wie in Abbildung 3.25 dargestellt, konnten zwischen transgenen Pflanzen einer Linie deutliche Variationen im BMYV-Virustiter festgestellt werden. Innerhalb beider Linien wurden zwischen einzelnen Pflanzen bis zu viermal höhere Absorptionswerte gemessen. Trotz der Unterschiede innerhalb der Linien konnte nach statistischer

Überprüfung zwischen beiden Linien kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,356$).

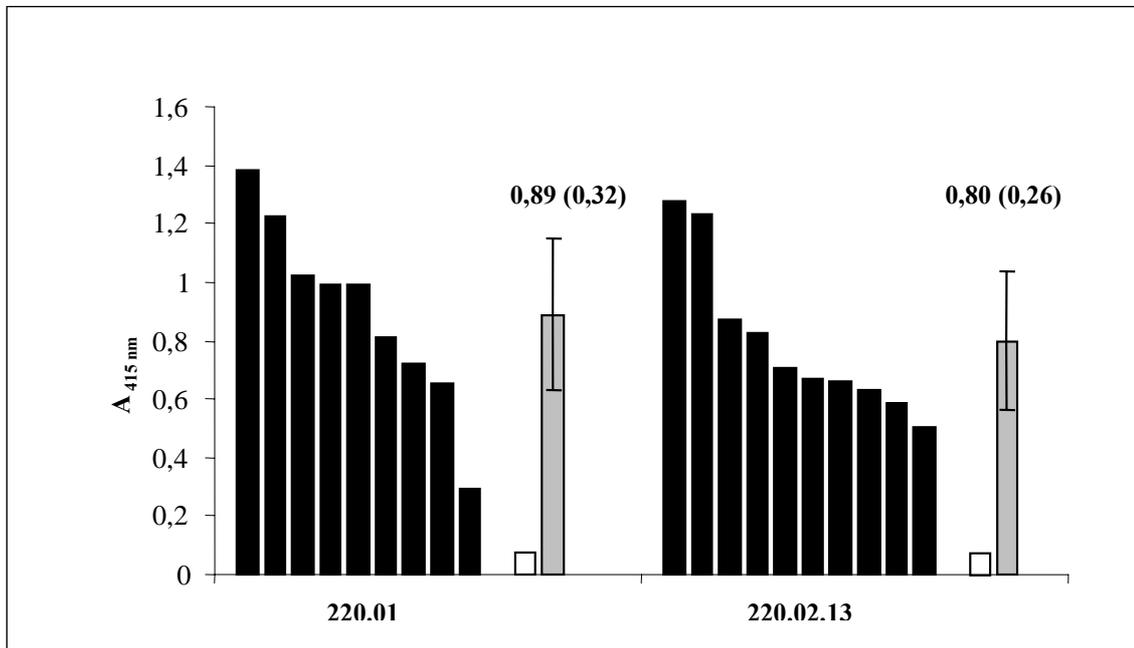


Abbildung 3.25: DAS-ELISA Absorptionsmesswerte aus Blattstielen von einzelnen transgenen Pflanzen acht Wochen nach Aussaat (schwarz) der Linien 220.01 (n=9) und 220.02.13 (n=10) im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle (n=2, weiss). Der graue Balken zeigt die gemittelte Absorption der transgenen Linien mit der Angabe der Standardabweichung (in Klammern).

Die vierfache Integration des BMV_{fl} als Transgen in der Linie 220.01 führte nicht zu höheren Absorptionsmesswerten und war mit den Messwerten von Pflanzen der homozygoten Linie 220.02.13, mit zwei Transgenkopien, von denen nur eine einen vollständigen CaMV 35S-Promotor besitzt, vergleichbar. Beide Linien wurden für Versuche zur Erhöhung des Virustiters durch Ko-Infektion verwendet (siehe Kapitel 3.11).

3.10 Lokalisierung von BMYV-infizierten Zellen in BMYV *Amplicon*-transgenen, -agroinfizierten und Blattlaus infizierten *N. benthamiana*

Die Ausbreitung des Polerovirus BMYV innerhalb seiner Wirtspflanzen ist, wie bei allen anderen Luteoviren, vornehmlich auf das Phloemgewebe beschränkt. Diese natürliche Phloemlimitierung ist möglicherweise mit dem Fehlen einer Movementfunktion in Geweben außerhalb des Phloems und/oder einer ungenügenden

Unterdrückungsmöglichkeit eines pflanzlichen Abwehrmechanismus im nicht-vaskulären Gewebe begründet.

In den BMV_{fl} -transgenen *N. benthamiana*-Linien besitzt jede Pflanzenzelle das Potential das virale Genom zu exprimieren und dadurch mit BMV_{fl} infiziert zu werden. Die Untersuchung von Mesophyllzellen, Blattstiel- und Stängelquerschnitten an BMV_{fl} -transgenen Pflanzen mittels TPIA sollte mögliche Unterschiede in der Anzahl von BMV_{fl} -infizierten Pflanzenzellen außerhalb des Phloems im Vergleich zu BMV_{fl} -agroinfizierten oder über Blattläuse (*Myzus persicae*) BMV_{fl} -infizierten *N. benthamiana* aufzeigen.

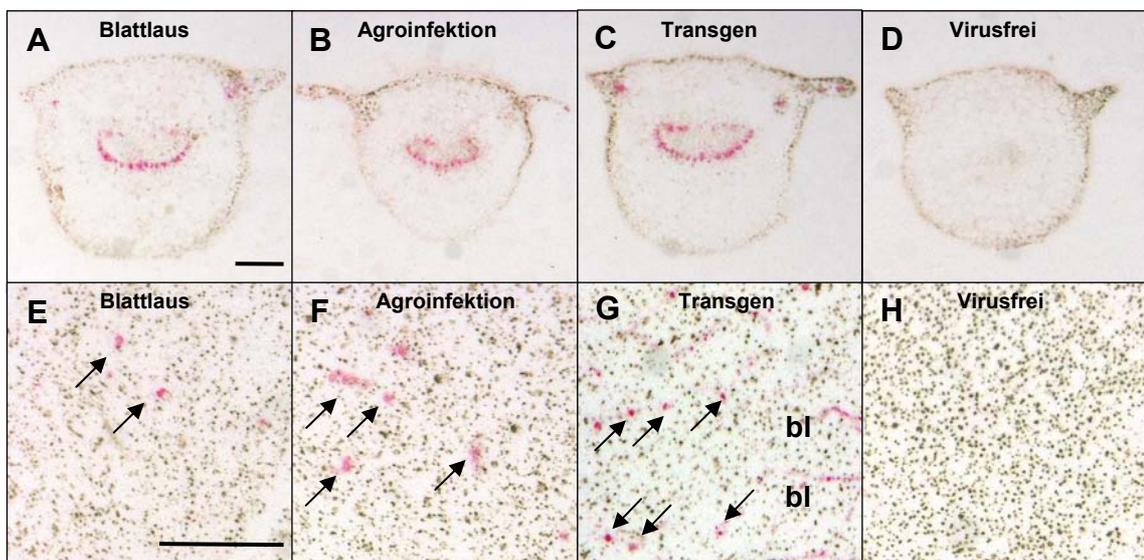


Abbildung 3.26: TPIA (MAb5G4) Aufnahmen von Blattstielen (oben) und Mesophyllgewebe (unten) von durch *Myzus persicae* BMV_{fl} -infizierten (A+E), BMV_{fl} -agroinfizierten (B+F), *Amplicon*-transgenen (C+G) und nicht infizierten (D+H) *N. benthamiana* Pflanzen. Rotgefärbte Bereiche zeigen BMV_{fl} -infiziertes Phloemgewebe (A-C) oder BMV_{fl} -infizierte Mesophyllzellen (E-G, Pfeile) an. Abdrucke von Blattadern dritter Ordnung sind gekennzeichnet (bl). Der Größenstandard (A-D und E-H) entspricht 1 mm.

Bei Untersuchungen von Stängel- und Blattstielquerschnitten von BMV_{fl} -agroinfizierten, -transgenen (Linie 220.02.13) und über *Myzus persicae* BMV_{fl} -infizierten *N. benthamiana* Pflanzen konnten BMV_{fl} -infizierte Zellen detektiert werden (Abbildung 3.26, A-C). Die serologische Markierung des Virusantigens und Detektion durch Fast Red-Naphtol in TPIA-Untersuchungen zeigte deutlich violett gefärbtes Pflanzengewebe im Bereich der Leitbündel (vermutlich im Phloemgewebe). In keinem der über 200 analysierten TPIA von Blattstielen konnten BMV_{fl} -infizierte Zellen

außerhalb dieses Gewebebereiches detektiert werden. In virusfreien *N. benthamiana* wurden solche distinkt gefärbten Zellbereiche nicht festgestellt (Abbildung 3.26, D). Nach Entfernung der unteren Blattepidermis von BMV_{fl}-transgenen Pflanzen der Linie 220.02.13 konnten durch TPIA infizierte Mesophyllzellen nachgewiesen werden. Obwohl jede Zelle den BMV_{fl} als Transgen enthält, war in einem Großteil der Mesophyllzellen keine BMV_{fl}-Infektion durch TPIA nachweisbar. Nach TPIA von Mesophyllgewebe der BMV_{fl}-transgenen, BMV_{fl}-agroinfizierten, über Blattlaus BMV_{fl}-infizierten und nicht infizierten *N. benthamiana* Pflanzen (jeweils 6-10 cm²) wurde die Anzahl von BMV_{fl}-infizierten und virusfreien Zellen bestimmt. Die auf der Membran nachweisbaren Spuren von Blattadern (Abbildung 3.26, G) wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt. In jeder BMV_{fl}-infizierten Pflanze konnten infizierte Mesophyllzellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.26, E-G), allerdings variierte die Anzahl dieser infizierten Zellen zwischen den Varianten. In virusfreien Kontrollpflanzen wurde nie eine Rotfärbung von Zellen beobachtet (Abbildung 3.26, D+H). Während in über Blattlaus infizierten *N. benthamiana* eine von 3786 Mesophyllzellen infiziert war, zeigte in der BMV_{fl}-transgenen Linie 220.02.13 eine von 678 Mesophyllzellen eine violette Färbung. In agroinfizierten Pflanzen konnten dreimal mehr BMV_{fl}-infizierte Mesophyllzellen (eine von 1397) gezählt werden, als in über Blattlaus infizierten *N. benthamiana*. Im Großteil des analysierten Mesophyllgewebes konnte in allen Varianten kein BMV_{fl} durch TPIA detektiert werden.

3.11 Ko-Infektion von BMV_{fl} Amplicon-transgenen *N. benthamiana* mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2

Durch eine Ko-Infektion von BMV_{fl} Amplicon-transgenen Pflanzen mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2 sollte ein möglicher Einfluss dieser Mischinfektion auf den BMV_{fl}-Virustiter in verschiedenen Pflanzengeweben untersucht werden. Hierbei wurde der BMV_{fl}-Virustiter in Ko-infizierten und nicht Ko-infizierten Pflanzen mittels DAS-ELISA und die Anzahl BMV_{fl}-infizierter Mesophyllzellen im Vergleich zu der Anzahl virusfreier Zellen durch TPIA bestimmt. Für die Untersuchung wurden Pflanzen der Linien 220.01 und 220.02.13 in verschiedenen Experimenten Ko-infiziert.

3.11.1 Ko-Infektion der Linie 220.01 mit PVY oder BYV

In einem ersten Experiment wurden BMV_{fl} Amplicon-transgene *N. benthamiana* der Linie 220.01 sechs Wochen nach der Aussaat mit PVY oder BYV mechanisch Ko-infiziert. Hierbei wurden bei jeder Pflanze 2 Blätter aus dem mittleren Stängelbereich für die Inokulation ausgewählt.

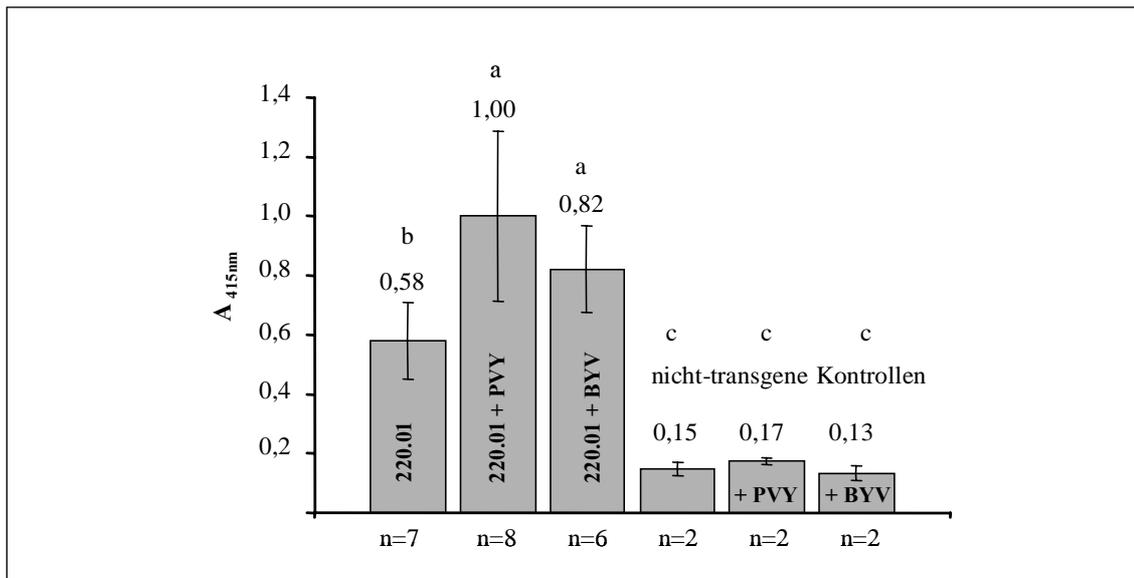


Abbildung 3.27: Gemittelte BMV DAS-ELISA Absorptionswerte aus Blattstielproben von BMV *Amplicon*-transgenen Pflanzen der Linie 220.01 drei Wochen nach Ko-Infektion mit PVY oder BYV und Vergleichswerte von nicht-transgenen *N. benthamiana*. Die Buchstaben a-c zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten (Mann-Whitney-U-Test).

Nach einer (PVY) bzw. drei Wochen (BYV) konnten an Ko-infizierten transgenen Pflanzen typische Virussymptome festgestellt werden, die aber von PVY- bzw. BYV-infizierten nicht-transgenen Kontrollpflanzen nicht zu unterscheiden waren. Für eine Untersuchung des BMV-Titers wurden von diesen Pflanzen drei Wochen nach der Inokulation Blattstiele aus dem mittleren Stängelbereich, oberhalb der inokulierten Blätter, für den DAS-ELISA entnommen.

Im Vergleich zu nicht Ko-infizierten transgenen Kontrollpflanzen wurde sowohl in PVY als auch in BYV Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.01 ein signifikant höherer BMV-Titer in Blattstielproben festgestellt (Mann-Whitney-U-Test: +PVY und +BYV, $p < 0,001$). In PVY Ko-infizierten transgenen Pflanzen wurde ein knapp doppelt so hoher BMV-Titer nachgewiesen als in nicht Ko-infizierten transgenen Pflanzen (Abbildung 3.27).

Diese Ergebnisse wurden auch durch elektronenoptische Untersuchungen von PVY Ko-infizierten transgenen Pflanzen bestätigt. Die Auszählung von BMV-Partikeln im Pflanzenpresssaft aus Blattstielen dieser Pflanzen durch Dr. Lesemann (BBA, Braunschweig) zeigte eine stark erhöhte Anzahl von Viruspartikeln (100-1000 Partikel pro Aufnahme bei 37000x) im Vergleich zu nicht Ko-infizierten Kontrollpflanzen (10-100 Partikel pro Aufnahme bei 37000x). Auf den elektronenoptischen Aufnahmen konnten zahlreiche isometrische BMV-Viruspartikel mit einer Größe von ~30 nm abgebildet werden (siehe Abbildung 3.28, A+B). Der serologische Nachweis durch Detektion der

Partikel mit BWYV-IgG in ISEM-Präparaten (Abbildung 3.28, B) war erfolgreich. Neben BMVYV-Viruspartikeln konnten auch Partikel des Ko-infizierten PVY elektronenoptisch nachgewiesen werden.

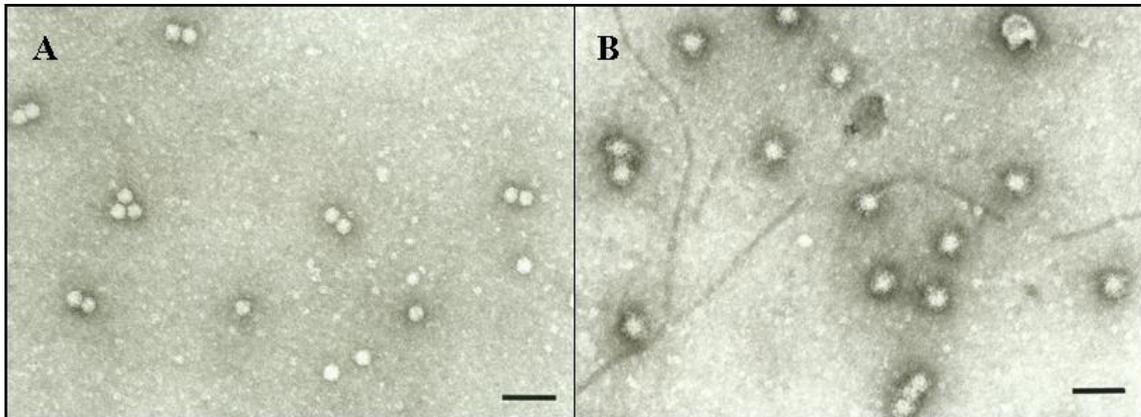


Abbildung 3.28: Elektronenoptische Aufnahmen von BMVYV-Partikeln aus PVY Ko-infizierten und nicht Ko-infizierten BMVYV_{fl}-transgenen *N. benthamiana*: (A) undekoriertes Präparat mit BMVYV-Partikeln aus nicht Ko-infizierten transgenen *N. benthamiana*, (B) BWYV-IgG dekoriertes Präparat mit BMVYV- und PVY-Partikeln aus PVY Ko-infizierten transgenen *N. benthamiana*. Der Größenstandard entspricht 100 nm.

3.11.2 Ko-Infektion der Linie 220.02.13 mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2

In einem zweiten Experiment wurde untersucht, ob ein durch Ko-Infektion induzierter erhöhter BMVYV-Virustiter nur in Blattstielen oder auch in anderen Blattgeweben festzustellen ist. Hierzu wurden BMVYV_{fl}-transgene Pflanzen der Linie 220.02.13 mit PVY, BYV und PEMV-1/-2, wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben, Ko-infiziert. Von jeder der Versuchspflanzen wurde der BMVYV-Virustiter von vier unterschiedlichen Proben mittels DAS-ELISA bestimmt. Hierzu wurden zwei Wochen (PVY und BYV) bzw. drei Wochen (PEMV-1/-2) nach der Inokulation Blätter aus dem mittleren und oberen Stängelbereich entnommen. Von jedem dieser Blätter wurde der Virustiter im Blattstiel und in der Blattspreite (Lamina), die von Blattadern erster und zweiter Ordnung (Roberts *et al.*, 1997) befreit wurden, bestimmt.

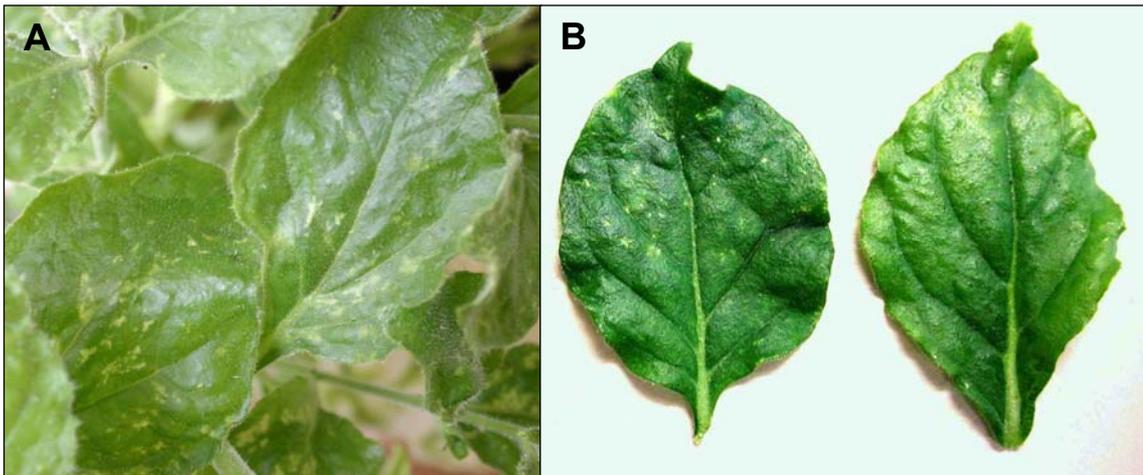


Abbildung 3.29: Blattnekrosen an PEMV-1/-2 Ko-infizierten (A und B, links) und nicht Ko-infizierten (B, rechts) BMV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 220.02.13. Diese Blattnekrosen konnten drei Wochen nach der Ko-Infektion bonitiert werden.

Die PVY oder BYV Ko-infizierten BMV *Amplicon*-transgenen Pflanzen zeigten nach einer (PVY) bzw. zwei (BYV) Wochen typische Virussymptome, insbesondere an jungen Blättern im oberen Stängelbereich, die nicht von denen der PVY- oder BYV-inokulierten nicht-transgenen Kontrollpflanzen zu unterscheiden waren. Die mit PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 zeigten nach drei Wochen nekrotische Blattveränderungen, die nicht an PEMV-1/-2 infizierten *N. benthamiana* oder BMV_{fl}-transgenen Pflanzen beobachtet wurden (Abbildung 3.29). Diese nekrotischen Stellen bildeten sich zuerst an älteren und später auch an jüngeren Blättern.

Der statistische Vergleich des BMV-Titers in den unterschiedlichen Proben wurde mit nichtparametrischen Tests sowohl innerhalb der Varianten (Wilcoxon-Test) als auch zwischen den Varianten (Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. Wie bereits bei dem Vergleich der beiden transgenen Linien 220.01 und 220.02.13 dargestellt wurde (Kapitel 3.9.2), konnten auch in diesem Versuch stark unterschiedliche BMV-Virustiter in Blattstielen zwischen einzelnen Versuchspflanzen innerhalb einer Variante festgestellt werden. Diese Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen sind die Ursache für hohe Standardabweichungen (Tabelle 3.13).

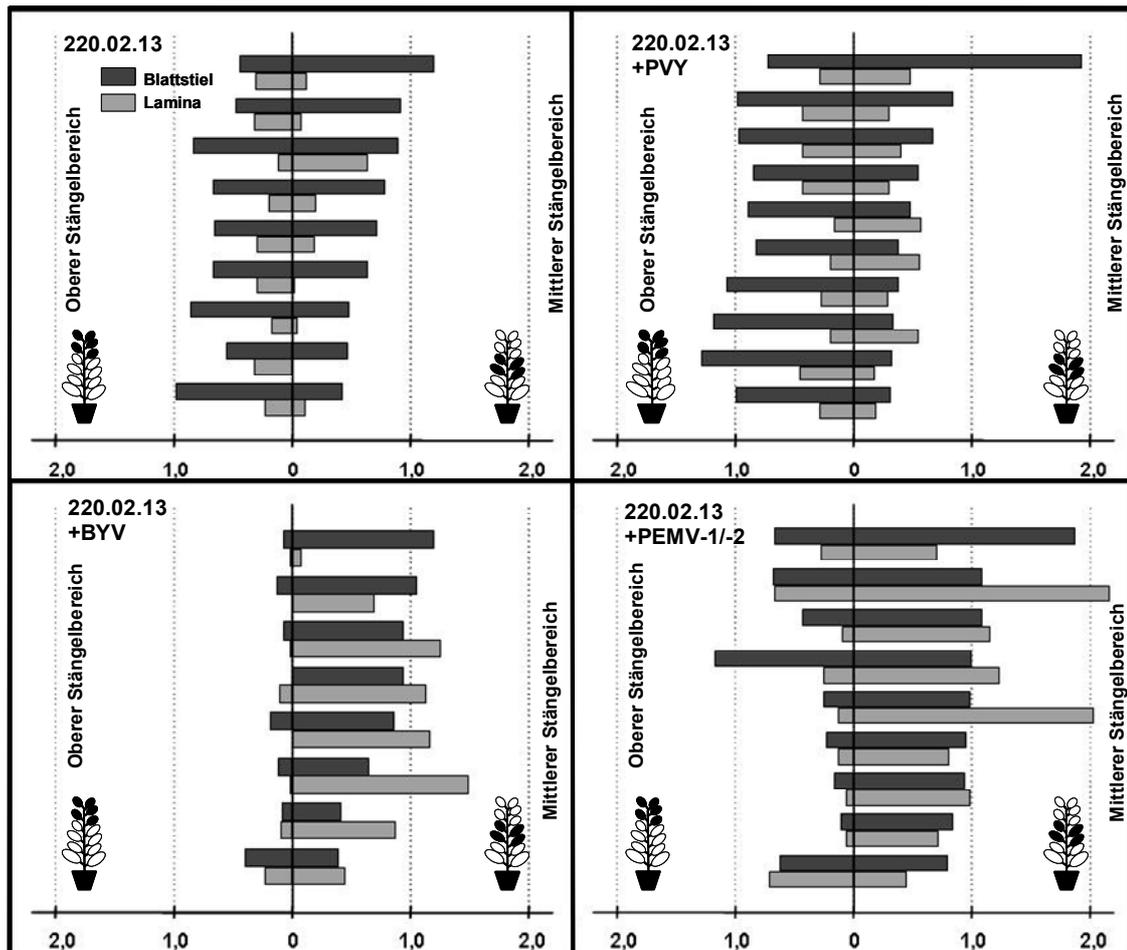


Abbildung 3.30: Festgestellte DAS-ELISA Absorptionswerte (A_{415nm}) von Ko-infizierten und nicht Ko-infizierten BMV *Amplicon*-transgenen Einzelpflanzen der Linie 220.02.13 in Blattstiel- und Laminaprobe aus dem oberen und mittleren Stängelbereich zwei (220.02.13 (n=9), 220.02.13+PVY (n=10) und 220.02.13+BYV, n=8) bzw. drei (220.02.13+PEMV-1/-2, n=9) Wochen nach der Ko-Infektion.

Bei nicht Ko-infizierten Kontrollpflanzen der Linie 220.02.13 wurde, im Vergleich zu Proben der Blattlamina, ein deutlich höherer Virustiter in den Blattstielen (Abbildung 3.30) nachgewiesen. Dieser signifikant höhere Virustiter wurde in Proben aus dem oberen und mittleren Stängelbereich festgestellt (Tabelle 3.13). Der BMV-Titer in der Blattlamina war generell gering und in einigen Proben aus dem mittleren Stängelbereich nicht nachweisbar.

Tabelle 3.13: Durch BMVYV-DAS-EILSA ermittelte Absorptionsmesswerte in BMVYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* und PVY, BYV und PEMV-1/-2 Ko-infizierten transgenen Pflanzen in Blattstiel (BS) und Blattlamina (BL) aus dem oberen und mittleren Stängelbereich (Standardabweichung in Klammern) zwei (PVY, BYV) bzw. drei (PEMV-1/-2) Wochen nach der Ko-Infektion mit Angabe von Signifikanzen innerhalb (→) und zwischen (↓) den Varianten im Vergleich zur nicht Ko-infizierten Kontrolle.

	oberer Stängelbereich				
	Blattstiel	Blattlamina	→ Sig. BS/BL	↓ Sig. BS	↓ Sig. BL
220.02.13 (n=9)	0,684 (±0,18)	0,253 (±0,07)	sig. p=0,008	a	a
220.02.13.+PEMV (n=9)	0,479 (±0,33)	0,264 (±0,24)	n. sig. p=0,021	a	a
220.02.13+PVY (n=10)	0,979 (±0,16)	0,316 (±0,11)	sig. p=0,005	b	a
220.02.13+BYV (n=8)	0,132 (±0,12)	0,060 (±0,07)	n. sig. p=0,343	c	c
	mittlerer Stängelbereich				
	Blattstiel	Blattlamina	→ Sig. BS/BL	↓ Sig. BS	↓ Sig. BL
220.02.13 (n=9)	0,728 (±0,24)	0,158 (±0,19)	sig. p=0,008	a	a
220.02.13.+PEMV (n=9)	1,060 (±0,31)	1,140 (±0,58)	n. sig. p=0,953	b	b
220.02.13+PVY (n=10)	0,620 (±0,50)	0,384 (±0,16)	n. sig. p=0,114	c	b
220.02.13+BYV (n=8)	0,808 (±0,28)	0,895 (±0,46)	n. sig. p=0,484	a	b

a = kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; b = signifikant höher, c = signifikant niedriger.

Dagegen konnte bei PVY, BYV und PEMV-1/-2 Ko-infizierten Varianten kein signifikanter Unterschied im BMVYV-Virustiter zwischen Proben aus der Blattlamina und dem Blattstiel im mittleren Stängelbereich festgestellt werden (Tabelle 3.13). Die

Blattlaminaprobe der Ko-infizierten Varianten aus diesem Stängelbereich zeigten dabei alle einen signifikant höheren Virusgehalt als in nicht Ko-infizierten BMV_{fl} -transgenen Pflanzen ermittelt wurde ($PVY:p=0,013$; $BYV:p=0,006$; $PEMV:p<0,001$). In Proben der Blattlamina aus dem oberen Stängelbereich konnten dagegen keine Unterschiede im BMV -Virustiter zwischen den Ko-infizierten und der nicht Ko-infizierten Variante festgestellt werden. Die ermittelten Virusgehalte in Proben aus dem oberen Stängelbereich waren bei der BYV Ko-infizierten Variante sogar signifikant niedriger ($p=0,001$) als in den Kontrollpflanzen. Eine Erhöhung des Virustiters in Blattstielen konnte nur bei Proben aus dem mittleren Stängelbereich von $PEMV-1/-2$ ($p=0,011$) und aus dem oberen Stängelbereich von PVY ($p=0,003$) Ko-infizierten Versuchspflanzen festgestellt werden.

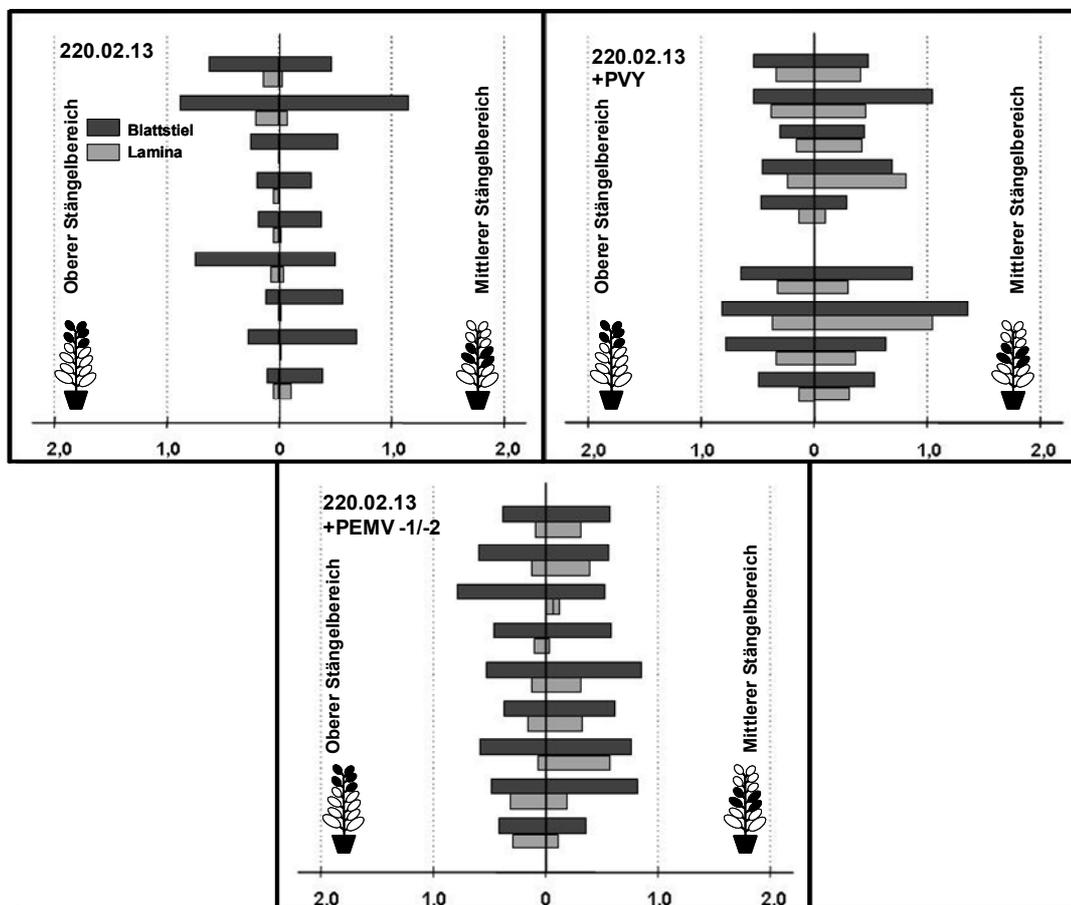


Abbildung 3.31: Festgestellte DAS-ELISA Absorptionswerte (A_{415nm}) von identischen Einzelpflanzen wie in Abbildung 3.30 in Blattstielen und Lamina aus Blättern im oberen und mittleren Stängelbereich vier (ohne, PVY) bzw. fünf (PEMV-1/-2) Wochen nach der Ko-Infektion.

Um den zeitlichen Einfluss des Infektionsverlaufs des ko-infizierten Virus auf den BMV -Virustiter zu untersuchen, wurden von den gleichen Pflanzen die in Abbildung

3.30 dargestellt sind, zwei Wochen nach der ersten Probennahme erneut Proben aus dem oberen und mittleren Stängelbereich entnommen und mittels DAS-ELISA ausgewertet (Abbildung 3.31, Tabelle 3.14). Die bei der ersten Probennahme untersuchten BYV Ko-infizierten und eine PVY Ko-infizierte Versuchspflanze konnten kein zweites Mal untersucht werden, da diese Pflanzen bereits aufgrund der fortgeschrittenen Virusinfektion abgestorben waren.

Tabelle 3.14: Durch BMYV-DAS-EILSA ermittelte Absorptionsmesswerte in BMYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* und PVY und PEMV-1/-2 Ko-infizierten transgenen Pflanzen in Blattstiel (BS) und Blattlamina (BL) aus dem oberen und mittleren Stängelbereich (Standardabweichung in Klammern) vier (PVY) bzw. fünf (PEMV-1/-2) Wochen nach der Ko-Infektion mit Angabe von Signifikanzen innerhalb (→) und zwischen (↓) den Varianten im Vergleich zur nicht Ko-infizierten Kontrolle.

oberer Stängelbereich					
	Blattstiel	Blattlamina	→ Sig. BS/BL	↓ Sig. BS	↓ Sig. BL
220.02.13 (n=9)	0,378 (±0,29)	0,067 (±0,07)	sig. p=0,008	a	a
220.02.13.+PEMV (n=9)	0,560 (±0,16)	0,276 (±0,09)	sig. p=0,008	a	b
220.02.13+PVY (n=9)	0,512 (±0,13)	0,235 (±0,18)	sig. p=0,008	a	b
mittlerer Stängelbereich					
	Blattstiel	Blattlamina	→ Sig. BS/BL	↓ Sig. BS	↓ Sig. BL
220.02.13 (n=9)	0,553 (±0,25)	0,040 (±0,03)	sig. p=0,008	a	a
220.02.13.+PEMV (n=9)	0,634 (±0,16)	0,235 (±0,18)	sig. p=0,008	a	b
220.02.13+PVY (n=9)	0,710 (±0,32)	0,475 (±0,28)	n. sig. p=0,021	a	b

a = kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; b = signifikant höher, c = signifikant niedriger.

Die für die zweite Messung entnommenen Proben aus dem mittleren Stängelbereich wurden von Positionen entnommen, die bei der ersten Messung dem oberen Stängelbereich entsprachen. Mit Ausnahme der Proben aus dem mittleren Stängelbereich der PVY Ko-infizierten Versuchspflanzen, bei denen ein leicht angestiegener BMYV-Virustiter messbar war, wurde in allen anderen Varianten ein gleichbleibender oder geringerer BMYV-Virustiter zwei Wochen nach der ersten Probennahme festgestellt. Insgesamt zeigte sich bei den Ko-infizierten Varianten zu diesem Zeitpunkt ein ausgeglicheneres Verhältnis im Virustiter, welcher in Proben aus dem oberen und mittleren Stängelbereich gemessen wurde. Im Gegensatz zu den ersten Messungen konnte kein signifikanter Unterschied im BMYV-Virustiter in Blattstielen zwischen den beiden Ko-infizierten und der nicht Ko-infizierten Variante festgestellt werden (Tabelle 3.14). Im Vergleich zu der nicht Ko-infizierten Variante konnte in PVY und PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen allerdings ein signifikant höherer BMYV-Virustiter in Proben der Blattlamina aus dem oberen (PVY:p<0,001; PEMV:p=0,024) und mittleren (PVY:p<0,001; PEMV:p=0,003) Stängelbereich gemessen werden (Tabelle 3.14).

Der in unterschiedlichen Geweben mittels DAS-ELISA nachweisbare BMYV-Virustiter in BMYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen variierte innerhalb einer Variante und nahm mit fortschreitendem Pflanzenalter leicht ab. Die Ko-Infektion mit PVY, BYV und PEMV-1/-2 führte zu erhöhten BMYV-Titern in der Blattlamina und blieb im Verlauf der PVY/BMYV und PEMV-1/-2/BMYV Mischinfektion signifikant höher, als in den nicht Ko-infizierten Kontrollpflanzen. Dagegen verringerte sich der in verschiedenen Blattpositionen festgestellte erhöhte Virustiter in den Blattstielen von PVY oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen im Infektionsverlauf und war von dem der nicht Ko-infizierten Versuchspflanzen nicht mehr signifikant verschieden. Aufgrund des frühen Absterbens der BYV Ko-infizierten Pflanzen konnte für diese Variante keine Aussage über den BMYV Virustiter an einem zweiten Messtermin gemacht werden.

Durch TPIA von Blattmesophyllzellen sollte festgestellt werden, ob in den PVY, BYV oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten Varianten vermehrt Gewebe außerhalb des Phloems mit BMYV infiziert werden kann. Die Untersuchung von Blattlaminaprobe aus dem mittleren Stängelbereich erfolgte zwei Wochen nach der Ko-Infektion. Es wurden nur Zellen in den Vergleich aufgenommen, die nicht offensichtlich mit auf der Membran abgedruckten Blattadern in Verbindung standen. Im Vergleich zu der nicht Ko-infizierten Variante (1:678) konnte bei der PVY Ko-infizierten Variante nur eine leicht erhöhte Anzahl an infizierten Mesophyllzellen (1:711) gezählt werden. Die Verteilung dieser Zellen war ungleichmäßig und teilweise konnten kleine Cluster aus zwei bis drei benachbarten infizierten Zellen detektiert werden.

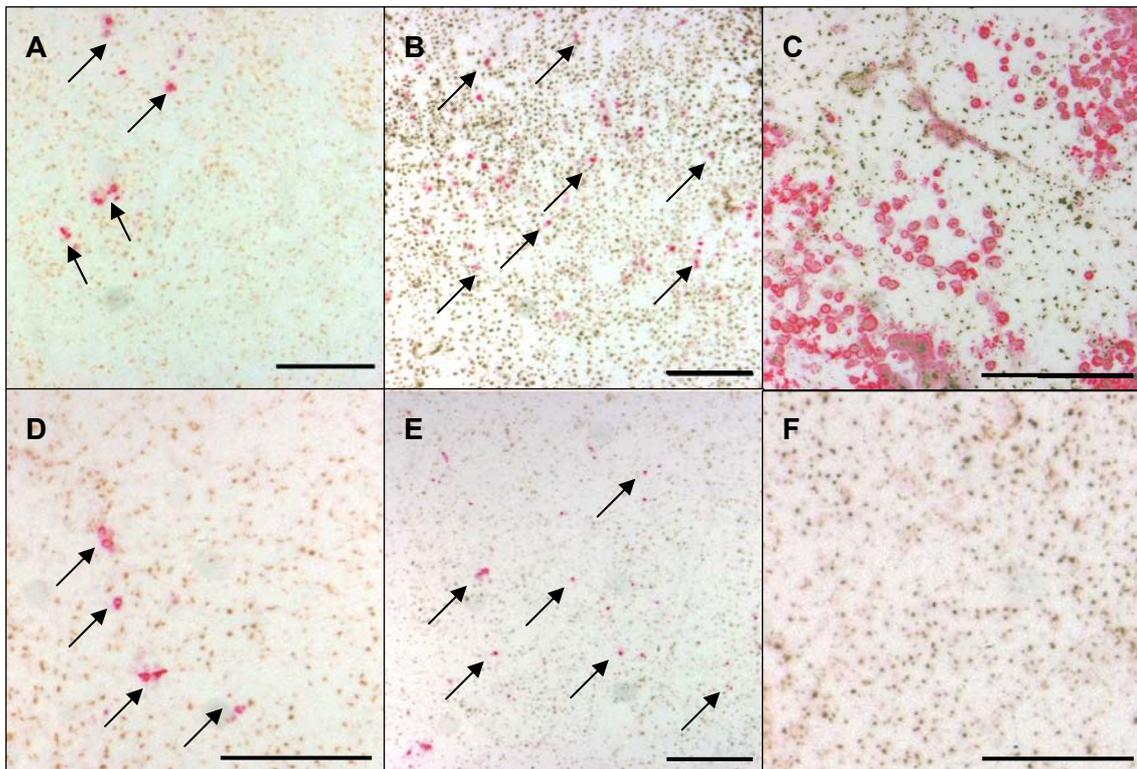


Abbildung 3.32: TPIA-Aufnahmen von BMVYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* Mesophyllzellen nach BMVYV-Detektion mit MAb5G4: (A) nicht Ko-infiziert, (B+C) PEMV-1/-2 Ko-infiziert, (C) mit nekrotischem Gewebe, (D) PVY Ko-infiziert, (E) BYV Ko-infiziert und (F) nicht transgene *N. benthamiana*. Die Pfeile markieren BMVYV-infizierte Zellen. Der Größenstandard entspricht 1 mm.

In BMVYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen, die mit PEMV-1/-2 Ko-infiziert waren, konnten doppelt so viele (1:311) BMVYV_{fl}-infizierte Mesophyllzellen gezählt werden. Diese Zellen gruppieren in größeren Clustern, es konnten aber auch einzelne oder kleine Gruppen von infizierten Zellen festgestellt werden. In TPIA-Abdrucken, das das bei einer BMVYV/PEMV-1/-2 Mischinfektion bonitierte typische nekrotisierte Blattgewebe umfasste, konnten Zellbereiche identifiziert werden, in denen jede dritte Zelle eine BMVYV_{fl}-Infektion zeigte (Abbildung 3.32, C). In Proben von BYV Ko-infizierten Pflanzen konnte sowohl eine Aggregation infizierter Zellen in kleineren Clustern, aber auch eine hohe Anzahl von infizierten Einzelzellen (insgesamt 1:165) detektiert werden.

Die zuvor durch DAS-ELISA ermittelten hohen Virustiter in der Blattlamina von Ko-infizierten Pflanzen liegen, zumindest teilweise, auch in einer erhöhten Anzahl von BMVYV-infizierten Zellen außerhalb des Phloems begründet. Die durch DAS-ELISA festgestellten erhöhten Virustiter in Blattlaminaprobe der Ko-infizierten Varianten

(Tabelle 3.13) konnten durch die im TPIA festgestellte erhöhte Anzahl infizierter Zellen aus dem mittleren Stängelbereich bestätigt werden.

In TPIA-Aufnahmen von Blattstiel- und Stängelgewebe konnten zwischen den vier Varianten keine Unterschiede festgestellt werden (ohne Abbildung). In allen untersuchten TPIA-Abdrucken war nach Fast Red-Naphtolbehandlung nur Pflanzengewebe, das dem Phloem zugeordnet wurde, violett gefärbt. Die zwei bzw. drei Wochen nach der Ko-Infektion durch DAS-ELISA nachgewiesenen signifikant erhöhten Virustiter in Blattstielproben (+PVY oberer und +PEMV-1/-2 mittlerer Stängelbereich, Tabelle 3.13) waren daher durch eine höhere BMVYV-Viruskonzentration im Phloemgewebe der Blattstiele und nicht durch eine vermehrte Infektion von Zellen außerhalb des Phloems erklärbar.

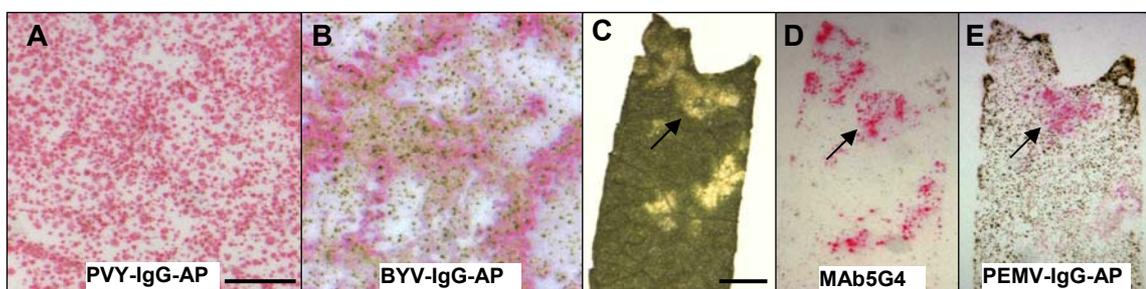


Abbildung 3.33: Serologischer Nachweis von PVY mit PVY-IgG-AP (A), von BYV mit BYV-IgG-AP (B) von PEMV-1/-2 mit PEMV-IgG-AP (E) und BMVYV mit MAb5G4 (D) in Mesophyllgewebe von symptomzeigenden Blättern aus dem oberen Stängelbereich von Ko-infizierten BMVYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 220.02.13. Ein Gewebebereich (C) wurde auf zwei verschiedene Membranen (zuerst auf E, dann auf D) abgedruckt. Die Pfeile zeigen identische Gewebebereiche. Der Größenstandard entspricht 1 mm (A+B; C-E).

Durch TPIA mit alkalischer Phosphatase gekoppelte PVY-IgG, BYV-IgG und PEMV-IgG wurde die Ausbreitung des Ko-infizierten Virus im Mesophyllgewebe von BMVYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen der Linie 220.02.13 untersucht (Abbildung 3.33). Die Ko-infizierten Viren PVY und BYV breiten sich in den BMVYV_{fl}-transgenen Pflanzen systemisch aus und konnten, im Gegensatz zu BMVYV, das Gewebe großflächig infizieren (Abbildung 3.33, A+B). In BYV-infiziertem Mesophyllgewebe wurde eine starke Virusakkumulation, ausgehend von den Blattadern, beobachtet. Bei TPIA Abdrucken von nicht Ko-infizierten BMVYV_{fl}-transgenen Pflanzen wurde auf PVY-IgG-AP und BYV-IgG-AP behandelten Membranen keine serologische Reaktion beobachtet.

Mit dem verwendeten PEMV-IgG-AP konnten virusinfizierte Zellen in nekrotischem Blattgewebe nachgewiesen werden. Nach Abdruck identischer Gewebeproben auf zwei verschiedene Membranen und Inkubation mit PEMV-IgG-AP oder MAb5G4 konnte nur in Gewebebereichen, in denen auch durch PEMV-IgG-AP PEMV-1/-2 nachgewiesen wurde, eine Farbreaktion mit MAb5G4 festgestellt werden (Abbildung 3.33, D und E). In diesen PEMV-1/-2 infizierten Gewebebereichen wurde eine starke Aggregation von BMYV-infizierten Mesophyllzellen nachgewiesen. Das verwendete PEMV-IgG-AP zeigte keine Reaktion bei Proben von nicht Ko-infizierten BMYV_{fi}-transgenen Pflanzen. Die im Vergleich zu der mit MAb5G4 behandelten Membran geringere Intensität der Fast-Red/Naphtolfärbung als bei der mit PEMV-IgG-AP behandelten Membran, ist vermutlich in einer geringen PEMV-1/-2 Viruskonzentration im untersuchten Gewebe und/oder in einer hohen Ausgangsverdünnung des verwendeten Antiserums begründet.

3.11.3 Mechanische Übertragung des BMYV_{fi}

Eine mechanische Übertragung von phloemgebundenen Pflanzenviren wie BMYV ist vermutlich dadurch eingeschränkt, dass eine Replikation und/oder Ausbreitung in Geweben außerhalb des Phloems nicht in dem Umfang möglich ist der notwendig ist, um eine systemische Infektion zu etablieren. Für Untersuchungen, ob eine mechanische Übertragbarkeit des BMYV durch andere Viren komplementiert werden kann, wurden Presssäfte von PVY, BYV oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten BMYV_{fi}-transgenen Pflanzen der Linie 220.02.13 auf nicht infizierte *N. benthamiana* abgerieben. Die mechanisch inokulierten Versuchspflanzen wurden vier Wochen nach der Inokulation mittels TPIA von Blattstielen auf systemische BMYV-Infektionen untersucht.

Tabelle 3.15: Durch TPIA (MAb5G4) von Blattstielen nachgewiesene systemische BMYV-Infektionen nach mechanischer Inokulation von *N. benthamiana* mit Presssäften aus PVY, BYV oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten BMYV_{fi}-transgenen *N. benthamiana* der Linie 220.02.13.

Presssafterkunft	Anzahl BMYV-infizierter / Anzahl inokulierter <i>N. benthamiana</i> Pflanzen
220.02.13 + PVY	0 / 5
220.02.13 + BYV	0 / 5
220.02.13 + PEMV-1/-2	2 / 5
220.02.13	0 / 5

Wie in Tabelle 3.15 dargestellt, konnte das BMV_{fi} von PEMV-1/-2 Ko-infizierten transgenen Pflanzen auf zwei von fünf virusfreien *N. benthamiana* erfolgreich mechanisch übertragen und systemische Infektionen etabliert werden. Nach drei Wochen konnten die in Abbildung 3.29 gezeigten typischen Blattnekrosen von BMV/PEMV-1/-2 mischinfizierten *N. benthamiana* bonitiert werden. An Pflanzen, die mit Presssäften aus BYV- oder PVY Ko-infizierten transgenen Pflanzen behandelt wurden, konnten nach zwei (PVY) und drei (BYV) Wochen typische Virussympptome der Ko-infizierten Viren festgestellt werden. In keiner dieser Pflanzen konnte allerdings eine BMV_{fi}-Infektion mittels TPIA nachgewiesen werden. Eine mechanische Übertragung des BMV_{fi} von nicht Ko-infizierten oder mit PVY bzw. BYV Ko-infizierten transgenen Pflanzen auf virusfreie *N. benthamiana* war nicht möglich.

3.12 Infektionstestungen mit dem BChV_{fi}

Die Testung der Infektiosität des BChV_{fi} erfolgte, wie bereits für den BMV_{fi} beschrieben, mittels Agroinokulation verschiedener Testpflanzen. Hierfür wurden neun aus der Lysatpopulation stammende BChV_{fi} (L366-L372, L374 und L375) und der sequenzierte BChV_{fi} (L400) in den binären Vektor pBIN_SN integriert und in *A. tumefaciens* LBA4404 Zellen überführt.

Die RNA, die für die cDNA-Herstellung und anschließende Klonierung des BChV_{fi} verwendet wurde, stammt aus einer mit BMV, BChV und BYV mischinfizierten *Beta vulgaris* Pflanze. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben ist es nicht gelungen, aus dieser Rübe BChV mittels *Myzus persicae* auf nicht infizierte *B. vulgaris*, *N. benthamiana* oder *C. capitatum* als mögliche Wirtspflanzen zu übertragen. Da keine nur mit BChV und nicht mit BMV infizierte Pflanze nach der Blattlausübertragung selektiert werden konnte, war es nicht möglich, die serologische Reaktion von BChV mit dem monoklonalen Antikörper MAb5G4 zu testen. Der monoklonale Antikörper MAFF24 (Smith *et al.*, 1996) detektiert sowohl BMV, BWYV als auch BChV (Hauser *et al.*, 2002). Beide Antikörper wurden für den Nachweis von BChV_{fi}-Agroinfektionen verwendet. Für die Testung der Infektiosität des BChV_{fi} wurden an verschiedenen Terminen Agroinokulationen an *N. benthamiana*, *B. vulgaris* und *C. capitatum* durchgeführt.

Für den Nachweis von BChV_{fi}-infizierten Zellen wurden Blattstiele oberhalb der Inokulationsstelle und Blattstiele der inokulierten Blätter in TPIA-Abdrucken verwendet. Zusätzlich wurde BChV_{fi}-agroinokuliertes Mesophyllgewebe von *N. benthamiana* und *B. vulgaris* Pflanzen durch TPIA mit den Antiseren MAb5G4 und MAFF24 auf BChV_{fi}-infizierte Zellbereiche hin untersucht.

Tabelle 3.16: Übersicht über durchgeführte BChV_{fi}-Agroinfektionen an *N. benthamiana*, *B. vulgaris* und *C. capitatum* und Ergebnis der TPIA-Untersuchung von Blattstielen und agroinokuliertem Mesophyllgewebe mit den Antiseren MAb5G4 und MAFF24.

	Nachweis infizierter Zellen in TPIA-Abdrucken durch			
	Mab5G4		MAFF24	
	Blattstiel	agroinokuliertes Mesophyllgewebe	Blattstiel	agroinokuliertes Mesophyllgewebe
BChV _{fi} -Klone				
LBA4404_L366				
<i>N. benthamiana</i> (4)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
LBA4404_L367				
<i>N. benthamiana</i> (4)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
LBA4404_L368				
<i>N. benthamiana</i> (4)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
LBA4404_L369				
<i>N. benthamiana</i> (4)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
LBA4404_L370				
<i>N. benthamiana</i> (2)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
<i>C. capitatum</i> (1)	-	n.d.	-	n.d.
LBA4404_L371				
<i>N. benthamiana</i> (2)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
<i>C. capitatum</i> (1)	-	n.d.	-	n.d.
LBA4404_L372				
<i>N. benthamiana</i> (2)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
<i>C. capitatum</i> (1)	-	n.d.	-	n.d.
LBA4404_L374				
<i>N. benthamiana</i> (2)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
<i>C. capitatum</i> (1)	-	n.d.	-	n.d.
LBA4404_L375				
<i>N. benthamiana</i> (2)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (1)	-	-	-	-
<i>C. capitatum</i> (1)	-	n.d.	-	n.d.
LBA4404_L400				
<i>N. benthamiana</i> (8)	-	-	-	-
<i>B. vulgaris</i> (8)	-	-	-	-
<i>C. capitatum</i> (8)	-	n.d.	-	n.d.
BMYV _{fi} -Klon				
LBA4404_L181				
<i>N. benthamiana</i>	+	+	+	+
<i>B. vulgaris</i>	n.d.	+	n.d.	+

+ = infizierte Zellen nachgewiesen, - = keine infizierten Zellen nachweisbar, n.d. = nicht durchgeführt, Anzahl der Versuchspflanzen in Klammern.

In keinem der untersuchten Gewebeabdrucke und mit keinem der beiden verwendeten Antiseren konnten BChV_{fi}-infizierte Zellbereiche nachgewiesen werden (Tabelle 3.16).

Um auszuschließen, dass der BChV_{fl}-Virustiter unter der serologischen Nachweisgrenze durch TPIA lag, wurde von LBA4404_L400, dem sequenzierten BChV_{fl}, agroinfiltrierten *N. benthamiana* und *C. capitatum* acht Wochen nach der Inokulation Gesamt-RNA extrahiert. Nach RT-PCR mit BChV-spezifischen Oligonukleotiden konnte in diesen Pflanzen keine BChV_{fl}-Infektion nachgewiesen werden. Obwohl in der in Kapitel 3.3 durchgeführten Sequenzanalyse des BChV_{fl} alle für eine Infektion und Replikation benötigten putativen Proteinprodukte theoretisch nachgewiesen wurden, konnten keine lokalen oder systemischen BChV_{fl}-Agroinfektionen etabliert werden.

3.12.1 Mutagenese des BChV_{fl} zur Integration von 5'-Fremdnukleotiden

Wie bereits für den BMYV_{fl} gezeigt (Kapitel 3.4.3) sollte auch bei dem BChV_{fl} ein möglicher Einfluss von 5'-terminalen Fremdnukleotiden zwischen dem CaMV 35S-Promotor Transkriptionsstart und dem Beginn der viralen Sequenz auf die Infektiosität des BChV_{fl} untersucht werden. Hierzu wurde der BChV_{fl} in gleicher Weise wie der infektiöse BMYV_{fl} zwischen den im L140 vorliegenden CaMV 35S-Promotor und die Ribozymsequenz kloniert und unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Sna*B I und *Not* I in den binären Vektor pBIN_SN integriert.

Für alle Klonierungsschritte wurde der bereits sequenzierte BChV_{fl} (L362) und keine Population aus Klonen verwendet. Durch die Oligonukleotide BChVAscl und BChVBstAPI wurde in einer PCR-Reaktion das BChV_{fl} 5'-Ende um eine *Asc* I Restriktionsschnittstelle erweitert. Diese Restriktionsschnittstelle führt, wie bei dem infektiösen BMYV_{fl}, zu einer 5'-terminalen Verlängerung des Genoms um sechs Nukleotide.

Das am L362 amplifizierte PCR-Fragment umfasst eine interne *Eco*91 I Restriktionsschnittstelle, die nur einmal im BChV_{fl} vorliegt, und eine über das Oligonukleotid BChVBstAPI integrierte *Xho* I Restriktionsschnittstelle. Nach Integration des PCR-Fragments über *Asc* I und *Xho* I in den L140 konnte durch Nutzung der *Eco*91 I und *Bsp*120 I Restriktionsschnittstellen der fehlende BChV_{fl}-Sequenzbereich aus L362 eingefügt werden. Der resultierende AsclBChV_{fl} wurde über *Sna*B I und *Not* I in den binären Vektor pBIN_SN überführt und in den *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 elektroporiert. Eine detaillierte Übersicht über die durchgeführten Klonierungen befindet sich im Anhang.

3.12.2 Infektionstestungen mit dem AsclBChV_{fl}

Es wurden vier in den binären Vektor integrierte AsclBChV_{fl} (L410-L413) in *A. tumefaciens* LBA4404 Zellen elektroporiert. Die Testung der Infektiosität erfolgte

mittels Agroinokulation. Hierbei wurde Blattgewebe von *N. benthamiana* und *B. vulgaris* Pflanzen infiziert und der Inokulationsbereich vier Wochen später durch TPIA von Mesophyllzellen mit den Antiseren MAb5G4 und MAFF24 auf infizierte Mesophyllzellen untersucht. So sollte vor ausgedehnten Infektionstestungen mit den AscIBChV_{fi}-Klonen überprüft werden, ob eine Infektiosität gegeben ist.

Tabelle 3.17: Infektionstestungen der AscIBChV_{fi} durch Agroinokulation von *B. vulgaris* und *N. benthamiana* Blattgewebe und Ergebnisse des serologischen Nachweises von Pflanzengewebe durch TPIA mit MAb5G4 und MAFF24.

	Nachweis infizierter Mesophyllzellen im untersuchten Inokulationsbereich	
	MAb5G4	MAFF24
AscIBChV_{fi}-Klone		
LBA4404_L410		
<i>N. benthamiana</i>	-	-
<i>B. vulgaris</i>	-	-
LBA4404_L411		
<i>N. benthamiana</i>	-	-
<i>B. vulgaris</i>	-	-
LBA4404_L412		
<i>N. benthamiana</i>	-	-
<i>B. vulgaris</i>	-	-
LBA4404_L413		
<i>N. benthamiana</i>	-	-
<i>B. vulgaris</i>	-	-
BMVY_{fi}-Klon		
LBA4404_L181*		
<i>N. benthamiana</i>	+	+
<i>B. vulgaris</i>	+	+

+ = infizierte Zellen nachgewiesen, - = keine infizierten Zellen nachgewiesen.

* = erste Testung nach fünf Tagen positiv.

Keiner der getesteten AscIBChV_{fi} konnte als infektiös eingestuft werden. In agroinokuliertem *N. benthamiana* und *B. vulgaris* Mesophyllgewebe konnte nach 21 Tagen in keiner Zelle Hüllprotein nachgewiesen werden. In den mit BMVY_{fi} (LBA4404_L181) agroinokulierten Zellbereichen konnte dagegen bereits nach fünf Tagen Hüllprotein in zahlreichen Mesophyllzellen detektiert werden. Da in AscIBChV_{fi}-agroinokuliertem *N. benthamiana* und *B. vulgaris* Blattgewebe keine Infektionen festgestellt werden konnten, wurde auf den Nachweis systemischer Infektionen

verzichtet. Die 5'-terminale Verlängerung um sechs Nukleotide führte nicht zur Selektion eines infektiösen BChV_{fi}.

3.12.3 Infektionstestungen mit BChV_{fi}/BMYV_{fi}-Mischproben

Da mit keinem der selektierten BChV_{fi} eine Infektion etabliert werden konnte, sollte durch eine gleichzeitige Agroinfektion des BChV_{fi} und des infektiösen BMYV_{fi} untersucht werden, ob der BMYV_{fi} einen möglicherweise im BChV_{fi} vorliegenden Defekt bei der Replikation oder der Bildung von Strukturproteinen komplementieren kann. Hierzu wurde eine Inokulationssuspension hergestellt, in der BMYV_{fi} und BChV_{fi} bzw. BMYV_{fi} und AscIBChV_{fi} rekombinante Agrobakterien in gleichen Anteilen vorlagen. Mit diesen Mischproben wurden jeweils fünf *N. benthamiana* agroinokuliert. Der Nachweis von erfolgreichen Agroinfektionen erfolgte acht Wochen nach der Inokulation durch TPIA und RT-PCR mit BChV-spezifischen (BChVP0s/BChVP0as) und BMYV-spezifischen (BMYVP0s/BMYVP0as) Oligonukleotiden.

Tabelle 3.18: Übersicht über durchgeführte BChV_{fi}/BMYV_{fi} und AscIBChV_{fi}/BMYV_{fi} Agroinfektionen an *N. benthamiana* und Nachweis von Virusinfektionen im Inokulationsbereich durch TPIA und RT-PCR mit BChV- bzw BMYV-spezifischen Oligonukleotiden acht Wochen nach der Inokulation.

	Nachweis infizierter Mesophyllzellen im untersuchten Inokulationsbereich		Nachweis systemischer Virusinfektion durch RT-PCR	
	MAb5G4	MAFF24	BChV _{fi}	BMYV _{fi}
BChV_{fi}/BMYV_{fi}				
LBA4404_L400 + ATHV_L181 <i>N. benthamiana</i>	5/5	5/5	0/5	5/5
AscIBChV_{fi}/BMYV_{fi}				
LBA4404_L410 + ATHV_L181 <i>N. benthamiana</i>	5/5	5/5	0/5	5/5
BMYV_{fi}				
ATHV_L181 <i>N. benthamiana</i>	2/2	2/2	n.d.	2/2

n.d.= nicht durchgeführt

Wie in Tabelle 3.18 dargestellt konnten bei allen Versuchspflanzen im Inokulationsbereich durch TPIA mit Mab5G4 oder MAFF24 infizierte Mesophyllzellen

nachgewiesen werden. Da durch die verwendeten Antiseren sowohl BMVYV und zumindest durch MAFF24 auch BChV nachgewiesen werden können, erfolgte eine Detektion systemischer Infektionen durch RT-PCR mit BMVYV- bzw. BChV-spezifischen Oligonukleotiden. Während in allen mischinokulierten *N. benthamiana* eine systemische BMVYV_{fl}-Infektion durch RT-PCR nachgewiesen werden konnte, war die Detektion von systemischen BChV_{fl}-Infektionen nicht erfolgreich. Alle BMVYV_{fl}/BChV_{fl} und BMVYV_{fl}/AsclΔBMVYV_{fl} mischinokulierten Versuchspflanzen zeigten acht Wochen nach der Inokulation leichte Vergilbungssymptome an den älteren Blättern und waren von den BMVYV_{fl}-agroinfigierten *N. benthamiana* nicht zu unterscheiden.

Die Mischinokulationen des BMVYV_{fl} mit dem BChV_{fl} bzw. AsclBChV_{fl} führte acht Wochen nach der Inokulation nicht zu einer nachweisbaren und durch den BMVYV_{fl} komplementierten systemischen Ausbreitung der untersuchten BChV_{fl} und AsclBChV_{fl}.

3.13 Phylogenetischer Vergleich des BMVYV-IPP und BChV-IPP

Das sequenzierte BMVYV-Isolat BMVYV-IPP zeigt eine 96%ige Übereinstimmung auf Nukleotidbasis mit dem Isolat BMVYV-2ITB und ist das zweite komplett sequenzierte BMVYV Isolat. Das Isolat BChV-IPP zeigt eine 94%ige Übereinstimmung der Nukleotidsequenz mit dem Isolat BChV-2a und eine 93%ige Übereinstimmung mit dem Isolat BChV-CR. Nach Alignment der Genome verschiedener Poleroviren gruppieren sich der BMVYV-IPP mit BMVYV-2ITB und der BChV-IPP mit BChV-2a und BChV-CR in einem phylogenetischen Baum in verschiedene Cluster (Abbildung 3.34). Das CABYV

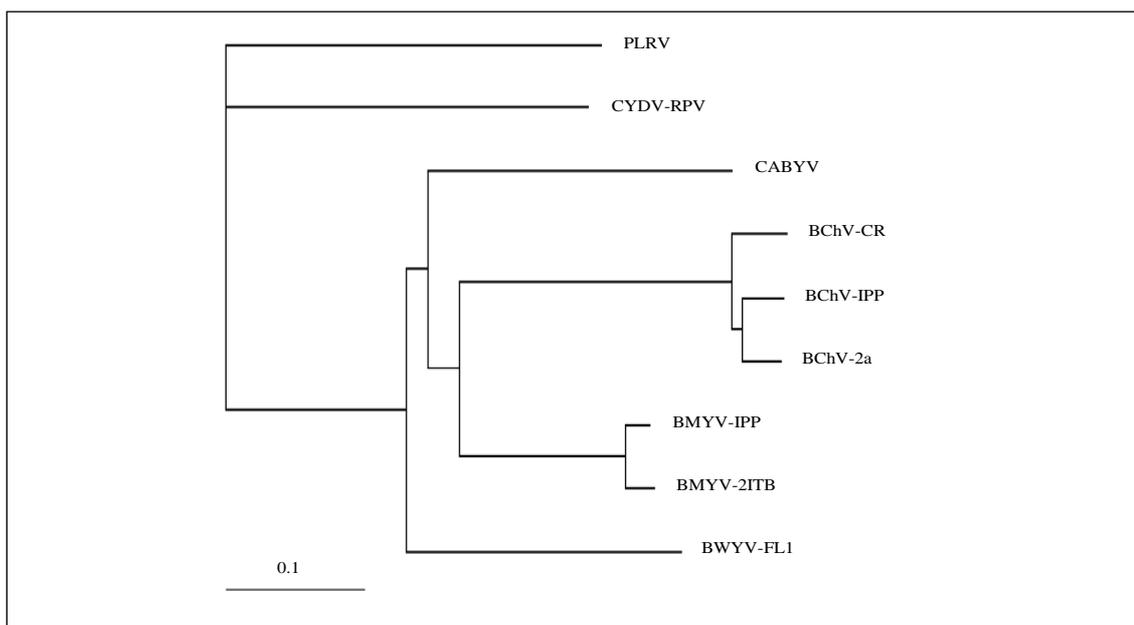


Abbildung 3.34: Phylogenetischer Baum nach multiplem Alignment von poleroviralen Gesamtnukleotidsequenzen (ClustalX und TreeView).

ist dabei phylogenetisch enger mit den *B. vulgaris* infizierenden Poleroviren verwandt als mit PLRV und CYDV-RPV.

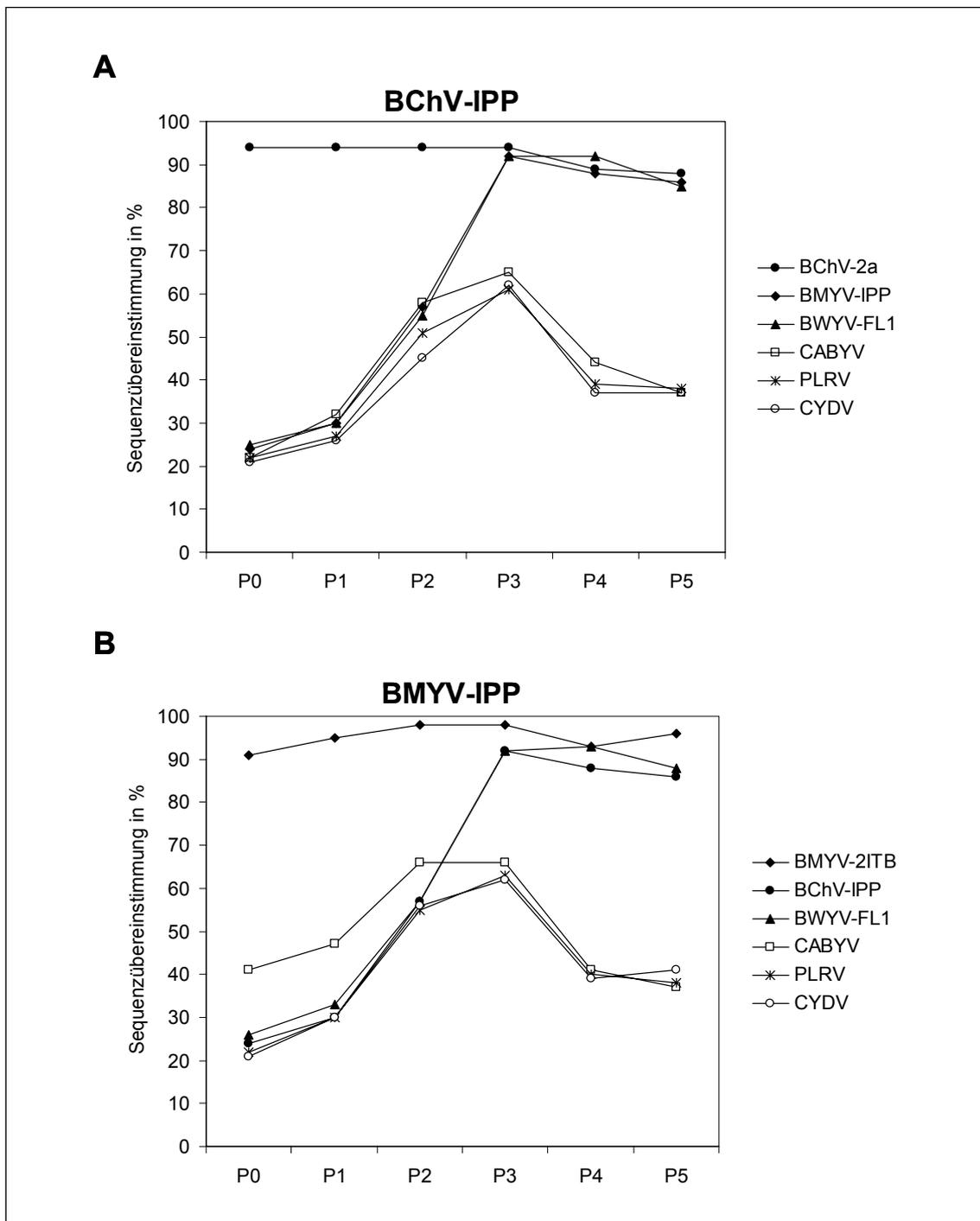


Abbildung 3.35: Grafische Darstellung der Aminosäuresequenz-Übereinstimmung der Proteine P0-P5 verschiedener Poleroviren mit entsprechenden Sequenzbereichen des BChV-IPP (A) und BMYV-IPP (B). Die prozentuale Übereinstimmung wurde mit einem *gap penalty* von 8 und einer *extension penalty* von 2 mit dem GAP Programm berechnet (Huang, 1994).

Der Vergleich der putativen P1-P5 Aminosäuresequenzen des BChV-IPP und BMVYV-IPP mit entsprechenden Sequenzen anderer Poleroviren zeigte eine erhöhte Übereinstimmung von putativen Proteinen, die durch die ORFs im 3'-Genblock des Genoms kodiert werden (Abbildung 3.35). Insbesondere die *B. vulgaris* infizierenden Viren BMVYV, BChV und BWYV-FL1 besaßen in diesem Bereich hohe Homologien von 90% Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit und setzten sich deutlich von den nicht rübeninfizierenden Viren PLRV, CABYV und CYDV ab. Die Proteine, die durch den 5'-Genblock kodiert werden, zeigten dagegen bei allen Poleroviren nur eine geringe Sequenzähnlichkeit.

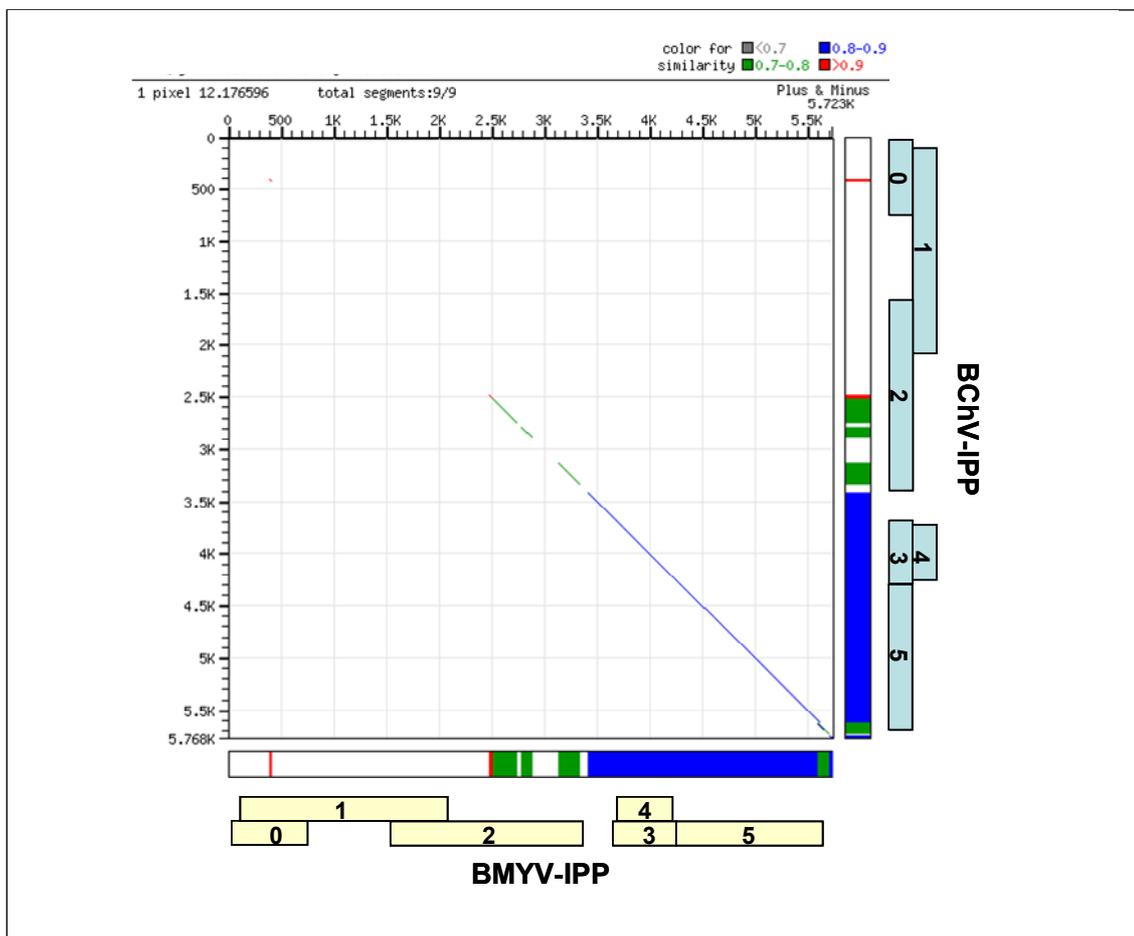


Abbildung 3.36: Paarweises FLAG Alignment der Nukleinsäuresequenzen des BMVYV-IPP und BChV-IPP dargestellt durch das Internetanalyseprogramm Pairwise FLAG Version 0.3 des ITRI Biomedical Information Center, Taiwan (Standardeinstellung). Darstellung eines großen Bereiches mit Sequenzübereinstimmung von 80-90% (blau) im 3'-Gencluster von BMVYV-IPP und BChV-IPP.

Insbesondere das als Suppressor des Silencing Mechanismus der Pflanze identifizierte P0 (Pfeffer *et al.*, 2002) besitzt mit durchschnittlich 23% Sequenzübereinstimmung die geringste Ähnlichkeit innerhalb der Poleroviren. Eine Ausnahme ist dabei die festgestellte Sequenzhomologie des P0 von BMYV und CABYV von 47%. Diese Homologie erklärt die nahe Gruppierung des CABYV zu den BMYV-Isolaten innerhalb des phylogenetischen Baumes. Als nicht rübeninfizierendes Polerovirus zeigt CABYV, wie PLRV und CYDV, im Vergleich zu BChV und BWYV-FL1 eine deutlich geringere Ähnlichkeit mit BMYV in seinen im 3'-Genblock kodierten Proteinen. Die Homologien des BMYV_{fl} und CABYV im 5'-Bereich des Genoms untermauern den von Guilley *et al.* (1995) angenommenen gemeinsamen Ursprung dieses Genombereiches für beide Viren. Der 5'-Genombereich des BChV-IPP zeigt, wie bei BChV-2a und BChV-CR, keine erhöhte Sequenzhomologie mit einem anderen Luteovirus.

Der Vergleich der putativen Aminosäuresequenzen der Proteine P0-P5 (Abbildung 3.35) des BMYV-IPP und BChV-IPP zeigte die bereits auf Basis der Nukleotidsequenz festgestellte hohe Übereinstimmung mit BMYV-2ITB bzw. BChV-2a. Der von Hauser *et al.* (2002) postulierte gemeinsame Ursprung des 3'-Genblocks der *B. vulgaris* infizierenden Poleroviren kann, nach Integration der Isolate BMYV-IPP und BChV-IPP in den phylogenetischen Vergleich, bestätigt werden.

Ein Nukleotidsequenzvergleich des Genoms der Isolate BMYV-IPP und BChV-IPP ergab eine Übereinstimmung nach Alignment von 69%. Die Darstellung der beiden Nukleotidsequenzen als FLAG Alignment (Abbildung 3.36) verdeutlicht die bereits beim Vergleich der Aminosäuresequenzen dargestellte hohe Identität von Sequenzbereichen im 3'-Bereich der beiden Genome, während im 5'-Bereich mit den ORF0, ORF1 und ORF2 eine weitaus geringere Sequenzidentität festgestellt werden konnte.

3.14 Klonierung von BMYV_{fl}-BChV_{fl} Viruschimären

Obwohl in der BChV-IPP Sequenzanalyse (Kapitel 3.3) alle für eine Replikation und Ausbreitung benötigten putativen Proteine theoretisch durch den BChV_{fl} kodiert werden, konnten keine infektiösen Klone selektiert werden. Bereits eine Nukleotidsubstitution in einem kodierenden Bereich kann zu einer veränderten Aminosäuresequenz und damit auch zur veränderten Faltung und Funktion eines resultierenden Proteins führen. Durch Herstellung von BMYV_{fl}- und BChV_{fl}-Viruschimären sollte versucht werden den Sequenzbereich des BChV_{fl} zu ermitteln, der möglicherweise aufgrund von Nukleotidsubstitutionen zu nicht funktionsfähigen Proteinen führt. Hierfür wurde einmal der 5'-Genombereich (ORF0-2) des infektiösen

BMV_{fl} mit dem 3'-Genombereich (ORF3-5) des BChV_{fl} (BMBC_{Chi}) und der 5'-Genombereich des BChV_{fl} mit dem 3'-Genombereich des BMV_{fl} (BCBM_{Chi}) kombiniert (Abbildung 3.37). Zusätzlich sollte der BCBM_{Chi} für Untersuchungen zum Wirtspflanzenspektrum des BMV-IPP und BChV-IPP verwendet werden.

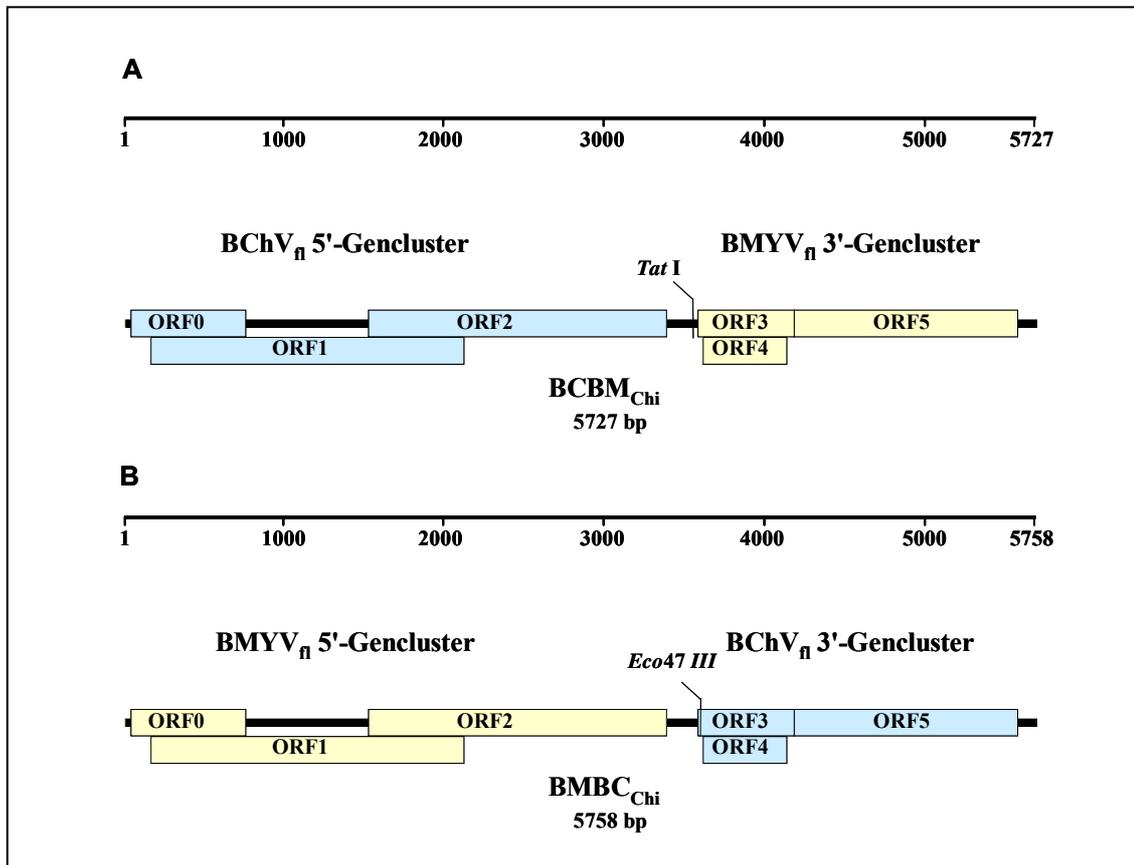


Abbildung 3.37: Schematische Darstellung der BCBM_{Chi} (A) und BMBC_{Chi} (B) mit Angabe der offenen Leserahmen des BChV_{fl} (blau) und BMV_{fl} (gelb) cDNA-Klonen. Die für die Integration verwendeten Restriktionsschnittstellen *Tat* I (im nicht-kodierenden Bereich des BMV_{fl}) und *Eco*47 III (im 5'-terminalen Bereich des BChV_{fl} und BMV_{fl} ORF3) sind dargestellt.

Die vergleichende Untersuchung von Genombereichen des BMV-IPP und des BChV-IPP zeigte, dass beide Poleroviren hohe Sequenzhomologien im 3'-Bereich ihres Genoms aufweisen, aber nur eine geringe Sequenzübereinstimmung im 5'-Genombereich vorliegt. Da im 5'-Bereich von Poleroviren ORFs zu finden sind, die neben denen an der Virusreplikation beteiligten Proteinen (P1 und P2) auch für einen Suppressor des *Silencing* (P0) kodieren, sollte durch BCBM_{Chi}-Agroinfektionen verschiedener BChV- und BMV Wirtspflanzen untersucht werden, ob dieser Genombereich an der Wirtspflanzenspezifität beteiligt ist.

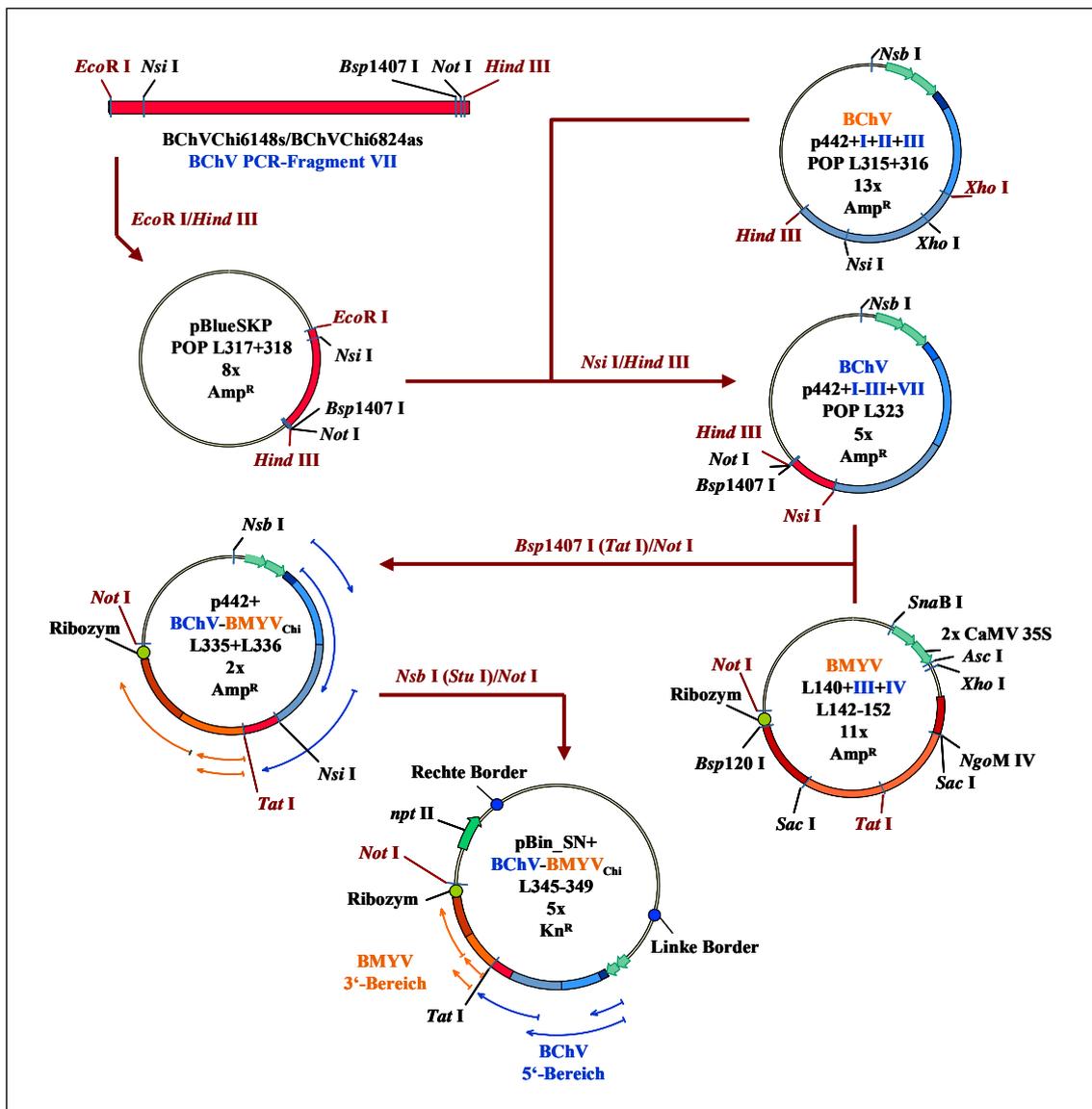


Abbildung 3.38 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der $BCBM_{Chi}$ mit Angabe der verwendeten Oligonukleotide, Vektoren, Restriktionsschnittstellen und Anzahl der selektierten Einzellsate in den Lysatpopulationen.

Für die Klonierung der $BCBM_{Chi}$ wurden Vorklone des BMV_{fi} (Kapitel 3.2.1) und des $BChV_{fi}$ (Kapitel 3.2.2) über das BChV PCR Fragment VII zusammengeführt (Abbildung 3.38). Das PCR Fragment VII enthielt den 3'-Bereich der BChV 5'-Gengruppe von Nukleotidposition 2877 bis 3553 nt und auch einen Teilbereich der zwischen der 5'- und 3'-Gengruppe liegenden nicht-kodierenden Region. Durch die über das antisense Oligonukleotid integrierte *Bsp1407 I* und *Not I* Restriktionsschnittstelle konnte die 3'-Gengruppe des BMV_{fi} über eine im nicht-kodierenden Bereich an Nukleotidposition

3551 vorkommende *Tat I* (*Bsp1407 I* kompatibel) und *Not I* eingefügt werden. Die Viruschimären (L335 und L336) wurden, wie bereits bei der Klonierung des *BMChV_{fl}* und des *BChV_{fl}* beschrieben, aus Populationsklonierungen selektiert.

Für die Infektionstestungen wurden beide Klone als Population in das pBIN19 Derivat *pBin_SN* überführt. Es konnten fünf in den binären Vektor integrierte *BCBM_{Chi}* selektiert werden. In Abbildung 3.38 ist die Klonierung der *BCBM_{Chi}* schematisch dargestellt.

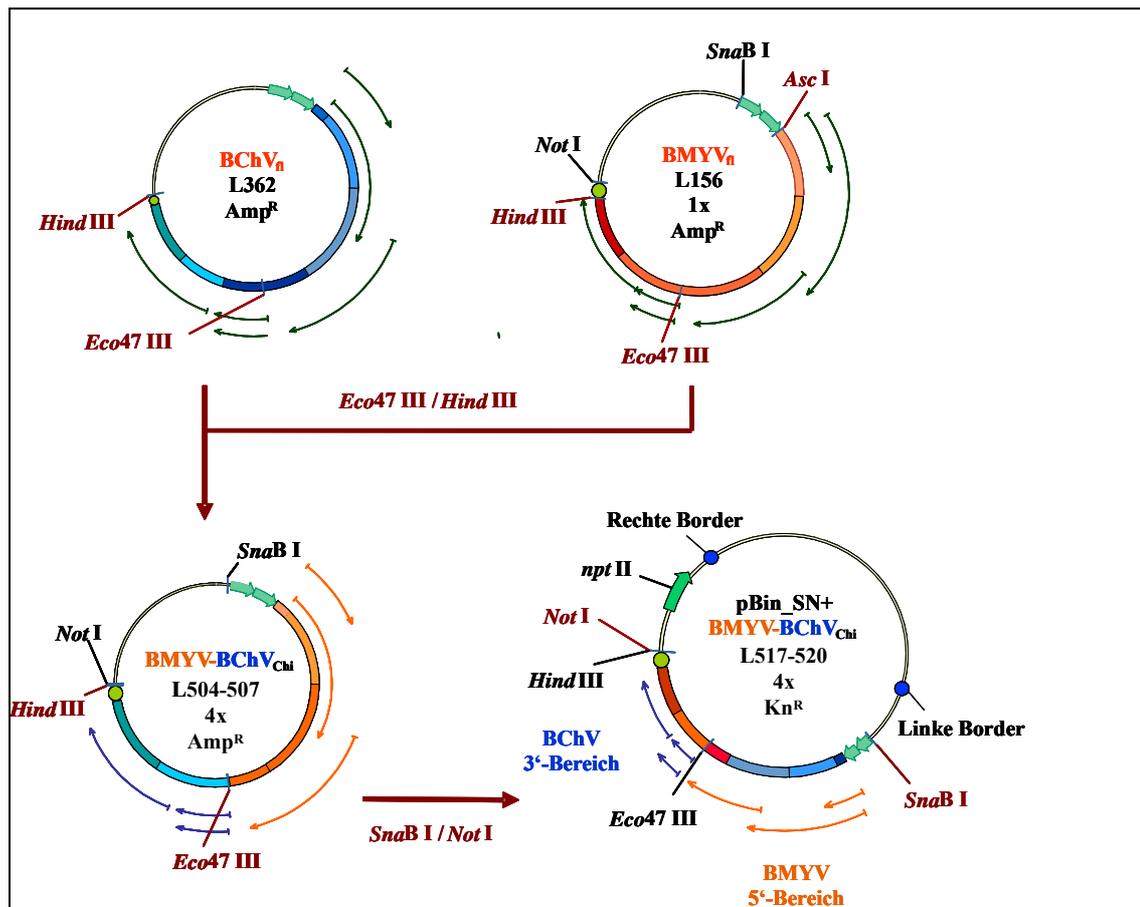


Abbildung 3.39: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der *BMBC_{Chi}* mit Angabe der verwendeten Vektoren und Restriktionsschnittstellen und Anzahl der selektierten Einzellysate in den Lysatpopulationen.

Die Herstellung des *BMBC_{Chi}* erfolgte durch Integration des *BChV_{fl}* 3'-Genombereichs über eine in beiden Klonen im ORF3 vorliegende *Eco47 III* und eine nach der Ribozymsequenz lokalisierte *Hind III* Restriktionsschnittstelle in den infektiösen *BMChV_{fl}*. Für die Infektionstestungen wurden die Klone als Population in das pBIN19 Derivat *pBin_SN* überführt. Es wurden vier in den binären Vektor integrierte *BMBC_{Chi}*

selektiert (L517-520). In Abbildung 3.39 ist die Klonierung der BMBC_{Chi} schematisch dargestellt.

Da bereits der BChV_{fi} und der BMYV_{fi} komplett sequenziert worden waren, ist auf eine Sequenzierung der BCBM_{fi} und BMBC_{Chi} verzichtet worden. Neben der viralen Sequenz aus den beiden vorgenannten *full-length* Klonen sind ebenfalls die CaMV 35S-Promotor- und Ribozymsequenzen übernommen worden. Da der 5'-Bereich der BCBM_{Chi} dem des BChV_{fi} entspricht, finden sich zwischen dem Transkriptionsstart und dem Beginn der viralen Sequenz keine Fremdnukleotide.

3.14.1 Infektionstestungen des BCBM_{Chi}

Für die Infektionstestungen mittels Agroinokulation wurden die als T-DNA in den binären Vektor pBIN_SN integrierten BCBM_{Chi} in *A. tumefaciens* LBA4404 Zellen elektroporiert. Es konnten alle fünf nach der Klonierung selektierten BCBM_{Chi} (L345-L349) in *A. tumefaciens* LBA4404 überführt werden. Die Agroinokulationen wurden an *N. benthamiana*, *B. vulgaris*, *C. capitatum* und *C. bursa-pastoris* durchgeführt. Die Überprüfung von erfolgreichen BCBM_{Chi} Agroinfektionen erfolgte mittels TPIA (MAb5G4). Als Positivkontrolle wurde der als infektiös getestete BMYV_{fi} ATHV_L181 verwendet.

Tabelle 3.19: Übersicht von Infektionstestungen und TPIA-Ergebnissen der BCBM_{Chi} (LBA4404_L345-349) und des BMYV_{fi} (ATHV_L181) acht Wochen nach der Agroinfektion an verschiedenen Testpflanzen.

	Anzahl agroinokulierter / Anzahl BCBM_{Chi} infizierter Pflanzen			Nachweis infizierter Zellen im Agroinokulationsbereich*
	<i>N.</i> <i>benthamiana</i>	<i>C.</i> <i>capitatum</i>	<i>C. bursa-</i> <i>pastoris</i>	<i>B. vulgaris</i>
BCBM_{Chi}-Klone				
LBA4404_L345	0 / 11	0 / 2	0 / 3	-
LBA4404_L346	0 / 4	0 / 2	0 / 3	-
LBA4404_L347	0 / 4	0 / 2	0 / 3	-
LBA4404_L348	0 / 4	0 / 2	0 / 3	-
LBA4404_L349	0 / 4	0 / 2	0 / 3	-
BMYV_{fi}-Klon				
ATHV_L181	5 / 5	0 / 2	1 / 2	+

+ = infizierte Zellen nachgewiesen, - = keine infizierten Zellen nachweisbar

* = 14 Tage nach Agroinokulation

Wie in Tabelle 3.19 gezeigt, konnten in *N. benthamiana*, *C. capitatum* und *C. bursa-pastoris* keine systemischen BCBM_{Chi}-Infektionen mittels TPIA festgestellt werden. Um auszuschließen, dass das Ausbleiben einer nachweisbaren systemischen Infektion in einer zum BMYV_{fl} verringerten Fähigkeit zur Replikation begründet liegt, wurde BCBM_{Chi} agroinokuliertes *B. vulgaris* Blattgewebe 14 Tage nach der Inokulation mittels TPIA untersucht. Der TPIA wurde mit agroinokuliertem Blattgewebe von *B. vulgaris* als BChV- und BMYV-Wirtspflanze durchgeführt. Im Inokulationsbereich der untersuchten BCBM_{Chi} konnte mittels TPIA keine infizierte Zelle detektiert werden. Durch TPIA konnten nur bei dem als Positivkontrolle verwendeten BMYV_{fl} ATHV_L181 infizierte Mesophyllzellen festgestellt werden. Die selektierten BCBM_{Chi} werden daher als nicht infektiös eingestuft.

3.14.2 Infektionstestungen des BMBC_{Chi}

Für die Infektionstestungen mittels Agroinokulation wurden die als T-DNA in den binären Vektor pBIN_SN integrierten BMBC_{Chi} in *A. tumefaciens* LBA4404 Zellen elektroporiert. Es konnten vier nach der Klonierung selektierte BCBM_{Chi} (L517-520) in *A. tumefaciens* LBA4404 überführt werden.

Tabelle 3.20: Übersicht von Infektionstestungen mit TPIA- und RT-PCR Ergebnissen der BMBC_{Chi} (LBA4404_L517-520) und des BMYV_{fl} (ATHV_L181) acht Wochen nach der Agroinokulation von *N. benthamiana*.

	Anzahl agroinokulierter / Anzahl BMBC _{Chi} infizierter Pflanzen		Nachweis infizierter Zellen im Agroinokulationsbereich*
	TPIA MAb5G4	RT-PCR	
BMBC_{Chi}-Klone			
LBA4404_517	0 / 4	0 / 4	-
LBA4404_518	0 / 4	0 / 4	-
LBA4404_519	0 / 4	0 / 4	-
LBA4404_L520	0 / 4	0 / 4	-
BMYV_{fl}-Klon			
ATHV_L181	2 / 2	2 / 2	+

+ = infizierte Zellen nachgewiesen, - = keine infizierten Zellen nachweisbar

* = 14 Tage nach Agroinokulation

Die Agroinokulationen wurden an *N. benthamiana* durchgeführt. Die Überprüfung von erfolgreichen BCBM_{Chi} Agroinfektionen erfolgte mittels TPIA (MAb5G4). Als

Positivkontrolle wurde der als infektiös getestete BMYV_{fi} ATHV_L181 verwendet. Da nicht sicher war, ob das verwendete Antiserum MAb5G4 mit dem BChV-IPP Hüllprotein reagiert, wurde zusätzlich von allen Versuchspflanzen Gesamt-RNA extrahiert und eine RT-PCR mit den BMYV-spezifischen Oligonukleotiden BMYVP0s/BMYVP0as durchgeführt.

Wie in Tabelle 3.20 dargestellt, konnte mit keiner der selektierten BMBC_{Chi} eine lokale oder systemische Infektion in *N. benthamiana* nachgewiesen werden. Auch acht Wochen nach der Agroinokulation war in Blattproben oberhalb der Inokulationsstelle in keinem Fall ein Nachweis der BMBC_{Chi} nach RNA-Extraktion und RT-PCR möglich.

4 Diskussion

4.1 Sequenzbestimmung und Phylogenie der Polerovirusisolate BMYV-IPP und BChV-IPP

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Gesamtnukleotidsequenz von deutschen *B. vulgaris* infizierenden Polerovirus-Isolaten bestimmt. Das BMYV-IPP ist, nach dem von Guilley *et al.* (1995) beschriebenen französischen BMYV-2ITB, das zweite vollständig sequenzierte BMYV-Isolat. Die ermittelte Gesamtnukleotidsequenz des BMYV-IPP ergab eine Genomlänge von 5723 nt und war damit um ein Nukleotid länger als die von Guilley *et al.* (1995) für das BMYV-2ITB bestimmte Genomlänge von 5722 nt. Da das zusätzliche Thymin in der BMYV-IPP Nukleotidsequenz innerhalb der nichtkodierenden Region zwischen ORF2 und ORF3 vorliegt, sind die Längen der kodierenden Sequenzbereiche beider Isolate identisch. Aufgrund der festgestellten hohen Übereinstimmung in der Gesamtnukleotid- und Aminosäuresequenz von einzelnen putativen Proteinen, gruppieren sich BMYV-IPP und BMYV-2ITB in einem phylogenetischen Cluster mit naher Verwandtschaft zu BChV-Isolaten und entfernter Verwandtschaft zu CABYV und BWYV. Die nahe Verwandtschaft von BMYV zu BChV und BWYV wird dabei durch hohe Homologien von Aminosäuresequenzen, die durch die ORF3, ORF4 und ORF5 im 3'-Gencluster kodiert werden, bestimmt. Dagegen zeigte ein Vergleich der BMYV-Aminosäuresequenzen, die von den ORF0, ORF1 und ORF2 im 5'-Gencluster kodiert werden, nur eine erhöhte Homologie zu CABYV. Insbesondere das im 5'-Genombereich lokalisierte und als Suppressor des RNA-silencing charakterisierte P0 von Poleroviren (Pfeffer *et al.*, 2002) zeigt innerhalb des Genus die geringsten Homologien (Guilley *et al.*, 1995; Hauser *et al.*, 2000a). Die Integration der BMYV-IPP Aminosäuresequenzen in ein polerovirales phylogenetisches System unterstützt die Vermutung von Guilley *et al.* (1995) und Hauser *et al.* (2002), dass BMYV und CABYV einen gemeinsamen Ursprung in ihrem 5'-Genombereich besitzen. Dagegen lassen die auch in dieser Arbeit festgestellten hohen Homologien von BMYV mit BChV und BWYV einen gemeinsamen Ursprung für alle drei Poleroviren für ihren 3'-Genombereich vermuten.

Der phylogenetische Vergleich der Gesamtnukleotidsequenz des BChV-IPP zeigte eine nähere Verwandtschaft zu dem europäischen Isolat BChV-2a als zu dem amerikanischen Isolat BChV-CR. Wie durch Hauser *et al.* (2002) bereits festgestellt, konnte auch in dieser Arbeit aufgrund von Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz ein gemeinsamer Ursprung von BChV, BMYV und BWYV für ihren 3'-Genombereich angenommen werden. Im Gegensatz zu BMYV konnte aber

keine Sequenzhomologie im BChV 5'-Genombereich zu anderen Poleroviren nachgewiesen werden.

Wie bei den meisten RNA-Viren sind auch Genome von Luteoviren in Abhängigkeit von den verglichenen ORFs oder Genprodukten mehr oder weniger konserviert (Mayo & Miller, 1999; Mayo & D'Arcy, 1999). Innerhalb der Familie der *Luteoviridae* zeigt das Hüllprotein bei einem paarweisen Vergleich auch zwischen entfernt verwandten Spezies eine Identität von 40% und innerhalb des Genus *Polerovirus* eine Übereinstimmung von mindestens 50%. Die taxonomische Klassifizierung von Luteoviren allein aufgrund von Hüllproteinsequenzen ist jedoch nicht aussagekräftig (Mayo & D'Arcy, 1999). Durch die *B. vulgaris* infizierenden Poleroviren BMYV, BWYV und BChV wird dies besonders deutlich: trotz der im Hüllprotein festgestellten hohen Sequenzhomologie von über 90%, zeigen alle drei Viren in ihrem P0 nur eine maximale Homologie von 26% und werden unter anderem erst dadurch als eigenständige Virusspezies definiert (Hauser *et al.*, 2002). Neben der biologischen und serologischen Charakterisierung wird daher für die phylogenetische Klassifizierung eines Luteovirus auch immer die Bestimmung der Gesamtnukleotidsequenz benötigt. Luteoviren, von denen nur die Hüllproteinsequenz bekannt ist, können daher keinem Genus innerhalb der *Luteoviridae* zugeordnet werden ('*unassigned within the family*'; Mayo & D'Arcy, 1999).

Im Gegensatz zu de Miranda *et al.* (1995 a & b), der aufgrund fehlender Sequenzinformationen BMYV-Isolate nicht in einem eigenständigen Cluster gruppieren konnte, postulierten Guilley *et al.* (1995) BMYV als eigenständige Virusspezies. Die Integration der Nukleotid- und putativen Aminosäuresequenzen der Isolate BMYV-IPP und BChV-IPP in einen phylogenetischen Vergleich unterstützen die von Guilley *et al.* (1995) und Hauser *et al.* (2002) dargelegte Klassifizierung von BMYV und BChV als eigenständige Virusspezies innerhalb des Genus *Polerovirus*.

Durch Sequenzanalyse der Isolate BMYV-IPP und BChV-IPP konnten innerhalb des Genus *Polerovirus* konservierte Sequenzmotive nachgewiesen werden. So wurde in beiden Isolaten die konservierte Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums einer Chymotrypsin-ähnlichen Serin-Protease (Gorbalenya *et al.*, 1989; Mayo & Ziegler-Graff, 1996), putative proteolytische VPg-Prozessierungsstellen von Poleroviren (van der Wilk *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 2002) und das in allen Viren mit positivem RNA-Genom vorliegende hochkonservierte GDD-Motiv einer RdRp (Kamer & Argos, 1984) nachgewiesen.

Die Expression der poleroviralen RdRp erfolgt durch einen -1 Leserasterwechsel im Überschneidungsbereich von ORF1 und ORF2 (Prüfer *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1995; Mayo & Ziegler-Graff, 1996). Für diesen Leserasterwechsel wird nach dem

simultaneous slippage Model (Jacks *et al.*, 1988) das konservierte Heptanukleotid-Motiv X XXY YYZ (*shifty* oder *slipery sequence*), wobei Leerzeichen die Kodons auf dem 'Zero-Leseraster' trennen und eine nach 5-6 nt folgende stabile *stem loop*- oder Pseudoknotstruktur benötigt (Prüfer *et al.*, 1992; Alam *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Tamm & Truve, 2000; Paul *et al.*, 2001; Barry & Miller, 2002; Nixon *et al.*, 2002). Nach diesem Modell erfolgt bei einem -1 Leserasterwechsel eine gleichzeitige Translokation der Aminoacyl-tRNA und der Peptidyl-tRNA in der ribosomalen A- bzw. P-Stelle um ein Nukleotid. Hierbei wird eine Fehlpaarung der ersten Base des tRNA-Antikodons mit der dritten Base des entsprechenden Kodons (*wobble*-Position) toleriert (Lopinski *et al.*, 2000). Anschließend wird die ribosomale Translation in dem -1 Leseraster XXX YYY Z fortgesetzt. Während bei allen Poleroviren, inklusive des BChV-IPP und anderen BChV-Isolaten, eine *shifty sequence* gefolgt von einer Pseudoknotstruktur vorliegt (Prüfer *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1993; Guilley *et al.*, 1994; Hauser *et al.*, 2002), bestätigt die Sequenzanalyse des BMV-IPP die Feststellung von Guilley *et al.* (1995), dass die auf der BMV-RNA nachgewiesene Sequenz G GGG GAA vor einer Pseudoknotstruktur keine übliche *shifty sequence* nach Jacks *et al.* (1988) darstellt. Die Untersuchungen von Prüfer *et al.* (1992) lassen für PLRV, und vermutlich auch für alle anderen Poleroviren mit Ausnahme des BMV, einen -1 Leserasterwechsel nach dem von Jacks *et al.* (1988) beschriebenen Modell vermuten.

Der Einfluss der *shifty sequence* auf die Effizienz eines Leserasterwechsels wurde in transienten Expressionssystemen, in denen nach erfolgreichem Leserasterwechsel ein Reporterprotein exprimiert wurde, untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei einer Änderung der *shifty sequence* von PLRV (UUUAAAU) zu UUUACAU oder CUUAAAU (Prüfer *et al.*, 1992) oder des Sobemovirus *Cocksfoot mottle virus* (CfMV) von UUUAAC zu UUUAAGC (Lucchesi *et al.*, 2000) kein Leserasterwechsel stattfindet. Dagegen wurde von Kujawa *et al.* (1993) gezeigt, dass die Modifizierung der PLRV *shifty sequence* zu UUCGAAU, was nach dem *simultaneous slippage* Modell einen Leserasterwechsel ausschließt, zwar die Häufigkeit eines Leserasterwechsels auf 30% des Wildtyps verminderte, aber nicht vollkommen unterbindet. Ebenso konnte durch Paul *et al.* (2001) bei 17 verschiedenen Mutationen der BYDV *shifty sequence* in einem Reportergenessay kein Einfluss der *shifty sequence* auf die Effizienz eines -1 Leserasterwechsels nachgewiesen werden. Die Mutation der BYDV *shifty sequence* (GGGUUUU) zu CGGCUUC in einem infektiösen BYDV *full-length* cDNA Klon unterband jedoch einen Leserasterwechsel und die virale Replikation in Protoplasten vollständig. Die Untersuchungen zur Effizienz

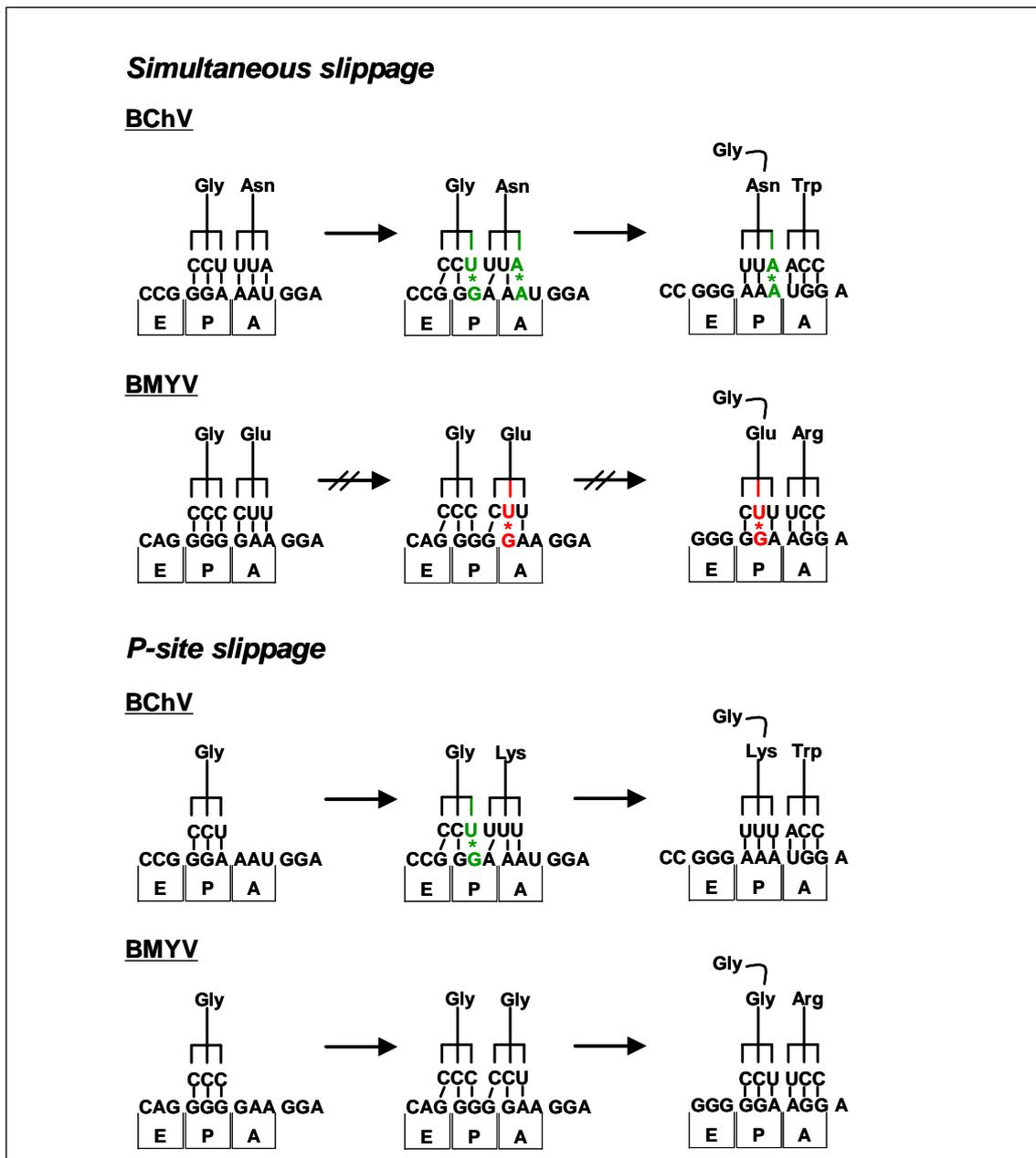


Abbildung 4.1: Hypothetische Modelle, die einen -1 Leserasterwechsel an der BChV bzw. putativen BMV *slippery sequence* beschreiben. Nach dem *simultaneous slippage* Modell (Jacks *et al.*, 1988) führt eine gleichzeitige Translokation der tRNAs an der P- und A-Stelle bei BChV zu zwei *wobble*-Positionen (grün) an der 1. Antikodon- bzw. 3. Kodonposition, während bei BMV die zentrale Kodonposition unpaarig vorliegen würde (rot). Mit dem *P-site slippage* Modell (Yelverton *et al.*, 1994) kann sowohl für BChV als auch für BMV ein -1 Leserasterwechsel ohne unzulässige Antikodon-Kodon Basenpaarungen erklärt werden.

eines Leserasterwechsels durch transiente Expressionssysteme *in vitro*, außerhalb des viralen Gesamtkontexts, spiegeln daher nicht unbedingt eine *in vivo* Situation wieder (Parkin *et al.*, 1992; Reil *et al.*, 1993; Lopinski *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2001).

Neben der *slippery sequence* übt insbesondere die nachfolgende RNA-Struktur (Jacks *et al.*, 1988; Dinman *et al.*, 1991; Parkin *et al.*, 1992; Reil *et al.*, 1993) und auch der Abstand zwischen *slippery sequence* und der RNA-Struktur (Brierley *et al.*, 1989 & 1997) einen Einfluss auf die Häufigkeit eines Leserasterwechsels aus. Wenn diese Bedingungen vorliegen, wie es bei BMVYV der Fall ist, kann ein Leserasterwechsel auch an ungewöhnlichen *slippery sequences* stattfinden (Dinman *et al.*, 1991; Gramstat *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1995; Plant *et al.*, 2004; Mejlhede *et al.*, 2004). Von Gramstat *et al.* (1994) wurde gezeigt, dass für einen -1 Leserasterwechsel des *Potato virus M* (PVM) nur die ersten vier Nukleotide der ungewöhnlichen *shifty sequence* AAAAUGA benötigt werden. Bei diesem Vorgang, dem *P-site slippage*, findet eine Translokation der an der ribosomalen P-Stelle gebundenen tRNA vor der Neubesetzung der A-Stelle statt. Nach dem -1 Leserasterwechsel bindet die tRNA der A-Stelle bereits im neuen Leseraster (Yelverton *et al.*, 1994; Gramstat *et al.*, 1994). Es werden eine Reihe von weiteren Modellen, wie *A-site slippage* (Brierley *et al.*, 1997; Mejlhede *et al.*, 1999; Naphthine *et al.*, 2003) oder *P-E-site slippage* (Horsfield *et al.*, 1995) für einen Leserasterwechsel beschrieben.

Während bei BChV ein -1 Leserasterwechsel nach dem *simultaneous slippage* Modell angenommen werden kann, scheint dieses Modell aufgrund einer zentralen *wobble*-Position in der P-Stelle nach dem Leserasterwechsel für BMVYV unwahrscheinlich (Abbildung 4.1, oben). Auch ein -1 Leserasterwechsel nach dem *A-* oder *P-E-site slippage* Modell kann für BMVYV nicht nachvollzogen werden. Dagegen kann das von Yelverton *et al.* (1994) für das *Human immunodeficiency virus-1* (HIV-1) beschriebene *P-site slippage* Modell sowohl für das BChV als auch für das BMVYV einen -1 Leserasterwechsel erklären (Abbildung 4.1, unten). Das Modell führt dabei im Vergleich zum *simultaneous slippage* Modell zu verschiedenen Aminosäureabfolgen an einer Position. Die putative *shifty sequence* GGGGGAA des BMVYV ist innerhalb der Familie *Luteoviridae* ungewöhnlich. Da der BMVYV_{f1} infektiös ist und das konservierte RdRp-Motiv GDD nur nach einem -1 Leserasterwechsel von ORF1 zu ORF2 translatiert werden kann, findet der Leserasterwechsel vermutlich an dieser ungewöhnlichen *shifty sequence*, die durch eine Spacer-Region von 5 nt von einer Pseudoknotstruktur getrennt wird, statt. Auch wenn ein Leserasterwechsel nach dem *P-slippage* Modell möglich ist, können der genaue Vorgang und die Position, an der ein -1 Leserasterwechsel vollzogen wird, nur durch eine Bestimmung der Aminosäuresequenz innerhalb dieses Bereiches bestimmt werden.

4.2 Infektionstestungen des BMVYV-IPP *full-length* Klons

Die Infektionstestungen mit dem BMVYV_{fi} erfolgte durch die Methode der Agroinfektion. Eine Integration von *full-length* Klonen als T-DNA in ein binäres Vektorsystem und Nutzung der Eigenschaft von *A. tumefaciens* diese T-DNA in pflanzliche Zellen zu überführen, stellt besonders für die phloemlimitierten Luteoviren eine effiziente Inokulationsmethode dar. Im Gegensatz zu aufwändigen *in vitro* RNA-Transkriptionen, RNA-Aufreinigungen, biolistischen Inokulationen oder Protoplasten-Transformationen mit anschließender Übertragung durch Blattläuse, kann durch die Methode der Agroinfektion mit geringem Aufwand eine Infektionstestung durchgeführt werden.

Die Klonierungsstrategie, die auf der Verwendung von Populationsklonen basierte, führte zur Selektion von sieben in den binären Vektor integrierten BMVYV_{fi}. Von diesen Klonen konnten sechs durch die Methode der Agroinfektion als infektiös eingestuft werden. Der BMVYV_{fi} ist biologisch aktiv und auf der BMVYV_{fi} cDNA sind alle Informationen für eine systemische Ausbreitung in Wirtspflanzen und Übertragung durch *Myzus persicae* vorhanden.

Bei der Optimierung der Agroinokulationsmethode wurden erhebliche Unterschiede zwischen den beiden angewandten Methoden A (halbiertes Blatt) und B (Injektion) in Bezug auf die erreichten Infektionsraten festgestellt. Während durch das Eintauchen einer halbierten Blattfläche in die Inokulationssuspension nur eine Infektionsrate von bis zu 12% an *N. benthamiana* erreicht wurde, konnten durch eine Injektion und großflächige Infiltration der Blattfläche wiederholte Infektionsraten von 100% etabliert werden. Die geringen Infektionsraten, die durch Anwendung der Methode A erreicht wurden, lassen vermuten, dass (i) eine geringere Anzahl an phloemassoziierten Zellen erreicht wurde oder (ii) von erfolgreich agroinfiziertem Gewebe durch einen Wundverschluss oder eine hypersensitive Reaktion der Pflanze keine systemische Ausbreitung erfolgen konnte. Dagegen ist die durch Injektion der Agrobaktériensuspension in das Blattgewebe erreichte Infektionsrate von fast 100% vergleichbar mit hohen BWYV-Agroinfektionsraten, die durch Injektion der rekombinanten Agrobakterien mit einer Hamilton-Spritze in den Blattstiel oder Stamm von *N. clevelandii* erreicht wurden (Leiser *et al.*, 1992; Brault *et al.*, 2000). Dagegen wurden in anderen Untersuchungen weitaus geringere oder sehr variable Agroinfektionsraten zwischen 25 und 100%, die durch Injektion mit einer Hamilton-Spritze mit CABYV (Prüfer *et al.*, 1995), PLRV (Nurkiyanova *et al.*, 2000; Kawchuk *et al.*, 2002) oder auch mit BWYV *full-length* Klonen an *N. clevelandii* (Brault *et al.*, 1995) oder *N. benthamiana* (Leiser *et al.*, 1992) erreicht wurden, festgestellt. Von Nurkiyanova *et al.* (2000) wurde berichtet, dass die Injektion mit einer Hamilton-Spritze zu höheren PLRV-Agroinfektionsraten an *N. benthamiana* und *N. clevelandii* führte, als

eine Infiltration des Blattgewebes. Die in dieser Arbeit angewandte BMV_{IP}-Agroinfektionsmethode wurde an *N. benthamiana* optimiert. Die durchgängig hohen BMV_{IP}-Infektionsraten, die an dieser Pflanzenart erreicht wurden, konnten jedoch mit keiner anderen agroinfiltrierten Wirtspflanzenart festgestellt werden. Grundsätzlich bestätigt dies die Aussage von Mutterer *et al.* (1999b), dass bei jeder Wirtspflanzen-Virus Kombination unter Umständen die Notwendigkeit besteht, die Methode der Agroinfektion zu optimieren. Die Optimierungsversuche in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Agroinfektionsrate nicht von den verwendeten *A. tumefaciens* Stämmen ATHV oder LBA4404 beeinflusst wird und das sechs nicht-virale Fremdnukleotide am 5'-terminalen Bereich des primären RNA-Transkripts toleriert werden. Der als hypervirulent beschriebene *A. tumefaciens* Stamm ATHV (Sonntag *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001) zeigte unter den gewählten Anzuchtbedingungen ein im Vergleich zu LBA4404 gleichmäßigeres Wachstum und eine geringere Neigung zur Agglutination. Da jedoch mit beiden Stämmen bei allen Versuchen eine Agroinfektionsrate von 100% erreicht werden konnte, kann ein Einfluss der *A. tumefaciens* Stämme auf die Infektionsrate ausgeschlossen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit BWYV- und CABYV-Agroinfektionsversuchen, in denen mit den *A. tumefaciens* Stämmen LBA4404 (Leiser *et al.*, 1992; Brault *et al.*, 2000) oder C58C1 (Prüfer *et al.*, 1995), ein *A. tumefaciens* Stamm mit gleichem genetischen Hintergrund wie ATHV, zumindest in Teilerperimenten, alle Versuchspflanzen erfolgreich agroinfiziert werden konnten.

Da bereits einige zusätzliche nicht-virale Nukleotide am 5'-Terminus der RNA-Transkripte die Infektiosität von *full-length* Klonen stark reduzieren können (Dawson *et al.*, 1986; van der Werf *et al.*, 1986; Janda *et al.*, 1987; Boyer & Haenni, 1994) wurden luteovirale *full-length* Klone möglichst ohne (Franco-Lara *et al.*, 1999) oder nur mit ein (Leiser *et al.*, 1992; Prüfer *et al.*, 1995; Prüfer *et al.*, 1997) oder zwei (Young *et al.*, 1991; Veidt *et al.*, 1992) nicht-viralen Fremdnukleotiden am Transkriptionsstart hergestellt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Verlängerung des primären BMV_{IP}-Transkripts um sechs Nukleotide keinen Einfluss auf die Infektiosität besitzt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei Verwendung eines anderen Initialisierungssignals als den verdoppelten CaMV 35S Promotor oder einer anderen Fremdnukleotidsequenz als CGCGCC die Infektiosität vermindert wird.

4.3 Agroinfektion als artifizielle Virusübertragung und Determination des Wirtspflanzenspektrums

In dieser Arbeit sollte das Wirtspflanzenspektrum des BMV-IPP und des BChV-IPP nach Übertragung durch Blattläuse und durch die Methode der Agroinfektion bestimmt werden. Von besonderem Interesse war hierbei, ob die von Hauser *et al.* (2000a, 2002) berichteten Unterschiede im Wirtspflanzenspektrum von BMV und BChV auch bei

den deutschen Isolaten BMYV-IPP und BChV-IPP nachgewiesen werden können. Nach Hauser *et al.* (2000a, 2002) können BChV-Infektionen in *C. capitatum* und nicht *C. bursa-pastoris* und BMYV-Infektionen in *C. bursa-pastoris* und nicht *C. capitatum* nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Methode der Agroinfektion als ein artifizierlicher Übertragungsweg das Wirtspflanzenspektrum des BMYV erweitert.

Die natürliche Übertragung der Poleroviren BMYV und BChV benötigt Blattläuse (Hauptvektor *Myzus persicae*) als Virusvektoren. Die persistente und zirkulative Übertragung durch Blattläuse ist innerhalb der Familie *Luteoviridae* eine konservierte Eigenschaft und impliziert den spezifischen Transport der Virionen durch die Epithelmembranen des Enddarms und der Speicheldrüse des Vektors und die Interaktion mit endosymbiontischem *Buchnera* GroEL. Das ein Luteovirus nur von einer oder einigen wenigen Aphiden-Arten effizient übertragen werden kann, zeigt die hohe Spezifität dieses zirkulativen Übertragungsweges. Die Effizienz der Übertragung in einer Virus-Vektor Kombination kann dabei zusätzlich zwischen verschiedenen Virusisolaten und auch Blattlausklonen variieren (Herrbach, 1999). Für eine Determination des Wirtspflanzenspektrums durch Blattläuse als Virusvektoren müssen sowohl Virus und Blattlaus, Virus und Testpflanze als auch Blattlaus und Testpflanze kompatibel sein. Da Luteoviren nicht mechanisch übertragbar sind, wurden ihre Wirtspflanzenspektren bisher ausschließlich durch Blattlausübertragung festgestellt.

Die Versuche zur Übertragung des BMYV-IPP mittels *Myzus persicae* haben gezeigt, dass das Isolat effizient auf *N. benthamiana*, *B. vulgaris* und *C. bursa-pastoris* jedoch nicht auf *C. capitatum* übertragen werden kann. Das durch BMYV_{fl}-Agroinfektionen festgestellte Wirtspflanzenspektrum zeigte eine gute Übereinstimmung mit den Berichten von Russel (1965), Stevens *et al.* (1994), Björling & Nielsson (1966), Graichen & Rabenstein (1996), Mayo *et al.* (2000) und Hauser *et al.* (2002) über das BMYV-Wirtspflanzenspektrum. Die Angaben zu BMYV-Wirtspflanzen innerhalb der Familien der *Solanaceae* und *Chenopodiaceae* sind dabei jedoch widersprüchlich. Die festgestellten BMYV_{fl}-Agroinfektionen und Infektionen nach Blattlausübertragung des BMYV_{fl} und BMYV-IPP an *N. benthamiana* und *N. clevelandii* sind in Übereinstimmung mit den von Mayo *et al.* (2000) durch ELISA nachgewiesenen BMYV-Infektionen an beiden Pflanzenarten. Im Gegensatz dazu konnten Graichen & Rabenstein (1996) und Russel (1965) nach Blattlausübertragung keine BMYV-Infektionen an *N. benthamiana* oder *N. clevelandii* feststellen. Auch liegen unterschiedliche Ergebnisse zu *C. capitatum* und *C. foliosum* als mögliche BMYV-Wirtspflanzen (Björling & Nielsson, 1966; Graichen & Rabenstein 1996) bzw. nicht-Wirtspflanzen (Russel, 1965; Hauser *et al.*, 2002) vor. In allen in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen war ein

serologischer Nachweis einer systemischen BMV_{fl}- oder BMV-IPP-Infektion in *C. capitatum* nicht erfolgreich. Die festgestellten Unterschiede im BMV-Wirtspflanzenspektrum nach Blattlausübertragung haben möglicherweise ihre Ursache in der Verwendung verschiedener Virusisolate oder in einer BMV/BChV-Mischinfektion der Spenderpflanze. Das durch Hauser *et al.* (2000) beschriebene BChV ist aufgrund der hohen Homologie im Bereich des Hüllproteins mit derzeit erhältlichen Antiseren nicht von BMV zu unterscheiden (Mark Stevens, pers. Komm.), kann aber durch ELISA in BChV-infizierten *C. capitatum* nachgewiesen werden. In den von Björling & Nielsson (1966) bzw. Graichen & Rabenstein (1996) beschriebenen BMV-Wirtspflanzenspektren kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um die Beschreibungen von BMV/BChV Mischinfektionen gehandelt hat. Durch eine Inokulation der Testpflanzen mittels BMV_{fl}-Agroinfektion können solche Mischinfektionen aus der Spenderpflanze ausgeschlossen werden.

Durch BMV_{fl}-Agroinfektionen konnten alle als BMV-Wirtspflanzen charakterisierten Pflanzenarten erfolgreich systemisch infiziert werden. Die Methode der Agroinfektion führte dabei nicht zu einer Erweiterung des BMV-Wirtspflanzenspektrums. Von Salazar *et al.* (1988) konnten Potato spindle tuber viroid (PStV, Genus *Pospiviroid*, Familie *Pospiviroidae*) resistente *Solanum acaule* nach Agroinokulation mit PStV *full-length* cDNA Klonen erfolgreich infiziert werden. Da sich PStV in diesen Pflanzen systemisch nachweisen ließ, mußte davon ausgegangen werden, dass durch Agroinfektion nicht etwa das Wirtspflanzenspektrum erweitert, sondern nur eine Feldresistenz gegenüber mechanischer Inokulation umgangen wurde. Die Methode der Agroinfektion wird von Salazar *et al.* (1988) in diesem Zusammenhang als eine Methode zur Unterscheidung von tatsächlichen Immunitäten und Übertragungsresistenzen bei der Determination von Wirtspflanzenspektren beschrieben. Es ist jedoch zu beachten, dass durch eine Injektion der Agrobaktériensuspension als gewählte Methode der Agroinfektion, möglicherweise bei verschiedenen Testpflanzen, insbesondere aus der Familie der Chenopodiaceae, nur deshalb keine erfolgreiche systemische Infektion etabliert wurde, weil ein Zugang zu phloemassoziierten Pflanzenzellen nicht gelungen ist. So wird von Mutterer *et al.* (1999b) berichtet, dass *N. benthamiana* und *Lactuca sativa* nicht BWYV-agroinfiziert werden konnten, aber eine Blattlausübertragung auf diese Pflanzenarten von BWYV-agroinfizierten *N. clevelandii* erfolgreich war. Da jedoch die Ergebnisse von BMV-Agroinfektionen und BMV-Blattlausübertragungen übereinstimmen, kann angenommen werden, dass ein Ausbleiben einer erfolgreichen Infektion eine inkompatible Virus-Pflanze Kombination anzeigt, die auch durch artifizielle Übertragungswege wie Agroinfektion nicht umgangen werden kann. Da *A. tumefaciens* seine T-DNA auf 600 Pflanzenarten aus

90 Familien übertragen kann (Zupan *et al.*, 2002) und auch *N. edwardsonii* (Kiernan *et al.*, 1989), *N. rustica* (Tinland *et al.*, 1992), *N. glutinosa* (Waggoner & Dimond, 1952), *C. quinoa* (Komari, 1990) und *B. napus* (Grimsley *et al.*, 1989; Moloney *et al.*, 1989) als Wirtspflanzen akzeptiert, kann das Ausbleiben erfolgreicher BMV_{fl}-Agroinfektionen bei diesen Pflanzenarten nicht in einer Inkompatibilität zwischen Bakterium und Pflanze begründet sein. Nach BMV_{fl}-Agroinfektionen konnten in dieser Arbeit zwar keine systemischen Virusinfektionen in *N. tabacum* cv. 'Xanthi', *N. occidentalis* oder *C. capitatum* nachgewiesen werden, jedoch zeigte die serologische Untersuchung des Inokulationsbereiches durch TPIA, dass in diesem Bereich BMV_{fl}-Hüllprotein nachgewiesen werden kann. Da die Translation des Hüllproteins von subgenomischer RNA stattfindet, ist anzunehmen, dass in diesen drei nicht systemisch infizierten Wirtspflanzenarten eine lokal begrenzte Virusreplikation stattgefunden hat. Eine nachweisbare Ausbreitung von dem primären Infektionsort war aber unterbunden. Da durch die angewandte Methode der Agroinfektion vermutlich auch bei diesen Pflanzen phloemassoziiertes Pflanzengewebe BMV_{fl}-infiziert wurde, beschränkt unter Umständen das Fehlen einer effizienten BMV_{fl} P4-Movementfunktion oder eine ungenügende P0-Suppressoraktivität in diesen Pflanzenarten die virale Infektion auf den agroinokulierten Gewebebereich. Von Carrington *et al.* (1996) wurde beschrieben, dass kompatible Interaktionen zwischen pflanzlichen Faktoren und viralen Movementfunktionen eine Voraussetzung für erfolgreiche Virusinfektionen sind. Ebenso müssen virale Suppressoren in der Lage sein, die pflanzlichen Abwehrmechanismen effektiv zu unterdrücken (Voinnet *et al.*, 1999; Li & Ding, 2001; Roth *et al.*, 2004; Ding *et al.* 2004; Moissiard & Voinnet, 2004), da pflanzliche RNA-silencing Mechanismen an einer Nicht-Wirtsresistenz beteiligt sind (Rovere *et al.*, 2002). So wurde für das später als Suppressor des RNA-silencing charakterisierte P19 (Voinnet *et al.*, 1999 & 2003; Qu & Morris, 2002) des *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, Tombusvirus) bereits im Jahr 1995 durch Scholthof *et al.* gezeigt, dass es an der wirtsspezifischen Ausbreitung beteiligt ist. Ein wirtsspezifischer Einfluss im Langstreckentransport wird auch für den Suppressor 2b des *Cucumber mosaic virus* (CMV, Cucumovirus) beschrieben (Brigneti *et al.*, 1998). Das als Suppressor des RNA-silencing beschriebene P0 von Poleroviren (Pfeffer *et al.*, 2002) ist möglicherweise ebenfalls in verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich effektiv und ist damit eine mögliche Determinante der BMV_{fl}-Wirtsspezifität. Über einen möglichen Einfluss des P0 auf das Wirtspflanzenspektrum von Poleroviren wurde bereits durch Mayo *et al.* (1989) und Veidt *et al.* (1992) hingewiesen. Das BMV_{fl}-P0 ermöglicht durch intrazelluläre Unterdrückung des RNA-silencing Mechanismus eine virale Replikation in allen primär infizierten Zellen in lokal infizierten BMV_{fl}-Wirtspflanzen, ist aber nicht in

der Lage, wie für das BWYV-P0 gezeigt (Pfeffer *et al.*, 2002), ein systemisches *silencing*-Signal zu unterdrücken. Eine sekundäre Infektion von Zellen ist dann aufgrund ungenügender P0-Suppressorfunktion in diesen Wirtspflanzen selbst in phloemassoziierten Zellbereichen unterbunden und eine systemische BMVYV-Infektion bleibt aus.

Neben einer ungenügenden P0-Suppressoraktivität in lokal infizierten Wirtspflanzen kann die Unterdrückung einer systemischen Infektion dieser Pflanzen auch in einer fehlenden Movementfunktion begründet liegen. Durch die Methode der Agroinfektion wurden vermutlich auch phloemassoziierte Zellen erfolgreich BMVYV-infiziert, für eine systemische Ausbreitung müssen BMVYV-Viruspartikel jedoch von infizierten Phloemparenchym- oder Geleitzellen über Plasmodemen in die Siebröhren entlassen und nach der Translokation mit dem Phloemassimilatstrom an anderer Stelle wieder aufgenommen werden. Ist der Kurzstreckentransport von primär infizierten Phloemparenchym- oder Geleitzellen in die Siebröhren und umgekehrt aufgrund von Wirtsfaktoren stark eingeschränkt oder ganz unterbunden, reduziert sich die Zahl möglicher Orte der BMVYV-Replikation und damit die Möglichkeit einer systemischen Ausbreitung. Nach Derrick & Barker (1997) wird der PLRV-Kurzstreckentransport in Kartoffeln durch das ORF4-Movementprotein P17 ermöglicht. In ihren Untersuchungen wurde gezeigt, dass in PLRV-resistenten Kartoffelsorten der Kurzstreckentransport extrem vermindert ist und vermutet, dass der pflanzliche Resistenzfaktor die Movementfunktion des P17 inhibiert oder seine Expression unterdrückt. Für BWYV (Ziegler-Graff *et al.*, 1996) und PLRV (Lee *et al.*, 2002) wird angenommen, dass es in Abhängigkeit der Wirtspflanze zwei verschiedene Möglichkeiten zur systemischen Ausbreitung der beiden Viren gibt: Einen Movementprotein-abhängigen und einen Movementprotein-unabhängigen Weg, der den alleinigen Transport durch Virionen beinhaltet. Durch Lee *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass das PLRV-P17 wirtsspezifisch benötigt wird und für eine systemische Infektion von *Physalis floridana* und *Solanum tuberosum*, nicht aber an einer Infektion von *N. benthamiana* oder *N. clevelandii* beteiligt ist. In den lokal infizierbaren BMVYV-Wirtspflanzen *N. tabacum* cv. 'Xanthi', *N. occidentalis* und *C. capitatum* sind beide Möglichkeiten der Ausbreitung jedoch nicht effektiv.

In agroinokuliertem Gewebe von *N. glutinosa* konnte kein BMVYV-Hüllprotein nachgewiesen werden. In *N. glutinosa* fehlen möglicherweise an der viralen Replikation beteiligte Wirtsfaktoren oder die RNA-*silencing* Abwehrmechanismen dieser Pflanzenart unterdrücken die Replikation im Inokulationsbereich so effektiv, dass eine nachweisbare Akkumulation von BMVYV-Hüllprotein ausgeschlossen ist. Solche pflanzlichen Faktoren sind unter anderem bei der viralen Replikation, der Translation

und der Bildung von membranassoziierten Replikationskomplexen von positivsinnigen Viren beteiligt (Ahlquist *et al.*, 2003).

Obwohl die Ausbreitung des BMVYV und aller anderen Luteoviren vornehmlich auf das vaskuläre Pflanzengewebe beschränkt ist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl in agroinfiltrierten als auch in über Aphiden infizierten *N. benthamiana* vereinzelt Zellen außerhalb des Phloems BMVYV-infiziert wurden. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Barker *et al.* (2001), die nach Blattlausübertragung in PLRV-infizierten *N. benthamiana* in einer geringen Anzahl von nicht-vaskulären Zellen eine PLRV-Infektion nachweisen konnten. Durch Zell-zu-Zell Ausbreitung werden danach einzelne nicht-vaskuläre Zellen, die in Verbindung zu phloemassoziiertem Gewebe stehen, mit PLRV infiziert (Barker *et al.*, 1987 & 2001; van den Heuvel *et al.*, 1995). Das Ausbleiben einer großflächigen PLRV-Infektion im nicht-vaskulären Bereich liegt demzufolge zum einen in einer fehlenden Movementfunktion und zum anderen in einer fehlenden Unterdrückungsmöglichkeit von pflanzlichen RNA-*silencing* Mechanismen in diesen Geweben begründet. Durch die angewandte Methode der Agroinfektion konnten jedoch in dieser Arbeit auch ein Großteil der nicht-vaskulären Zellen im Inokulationsbereich BMVYV-infiziert werden. Im primären Infektionsort scheinen daher die Mechanismen, die zu einer Phloemlimitierung des BMVYV führen, nicht oder noch nicht zu wirken. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass im weiteren Infektionsverlauf auch im agroinokulierten Gewebe RNA-*silencing* Mechanismen die virale Replikation verstärkt unterbinden.

Die durch Agroinfektion induzierte Herstellung viraler Transkripte entgeht vermutlich dem pflanzlichen RNA-*silencing* Mechanismus und führt zur massiven Akkumulation von Hüllproteinen im Inokulationsbereich. Es ist denkbar, dass das BMVYV-P0 in diesen primär infizierten Zellen intrazellulär den pflanzlichen RNA-*silencing* Mechanismus unterdrücken kann, aber die Ausbreitung eines systemischen *silencing*-Signals nicht verhindert. Ungeachtet einer fehlenden BMVYV-Movementfunktion verhindert das systemische *silencing*-Signal die BMVYV-Replikation außerhalb des Infektionsortes und beschränkt die virale Replikation auf wenige primär infizierte Zellen. Von Pfeffer *et al.* (2002) wurde für BWYV gezeigt, dass das BWYV-P0 ein starker intrazellulärer Suppressor des RNA-*silencing* ist, aber keinen Einfluss auf den *silencing*-Status der Pflanze außerhalb seines Initiierungsortes hatte. Wie von Moissiard & Voinnet (2004) für BWYV vermutet, kann auch für BMVYV angenommen werden, dass die intrazelluläre P0-Suppressoraktivität ein Faktor für die natürliche Phloemlimitierung von Poleroviren darstellt: Nach einer natürlichen Virusübertragung durch Blattläuse erlaubt die P0-Suppressoraktivität die polerovirale Replikation und Akkumulation in phloemassoziierten Zellen (Geleitzellen). Da das P0 aber kein virusinduziertes

systemisches *silencing*-Signal unterdrückt, ist eine weitere Ausbreitung des Polerovirus im Blatt unterbunden. Dies führt zu einer Akkumulation des Virus im Phloem und erhöht die Möglichkeit einer Virusaufnahme durch phloemsaugende Blattläuse für eine horizontale Virusübertragung. Grundsätzlich kann die Phloemlimitierung von Luteoviren aber auch durch ungenügende Movementfunktionen außerhalb des Phloems in ähnlicher Weise begründet werden.

In BMV-agroinfigierten *N. benthamiana* wurden dreimal mehr infizierte Mesophyllzellen durch TPIA nachgewiesen als in BMV-blattlausinfizierten Pflanzen. Da diese Zellen vermutlich in gleicher Weise durch Zell-zu-Zell Ausbreitung aus phloemassoziiertem Gewebe infiziert wurden, lässt die unterschiedliche Anzahl infizierter Mesophyllzellen auf einen leicht erhöhten BMV-Virustiter in agroinfigierten *N. benthamiana* schließen. Das durch Blattläuse eingebrachte Virusinokulum war vermutlich geringer als die Inokulummenge, die durch eine möglicherweise andauernde Transkription des BMV_{fl} in agroinfigiertem Gewebe bereitgestellt wurde.

Die angewandte Methode der Agroinfektion ermöglichte die Bestimmung des BMV-IPP Wirtspflanzenspektrums. Durch Agroinfektion und Blattaübertragung konnten systemische BMV-Infektionen in gleichen Pflanzenarten festgestellt werden. Im Gegensatz zu Übertragungsversuchen mittels Blattläusen ist die Methode der Agroinfektion eine leicht durchzuführende Inokulationsmethode mit deren Hilfe polerovirale systemisch infizierte, lokal infizierte und Nicht-Wirte (nach Hull, 2002) unterschieden werden können. Das BMV-Hüllprotein akkumulierte massiv in agroinokuliertem Mesophyllgewebe von systemischen und lokalen Wirtspflanzen. Die starke Akkumulation bedingt eine effiziente intrazelluläre P0-Suppressoraktivität auch in Geweben, die natürlicherweise nicht von BMV infiziert werden. Eine Ausbreitung in diesen Geweben ist jedoch aufgrund fehlender Unterdrückung eines systemischen *silencing*-Signals durch das BMV-P0 oder ungenügender Movementfunktionen unterbunden.

4.4 Markierung des BMV_{fl} mit dem *Green fluorescent protein* (GFP)

Durch die Markierung des BMV_{fl} mit GFP sollte die Virusausbreitung vom Ort der Inokulation verfolgt werden. Zu diesem Zweck wurde die GFP-Sequenz um die autoproteolytische Prozessierungssequenz des FMDV-P2 erweitert und als 5'-terminale Erweiterung des BMV_{fl}-ORF0 (5'P0-BMV_{fl}GFP) bzw. 3'-terminale Verlängerung des BMV_{fl}-ORF2 (3'REP-BMV_{fl}GFP) in den BMV_{fl} integriert.

Nach Agroinfektion konnte mit beiden GFP-markierten BMV_{fl} in epidermalen Blattzellen von *N. benthamiana* eine deutliche GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Diese Zellen wurden nur im agroinokulierten Gewebe nachgewiesen.

Während im agroinokulierten Bereich durch TPIA in zahlreichen Zellen Hüllprotein nachgewiesen wurde, konnte nur in einer geringen Zahl von Epidermiszellen eine GFP-Fluoreszenz durch konfokale Mikroskopie detektiert werden. Sowohl im 3'REP-BMYV_{flGFP} als auch im 5'P0-BMYV_{flGFP} erfolgte die P2A-GFP-Integration an virale Proteine, die *in vivo* nur in geringen Mengen oder gar nicht in Polerovirus-infizierten Pflanzen nachgewiesen werden können. Das P0 besitzt einen suboptimalen Translationsinitiierungskontext und kann aufgrund geringer Proteinkonzentration in infizierten Pflanzen nicht nachgewiesen werden (Pfeffer *et al.*, 2002). Das P1/2 Fusionsprotein als polerovirale RdRp kann nur zu einem frühen Infektionszeitpunkt und nur in geringer Konzentration in infizierten Pflanzen nachgewiesen werden (Fomitcheva *et al.*, 2004; Schubert, J., pers. Komm.). Aufgrund der P2A-vermittelten Proteinprozessierung war die GFP-Konzentration direkt an die Konzentration des translatierten P0 oder P1/2 gebunden und überschritt daher nur in wenigen Zellen die Detektionsschwelle. Dagegen führte die Translation des Hüllproteins von subgenomischer RNA in einer weitaus größeren Anzahl von Mesophyllzellen zu nachweisbaren Proteinkonzentrationen.

Da bei Poleroviren das Hüllprotein von subgenomischer RNA translatiert wird, ist anzunehmen, dass die virale Replikation und die Bildung von sgRNA durch eine virale RdRp stattgefunden hat. Die detektierten GFP-markierten Epidermiszellen zeigten, dass die P2A-vermittelte Proteinprozessierung im 5'P0-BMYV_{flGFP} und 3'REP-BMYV_{flGFP} in diesen Zellen stattgefunden hat oder zumindest die Translation einer funktionellen RdRp vorlag. Grundsätzlich ist anzunehmen, dass eine GFP-Fluoreszenz auch von nicht prozessierten GFP-P0 bzw. P1/2-GFP Fusionsproteinen ausgehen kann. Es ist jedoch fraglich, ob eine C-terminale Verlängerung einer nicht P2A-prozessierten BMYV-RdRp um über 240 Aminosäuren zu der Bildung einer funktionellen RdRp führt.

Die im Vergleich zur BMYV_{fl}-Kontrolle geringe Anzahl von Zellen im Inokulationsbereich in denen durch TPIA Hüllprotein oder eine GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, zeigt jedoch an, dass bei beiden Klonen die virale Replikation beeinträchtigt ist. Zum einen inhibieren möglicherweise unvollständig P2A-prozessierte P0- bzw. P1/2-GFP Fusionsproteine die Replikation oder die nach einer erfolgreichen Prozessierung vorliegende Verlängerung des P0 um 5 oder des P1/2 (RdRp) um 19 Aminosäuren beeinflussen die Funktionalität beider Proteine.

Eine systemische Ausbreitung der GFP-markierten BMYV_{fl} konnte auch nach Mischinfektion mit dem infektiösen BMYV_{fl} nicht nachgewiesen werden. In 3'REP-BMYV_{flGFP} und 5'P0-BMYV_{flGFP}-agroinokuliertem Gewebe konnten lokale Infektionen detektiert werden, eine systemische Ausbreitung blieb jedoch aus. Diese Ergebnisse

stimmen mit Untersuchungen von Nurkiyanova *et al.* (2000) mit GFP-markierten PLRV_{fi} (PLRV-GFP) überein. Nach Insertion der GFP-Sequenz in den PLRV-ORF5 in den gleichen Leserahmen konnte nur innerhalb des agroinokulierten Bereiches oder primär durch Blattläuse infizierten Zellen eine GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Durch ISEM-Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass der PLRV-GFP isometrische Viruspartikel bildet, die das P5-GFP Fusionsprotein enthielten. Nurkiyanova *et al.* vermuteten, dass zwar die aufgrund der GFP-Insertion um 707 nt verlängerte RNA vollständig in das Viruspartikel integriert war, die systemische Ausbreitung aber aufgrund (i) der Eliminierung einer putativen Transportdomäne innerhalb des P5 durch die GFP-Insertion oder (ii) der Verlängerung der viralen RNA um die GFP-Sequenz, welche zu einer veränderten RNA-Sekundärstruktur und damit zu einer Instabilität der Viruspartikel führt, unterbunden wurde. Während mit dem PLRV-GFP keine systemischen Infektionen etabliert wurden, konnten nach Blattlausübertragung und Agroinokulation jedoch systemisch mutierte PLRV-GFP RNA, die keine oder nur noch geringe Teile der GFP-Sequenz enthielt, nachgewiesen werden. Von Qu & Morris (1997) wurde für das *Turnip crinkle virus* (TCV, Genus *Carmovirus*, Familie *Tombusviridae*) gezeigt, dass für die Aufnahme in isometrische Viruspartikel die Länge der RNA von entscheidender Bedeutung ist. Während eine Verkürzung der RNA meist ohne Folgen bleibt, unterbindet eine artifizielle Verlängerung über die Aufnahmekapazität die Bildung stabiler Viruspartikel.

Zusammenfassend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann angenommen werden, dass eine Verlängerung der genomischen RNA von Poleroviren zu einer Instabilität der gebildeten Viruspartikel führt, die eine systemische Ausbreitung unterbindet. Im Gegensatz zu Viren mit stäbchenförmigen oder filamentösen Partikeln, die aufgrund ihrer helikalen Anordnung der Hüllproteineinheiten keine theoretische Begrenzung in ihrer Partikelgröße besitzen, bestehen isometrische Partikel aus einer fest definierten Anzahl von Proteineinheiten und sind damit in ihrer Aufnahmekapazität begrenzt. Die Vermutung von Nurkiyanova *et al.* (2000), dass die systemische Ausbreitung des PLRV-GFP aufgrund einer Eliminierung einer Transportdomäne innerhalb der RTD ausblieb, kann für die beiden hier untersuchten GFP-markierten BMYV_{fi} nicht angenommen werden. Da alle an der Bildung von BMYV-Viruspartikeln beteiligten Leserahmen nicht von der GFP-Insertion betroffen waren, hätte eine systemische Ausbreitung stattfinden müssen. Vielmehr ist zu vermuten, dass die Verlängerung der BMYV_{fi}-RNA um 782 nt im 5'P0-BMYV_{fiGFP} bzw. 774 nt im 3'REP-BMYV_{fiGFP} die Bildung instabiler Viruspartikel zur Folge hatte. Obwohl Nurkiyanova *et al.* (2000) vermuten, dass die um 707 nt verlängerte PLRV-GFP RNA vollständig in das Viruspartikel aufgenommen wurde, muss angenommen werden, dass sich nur die

PLRV-GFP Mutanten mit GFP-Deletionen systemisch ausbreiten können. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass in primär infizierte Zellen nach einer Blattlausübertragung ebenfalls nur PLRV-GFP Deletionsmutanten in stabilen GFP-markierten Viruspartikeln eingebracht wurden, die dann nach drei Wochen systemisch nachgewiesen werden konnten. Die festgestellte GFP-Fluoreszenz in primär infizierten Zellen zeigte dabei keine lokale Replikation des PLRV-GFP an, sondern nur die ursprünglich durch Blattläuse eingebrachte Menge von GFP-markierten Partikeln.

Auch sechs Wochen nach der Agroinokulation konnte mit keinem der beiden GFP-markierten BMV_{fl} eine systemische Infektion etabliert werden. Es ist anzunehmen, dass, wie für den PLRV-GFP gezeigt (Nurkiyanova *et al.*, 2000), nur Deletionsmutanten mit einer RNA-Länge, die kompatibel mit der Aufnahmekapazität der BMV -Partikel ist, die Möglichkeit zur systemischen Ausbreitung besitzen. Nach der Insertion von Fremdsequenzen in virale Genome wurde bei mehreren Pflanzenviren festgestellt, dass es eine Tendenz zur Deletion dieser Sequenzen gibt (Chapman *et al.*, 1992; Culver, 1996; Dolja *et al.*, 1993 & 1997). Sind dabei keine Proteine die für die Replikation oder Ausbreitung notwendig sind betroffen, besitzen diese Deletionsmutanten weiterhin die Möglichkeit Pflanzen systemisch zu infizieren. Im PLRV-GFP wurde die GFP-Sequenz in die RTD, also einem Bereich der nicht vollständig für eine systemische Ausbreitung und überhaupt nicht für die virale Replikation benötigt wird, inseriert. Eine Deletion der GFP-Fremdsequenz und von vor- und nachgelagerten Sequenzbereichen der RTD führt dadurch zu replikations- und ausbreitungsfähigen Mutanten. Eine Deletion der GFP-Fremdsequenz im 5'P0- $\text{BMV}_{\text{flGFP}}$ oder 3'REP- $\text{BMV}_{\text{flGFP}}$ beinhaltet dagegen mit großer Wahrscheinlichkeit auch Deletionen in Teilbereichen des ORF0 bzw. ORF2, wodurch die virale Replikation vermutlich unterbunden wird und somit auch keine systemische Ausbreitung stattfinden kann. Abschließend muss erwähnt werden, dass in dieser Arbeit keine Untersuchungen durchgeführt wurden, ob in 5'P0- $\text{BMV}_{\text{flGFP}}$ oder 3'REP- $\text{BMV}_{\text{flGFP}}$ agroinokulierten Bereichen vollständige isometrische Viruspartikel gebildet wurden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass durch die durchgeführten serologischen Untersuchungen des agroinokulierten Bereiches mittels TPIA nur Hüllproteine nicht aber vollständige Viruspartikel nachgewiesen wurden.

4.5 Charakterisierung von BMV Amplicon-transgenen *N. benthamiana*

Durch Agrobakterien-vermittelte Transformation konnte der BMV_{fl} erfolgreich in das Genom von *N. benthamiana* integriert werden. Nach den PLRV Amplicon-transgenen Kartoffelpflanzen (Prüfer *et al.*, 1997; Franco-Lara *et al.*, 1999), Tabakpflanzen (Franco-Lara *et al.*, 1999; Barker *et al.*, 2001) und PLRV-GFP Amplicon-transgenen *N. benthamiana* (Taliany *et al.*, 2004) sind dies die ersten Amplicon-transgenen

Pflanzen eines anderen Polerovirus als PLRV. In den *BMV Amplicon*-transgenen Pflanzen wurden *BMV*-Infektionen nachgewiesen und die Untersuchungen durch ISEM zeigten typische isometrische Viruspartikel.

Nach Selektion aus der Gewebekultur und Selbstung der T_0 -Mutterpflanzen konnten drei unabhängige T_1 -Linien und drei T_2 -Linien selektiert werden, die zwischen einer und vier Kopien des *BMV_{fl}* als Transgen besitzen. Die T_1 -Linie 220.1 mit vier Transgenkopien und ihre T_2 -Linien 220.01.06 und 220.01.12 und die Linie 220.02 und ihre homozygote T_2 -Linie 220.02.13 mit zwei Transgenkopien zeigten eine Expression des *BMV_{fl}*. Dagegen konnte in der dritten T_1 -Linie 221.01, in der eine Transgenkopie nachgewiesen wurde, keine Expression festgestellt werden. Wie nach Mendel erwartet, zeigte diese Linie mit einer durch Southern-Blot Analyse nachgewiesenen Transgenkopie eine 3:1 Aufspaltung in dem Segregationstest. Während eine Expression des *npfl* in allen homozygoten und heterozygoten Nachkommen nachgewiesen werden konnte, war die Expression des *BMV Amplicons* unterbunden oder zumindest unterhalb der Nachweisgrenze des durchgeführten TPIA. Es ist denkbar, dass die Expression des *BMV_{fl}* in Pflanzen der Linie 221.01 aufgrund von *RNA-silencing* Mechanismen der Pflanze unterdrückt war. Durch Erkennung von *BMV dsRNA*, die während der viralen Replikation synthetisiert wird, werden möglicherweise sequenzspezifisch Transkripte des *BMV_{fl}* abgebaut. Ein Nachweis durch TPIA ist dann nicht mehr möglich, die Bildung von *npfl*-Transkripten und die Translation in funktionsfähige Proteine bleibt aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie zu dem *BMV_{fl}* davon jedoch unberührt. Da in anderen transgenen Linien eine Expression des *BMV_{fl}* nachgewiesen werden konnte, kann die Unterdrückung der Expression möglicherweise auch vom Integrationsort und der Anzahl der inserierten Transgenkopien abhängig sein (Wolters & Visser, 2000). Auch wenn es unwahrscheinlich ist, kann grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass die durch Southern-Blot Analyse nachgewiesene Einzelkopie-Integration der T-DNA in der Linie 221.01 im Bereich der linken Border nicht vollständig war. Bei Fehlen eines Bereiches des *CaMV 35S Promotors* unterbleibt die Transkription des *BMV_{fl}*, während die Transkription des *npfl* im Bereich der rechten Bordersequenz aufgrund des eigenen Promotors möglich ist.

Die Ergebnisse der durchgeführten Segregation auf kanamycinhaltigem Medium und der Southern-Blot Analyse zeigten, dass die beiden Transgenkopien in den Linien 220.02 bzw. 220.02.13 an einem Loci vorliegen und mendelnd vererbt wurden. Obwohl eine der beiden Transgenkopien im Bereich der linken Bordersequenz nicht vollständig integriert wurde, ist mindestens eine Transgenkopie aktiv und führt zur nachweisbaren Expression des *BMV_{fl}*. Die Integration von mehr als einer T-DNA Kopie, bevorzugt an

einem Locus, wurde bereits mehrfach bei der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzen beschrieben (Meza *et al.*, 2002; Gelvin, 2003; Tzfira *et al.*, 2003; Kohli *et al.*, 2003). Hierbei stimuliert der Vorgang der T-DNA Integration die Ko-Integration einer weiteren in unmittelbarer Nähe. Zusätzlich zur multiplen werden auch unvollständige T-DNA Integrationen festgestellt, wobei der Bereich der rechten Bordersequenz präziser in das Pflanzengenom integriert wird als der Bereich der linken Bordersequenz (Hiei *et al.*, 1994; Tinland *et al.*, 1995; van der Graaf *et al.*, 1996; Mlynárová *et al.*, 2003).

Die T₁-Linie 220.01 und die T₂-Nachkommen 220.01.06 und 220.01.12 zeigten im Segregationstest eine abnormale Mendelsche Aufspaltung von 1:2, 1:3 bzw. 2:1. Bei Vorliegen aller vier Transgenkopien an einem Loci wäre in diesen Linien nach Mendel eine 3:1 Aufspaltung, bei einer Aufteilung auf zwei Loci eine 15:1 usw. erwartet worden. Solche Verstöße gegen die Mendelsche Regel können nach Jakowitsch *et al.* (1999) durch transkriptionelles *silencing* von multiplen homologen Transgensequenzen ausgelöst werden. Hierbei ist ein *silencing*-auslösender Transgenlocus in der Lage einen entfernt liegenden Locus, mit dem er Sequenzhomologie besitzt, transkriptionell zu inaktivieren und zu methylieren. Diese Paramutation-ähnlichen Vorgänge können unvollständig sein und zu einer teilweisen Inaktivierung von Transgensequenzen führen. So konnten Jakowitsch *et al.* (1999) in Kanamycin-Segregationstestungen ein abnormales Segregationsverhalten und eine unterschiedlich starke Ausprägung der Kanamycinresistenz an ihren transgenen Pflanzen feststellen. Tatsächlich konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine unterschiedlich starke Ausprägung der Kanamycinresistenz an Sämlingen der T₂-Linie 220.01.12 beobachtet werden. So zeigten einige Sämlinge dieser Linie auf dem Selektionsmedium einen Phänotyp, der zwischen deutlich grünen resistenten und chlorophyllfreien nicht-resistenten Sämlingen einzuordnen war. Da ein solcher Phänotyp aber weder bei der T₁-Linie 220.01 noch bei der zweiten selektierten T₂-Linie 220.01.06 beobachtet werden konnte ist es fraglich, ob die beobachteten abnormalen Segregationen ihre Ursache ausschließlich in transkriptionellem *silencing* homologer Transgensequenzen haben.

Nach Lu *et al.* (2004) werden abnormale Mendelsche Aufspaltungen auch beobachtet wenn eine Transgenkopie in ein pflanzliches Gen integriert wird, das an der Ausbildung von Gametophyten beteiligt ist. Solche T-DNA induzierten Mutationen wurden bereits in transgenen *Arabidopsis thaliana* (Castle *et al.*, 1993; Katavic *et al.*, 1994; Feldmann *et al.*, 1997; Howden *et al.*, 1998; Bonhomme *et al.*, 1998) und Tabakpflanzen (Budar *et al.*, 1986; Deineko *et al.*, 2000; Zagorskaya *et al.*, 2001) beschrieben. Diese Mutationen sind selten (Bonhomme *et al.*, 1998), aber mit steigender Anzahl von integrierten Transgenkopien erhöht sich theoretisch ihre Häufigkeit. Werden durch die

T-DNA Integration Gene gestört, die an der Ausbildung von männlichen oder weiblichen Gametophyten beteiligt sind, kann dies zu einer Einschränkung der Lebensfähigkeit und Funktion von Gametophyten führen. In deren Folge kann die Übertragung eines Teils der betroffenen männlichen oder weiblichen haploiden Gameten unterbunden sein (Bonhomme *et al.*, 1998). So werden bei einer rezessiven Weitergabe von T-DNA mit embryonalem Lethaleffekt keine homozygoten Mutanten gebildet, da diese nicht zur Embryogenese fähig sind. Diese Mutanten würden das T-DNA Merkmal (z.B. *nptII*) in einer 2:1 ($\text{Kn}^{\text{R}}:\text{Kn}^{\text{S}}$) statt in einer Mendelschen 3:1 (1:2:1) Aufspaltung ausprägen. Erfolgt die Integration der T-DNA in ein postmeiotisch exprimiertes Gen, das an der Entwicklung von männlichen Gameten beteiligt ist, wird aufgrund des Verlustes der homozygoten und der Hälfte der heterozygoten Klassen, eine Aufspaltung ($\text{Kn}^{\text{R}}:\text{Kn}^{\text{S}}$) von 1:1 erwartet. Ist das betroffene pflanzliche Gen teilweise auch an der Ausbildung von weiblichen Gametophyten beteiligt, sind Aufspaltungen von $< 1:1$ möglich (z.B. 1:3). Wenn die T-DNA Integration zu einem Lethaleffekt für beide Gameten führt, kann die Kanamycinresistenz als T-DNA Merkmal folglich nicht weitergegeben und damit auch nicht in den Nachkommen detektiert werden. Die festgestellten Aufspaltungen der T_1 -Linie 220.01 und ihrer Nachkommen lassen vermuten, dass hier ebenfalls, wie in den von Howden *et al.* (1998) und Feldmann *et al.* (1997) beschriebenen transgenen Pflanzen, zumindest eine der vier Transgenkopien einen lethalen Einfluss auf die Ausbildung der männlichen und teilweise auch weiblichen Gameten ausübt. Durch asymmetrische Rekombinationsereignisse während der Meiose kann in nachfolgenden Generationen eine große Variation in der Ausprägung des T-DNA Merkmals erwartet werden (Bonhomme *et al.*, 1998). Die in der Linie 220.01 und ihren T_2 -Nachkommen festgestellten abnormalen Aufspaltungen müssen jedoch durch gezielte Untersuchung der Gametophytenbildung und durch Rückkreuzungen charakterisiert werden um die Vermutung einer lethalen T-DNA Insertion zu untermauern.

Die Untersuchungen von transgenen Pflanzen der Linien 220.01 und 220.02.13 durch Western-Blot Analyse und ISEM haben gezeigt, dass die Expression des BMV_{fl} zur Bildung von Hüllprotein und isometrischen Viruspartikeln führt. Obwohl in den transgenen Pflanzen dieser Linien theoretisch jede Zelle die Möglichkeit besitzt den BMV_{fl} zu exprimieren und sich damit Hüllprotein zumindest intrazellulär ansammeln kann, konnten durch TPIA vornehmlich infizierte Zellbereiche im Phloem detektiert werden. In Querschnitten von Blattstielen und Stängeln konnten durch TPIA BMV_{fl} -infizierte Gewebe nachgewiesen werden, die ausschließlich dem Bereich der Leitbündel zugeordnet werden konnten. Diese Gewebe waren von denen in BMV_{fl} -blattlausinfizierten oder BMV_{fl} -agroinfiltrierten *N. benthamiana* nicht zu unterscheiden.

Dagegen wurde in transgenen Pflanzen der Linie 220.02.13 eine zweimal höhere, im Vergleich zu BMYV-blattlausinfizierten Pflanzen sogar fünfmal höhere, Anzahl von infizierten Mesophyllzellen als in BMYV_{fl}-agroinfizierten *N. benthamiana* beobachtet. In einem Großteil der untersuchten Mesophyllzellen war jedoch in allen untersuchten *Amplicon*-transgenen Pflanzen keine Infektion nachweisbar. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen an PLRV- und PLRV-GFP *Amplicon*-transgenen Tabakpflanzen (Franco-Lara *et al.*, 1999; Barker *et al.*, 2001; Taliansky *et al.*, 2004) in denen in einem Großteil des untersuchten Pflanzengewebes keine PLRV-Infektion bzw. GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Während Franco-Lara *et al.* (1999) in geringem Umfang auch infizierte Blattstiel- oder Stängelzellen außerhalb der Leitbündel nachwies, konnte in keinem der untersuchten TPIA eine BMYV-Infektion in diesem Bereich detektiert werden. Möglicherweise liegen solche infizierten Zellen auch in BMYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* vor, wurden aber aufgrund ihrer geringen Anzahl in den durchgeführten TPIA nicht detektiert. Im Gegensatz zu Barker *et al.* (2001), der in PLRV *Amplicon*-transgenen und über Blattläuse PLRV-infizierten *N. benthamiana* eine annähernd gleiche Anzahl an infizierten Mesophyllzellen nachgewiesen hat (jeweils 2% der Zellen), wurden in der vorliegenden Arbeit doppelt so viele BMYV-infizierte Mesophyllzellen in transgenen wie in BMYV_{fl}-agroinfizierten *N. benthamiana* nachgewiesen. Nach Barker *et al.* (2001) werden diese Zellen in transgenen wie in Blattlaus-infizierten Pflanzen über den gleichen Weg durch Zell-zu-Zell Ausbreitung über Verbindungen zu vaskulärem Gewebe infiziert. Fortgesetzt würde das bedeuten, dass infizierte Mesophyllzellen kein Resultat einer *Amplicon*-Expression in diesen Zellen selbst sind. Da von Barker *et al.* (2001) für die von Franco-Lara *et al.* (1999) untersuchten PLRV *Amplicon*-transgenen *N. tabacum* gezeigt wurde, dass die unproportionale Verteilung der PLRV-infizierten Mesophyllzellen zu einer Fehleinschätzung der Gesamtzahl führen kann, ist ein solcher Weg der Infektion in BMYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* nicht gänzlich auszuschließen. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass in primär BMYV_{fl}-agroinfizierten Zellen eine Virusreplikation und Akkumulation möglich ist, scheint es jedoch naheliegender, dass ein Großteil der BMYV-infizierten Mesophyllzellen in transgenen Pflanzen das Resultat einer Transgenexpression und anschließender Virusreplikation anzeigen. In diesen transgenen Zellen (1:678) findet oder fand eine primäre BMYV_{fl}-Expression statt, die aufgrund von RNA-*silencing* Mechanismen in einem Großteil des nicht vaskulären Gewebes unterbunden ist. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Taliansky *et al.* (2004), die in PLRV-GFP *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* in 1:100-1:1000 der Epidermis- und Mesophyllzellen eine GFP-Fluoreszenz nachweisen konnten. Da für die Herstellung der PLRV-GFP *Amplicon*-transgenen Pflanzen der von

Nurkiyanova *et al.* (2000) beschriebene GFP-markierte PLRV *full-length* Klon verwendet wurde, der keine systemische Expression des GFP zeigte, ist auszuschließen, dass in PLRV-GFP *Amplicon*-transgenen Pflanzen Epidermis- oder Mesophyllzellen durch Zell-zu-Zell Ausbreitung infiziert wurden. Die festgestellte GFP-Fluoreszenz ist damit ein Ergebnis einer *Amplicon*-Expression und der anschließenden viralen Replikation in primär infizierten transgenen Zellen. Da die Expression eines *Amplicons* die Bildung von dsRNA als Auslöser des *silencing* (PTGS und TGS) nach sich zieht, ist die Expression des BMYV *Amplicons* in einem Großteil der Mesophyllzellen auch gleichzeitig der Auslöser des eigenen transkriptionellen und/oder post-transkriptionellen *silencing*.

Die Untersuchung des Virustiters in den transgenen Pflanzen der Linien 220.01 und 220.02.13 zeigte große Unterschiede in den durch DAS-ELISA nachweisbaren BMYV-Titern zwischen einzelnen Pflanzen einer Linie. Von solchen Unterschieden im Virustiter wurde bereits von Franco-Lara *et al.* (1999) in ihren PLRV *Amplicon*-transgenen *N. tabacum*-Linien AW3 und AW14 berichtet. Die Unterschiede in der Expression des Transgens sind jedoch nicht spezifisch für *Amplicon*-transgene Pflanzen, sondern es werden generell Variationen in der Transgenexpression zwischen einzelnen transgenen Linien festgestellt (Butaye *et al.*, 2004). Insbesondere die Transgenexpression, die durch einen starken Promotor wie den CaMV 35S Promotor gesteuert wird, führt zu einer geringen Anzahl von Pflanzen in denen eine starke Expression stattfindet, ein Großteil der primären Transformanten zeigt jedoch eine reduzierte Transgenexpression (Elmayan & Vaucheret, 1996). Abgesehen von dem Einfluss regulatorischer Elemente können Unterschiede in der Transgenexpression auch durch einen chromosomalen Positionseffekt oder sequenzspezifische *silencing*-Mechanismen erklärt werden. Während ein chromosomaler Positionseffekt, bei dem endogene pflanzliche Sequenzbereiche mit Regulatorfunktion (Meyer, 2000) oder MARs (*Matrix attachment regions*, Allen *et al.*, 2000) auch unabhängig von der Anzahl der Transgenkopien die Transgenexpression beeinflussen können, nur bei Pflanzen aus verschiedenen Transformationsereignissen festgestellt werden kann, können Unterschiede in der Transgenexpression zwischen Nachkommen einer Linie durch sequenzspezifische *silencing*-Mechanismen erklärt werden (Butaye *et al.*, 2004). So wurden von Bastar *et al.* (2004) in ihren GFP-transgenen Pflanzen die Expression der GFP-Fluoreszenz innerhalb einer transgenen Pflanze in einem Mosaikmuster beschrieben. Das Mosaik entsteht dabei vermutlich aufgrund zellinterner *silencing*-Mechanismen: Zellen mit nachweisbarer GFP-Fluoreszenz besitzen dabei einen anderen *silencing*-Status als benachbarte Zellen ohne nachweisbare Fluoreszenz.

Die durch DAS-ELISA festgestellten Variationen im Virustiter zwischen Einzelpflanzen der BMYV *Amplicon*-transgenen Linien 220.01 und 220.02.13 lassen auf einen unterschiedlich stark ausgeprägten RNA-*silencing* Mechanismus schließen, der unter Umständen auch zwischen einzelnen Geweben innerhalb der untersuchten Pflanzen variieren kann. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einer Probennahme von unterschiedlichen Blattpositionen einer transgenen Testpflanze eine ähnliche Varianz detektiert werden kann, wie sie zwischen Einzelpflanzen einer Linie nachgewiesen wurde. Das die gemittelten Virustiter zwischen der Linie 220.01 und der Linie 220.01.13 nicht signifikant verschieden waren, gibt einen Hinweis darauf, dass möglicherweise in beiden Linien eine identische Anzahl von Transgenkopien aktiv ist und der *silencing*-Status in beiden Linien vergleichbar ist.

4.6 Ko-Infektion von BMYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2

In einem Großteil des BMYV_{fl}-transgenen Gewebes konnte durch TPIA kein Hüllprotein nachgewiesen werden. Ob der BMYV_{fl} als Transgen in diesen Zellen nicht exprimiert wird, d.h. ein transkriptioneller *silencing*-Mechanismus (TGS) vorliegt, oder ein Abbau der mRNA in einem post-transkriptionellen *silencing*-Mechanismus (PTGS) begründet liegt, ist nicht bekannt. Grundsätzlich schließen sich beide *silencing*-Mechanismen aber nicht aus und es gibt Hinweise, dass TGS und PTGS miteinander verbunden sind (Aufsatz *et al.*, 2002; Matzke *et al.*, 2004).

Da Poleroviren in ihren Wirtspflanzen nur auf das Phloemgewebe beschränkt sind, wird vermutet, dass eine Zell-zu-Zell Bewegung außerhalb des Phloems nicht möglich ist und/oder dass der polerovirale Suppressor P0 nicht in der Lage ist in diesen Geweben den pflanzlichen RNA-*silencing* Mechanismus zu unterdrücken. In den BMYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen besitzt theoretisch jede Zelle die Möglichkeit zur Expression des Transgens und damit zur Virusakkumulation; nicht infizierte Zellbereiche können daher nicht mit einer unzureichenden Möglichkeit zur Zell-zu-Zell Bewegung außerhalb des vaskulären Gewebes begründet werden. Durch Ko-Infektion von BMYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* wurde in dieser Arbeit untersucht, ob ein Einfluss des Ko-infizierten Virus auf den BMYV_{fl}-Virustiter und auf die Anzahl infizierter Mesophyllzellen im nicht-vaskulären Gewebe nachgewiesen werden kann. Für die Ko-Infektion wurden PVY und BYV ausgewählt von denen bekannt ist, dass sie einen Suppressor des RNA-*silencing* besitzen. Das HC-Pro des PVY und anderer Potyviren ist einer der am umfangreichsten untersuchten und charakterisierten viralen Suppressoren. Dieses multifunktionale Protein ist neben seiner Funktion als Suppressor an der Blattlausübertragung, der viralen Replikation, der Zell-zu-Zell Bewegung und der Polyproteinprozessierung von Potyviren beteiligt (Moissiard &

Voinnet, 2004). Die molekulare Basis der Suppression durch HC-Pro liegt vermutlich in einer Protein-Protein Interaktion begründet, wobei HC-Pro in Zusammenspiel mit dem pflanzlichen Protein rgsCaM die Inaktivierung des RNA-induzierten *silencing* Komplexes (RISC) bewirkt (Anandalakshmi *et al.*, 2000; Silhavy & Burgyán, 2004). Die molekulare Basis der Suppressorfunktion des BYV-P21 ist nicht bekannt. Das P21 wirkt als Replikationsverstärker und aufgrund von Computeranalysen wird vermutet, dass P21 eine neue Proteinfamilie darstellt, die mit anderen bekannten viralen Suppressoren nicht verwandt ist (Reed *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde für die Ko-Infektion der BMV_{fl}-transgenen *N. benthamiana* das Umbravirus PEMV-2 verwendet, von dem bisher kein Suppressor bekannt ist (Ryabov *et al.*, 2001b; Taliansky *et al.*, 2003a). Das PEMV-2 wurde in seiner natürlichen Symbiose mit dem phloemlimitierten Enamovirus (Familie *Luteoviridae*) PEMV-1 Ko-infiziert.

Die Ko-Infektion von BMV_{fl}-transgenen Pflanzen der Linie 220.02.13 und 220.01 mit PVY führte im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollpflanzen nicht zu einem veränderten Symptombild. Nach einer Ko-Infektion mit PVY konnte ein bis zu zehnmal höherer BMV-Titer in der Blattlamina, die von Blattadern erster und zweiter Ordnung befreit war, festgestellt werden. Die synergistische Wirkung von PVY auf den BMV-Virustiter in transgenen Pflanzen nahm dabei mit der Zeit zu, obwohl der BMV-Virustiter in transgenen Pflanzen insgesamt im Infektionsverlauf leicht abnahm. Die durch TPIA nachgewiesene Anzahl von BMV-infizierten Mesophyllzellen zwei Wochen nach der Ko-Infektion, spiegelte dabei nicht deutlich die durch DAS-ELISA festgestellte Erhöhung des Virusgehaltes in der Blattlamina wieder. Da die Probennahme für den TPIA unabhängig von den DAS-ELISA Ergebnissen vorgenommen und nicht alle PVY Ko-infizierten Pflanzen analysiert wurden, war die durchschnittliche Anzahl von infizierten Mesophyllzellen möglicherweise höher als durch die durchgeführten TPIA angezeigt worden waren. Aufgrund der geringen Anzahl infizierter Mesophyllzellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass alleinig eine verstärkte BMV-Akkumulation in Blattadern der dritten und vierten Ordnung zu einer Erhöhung des Virustiter in der Blattlamina geführt hat. Es wurde auch eine Erhöhung des BMV-Titers in den Blattstielen nachgewiesen. Der synergistische Effekt in diesem Gewebe war jedoch weitaus geringer und der Virustiter nur zu einem frühen Infektionszeitpunkt in Blattstielproben aus dem oberen Stängelbereich signifikant erhöht. Dies zeigt an, dass der synergistische Effekt des PVY zu Beginn der Ko-Infektion in jungen Blättern im Phloemgewebe möglicherweise sehr effektiv ist und erst im Verlauf der weiteren Infektion eine Ausweitung des Effektes auf das Mesophyllgewebe stattfindet.

Nach einer PVY Ko-Infektion von PLRV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* konnten Barker *et al.* (2001) zeigen, dass der PLRV-Virustiter in systemisch infizierten Pflanzen fünfmal höher war als in nicht Ko-infizierten Kontrollpflanzen. Zusätzlich konnten viermal mehr infizierte Mesophyllzellen nachgewiesen werden. Der BMV/PVY Synergismus scheint daher insgesamt weniger stark ausgeprägt als ein PLRV/PVY Synergismus. Diese Unterschiede können möglicherweise auch durch die Verwendung unterschiedlicher PVY-Stämme (hier PVY^{NTN} und PVY^O bei Barker *et al.*), aufgrund der Heterogenität im Virustiter innerhalb der BMV_{fl}-transgenen Pflanzen, bedingt durch ein unterschiedlich stark ausgeprägtes RNA *silencing* zwischen und innerhalb von Einzelpflanzen, erklärt werden. Obwohl nach Gonzáles-Jara *et al.* (2004) in den meisten viralen Synergismen mit der Beteiligung von Potyviren die Akkumulation des Potyvirus nicht und nur der Virustiter des zweiten Virus erhöht ist, kann ein Einfluss des PVY-Titers in verschiedenen Pflanzengeweben von BMV_{fl} *Amplicon*-transgenen Pflanzen zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten den BMV-Virustiter beeinflusst haben. In jungen symptomzeigenden Blättern PVY Ko-infizierter transgener Pflanzen konnte PVY in einem Großteil der Mesophyllzellen nachgewiesen werden. Dies muss aber nicht unbedingt die Intensität der Infektion in den älteren Geweben der Pflanze widerspiegeln. Zusätzlich können nach Taliaknsy *et al.* (2004) auch abiotische Stressfaktoren einen Einfluss auf die Effizienz des RNA *silencing* haben. Die molekulare Basis des BMV/PVY Synergismus ist in dieser Arbeit nicht analysiert worden, es soll jedoch angemerkt werden, dass das potyvirale HC-Pro als viraler Suppressor zumindest teilweise für einen Polerovirus/PVY Synergismus verantwortlich ist. Von Savenkov & Valkonen (2001) wurde gezeigt, dass in HC-Pro transgenen Pflanzen der PLRV-Titer im Phloem erhöht ist. Durch eine Kreuzung von P1/HC-Pro transgenen und PLRV *Amplicon*-transgenen Pflanzen konnten Barker *et al.* (2001) zeigen, dass in doppelt transgenen Tabakpflanzen die Anzahl von PLRV-infizierten Mesophyllzellen erhöht war. Daher kann auch für den BMV/PVY Synergismus angenommen werden, dass seine molekulare Basis zumindest teilweise auf einer HC-Pro vermittelten Suppression des RNA-*silencing* beruht. Diese Suppression ist jedoch nur in einer geringen Anzahl von Mesophyllzellen effektiv; in einem Großteil der Mesophyllzellen kann weiterhin keine BMV-Akkumulation detektiert werden. In BMV-freien Zellen wirkt daher ein sehr effektiver *silencing*-Mechanismus den HC-Pro oder andere potyvirale Proteine ebensowenig unterdrücken können wie der BMV eigene Suppressor P0. Es ist denkbar, dass in diesen Zellen ein transkriptionales *silencing* vorliegt, das von viralen Suppressoren nicht effektiv unterdrückt werden kann. Von Marathe *et al.* (2000) und Mette *et al.* (2001) wurde gezeigt, dass ein potyviraies P1/HC-Pro in der Lage ist, ein bereits etabliertes PTGS zu unterdrücken, nicht aber die

Etablierung eines TGS zu unterbinden oder ein bestehendes TGS zu unterdrücken. Aufgrund der Doppelintegration des BMV_{fi} als Transgen an vermutlich einem Loci liegt es nahe, dass durch TGS eine CaMV 35S Promotor-Methylierung in einem Großteil der Pflanzenzellen der Linie 220.02.13 eine Expression des BMV_{fi} unterbindet. In Zellen, in denen kein TGS aber PTGS vorliegt, führt die Expression von potyviralen Proteinen zu einem synergistischen Effekt.

Die Ko-Infektion von Pflanzen der Linie 220.02.13 mit dem Closterovirus BYV führte auch zu einem synergistischen Effekt in Bezug auf den BMV-Titer, jedoch nur in der Blattlamina von Blattproben aus dem mittleren Stängelbereich. Im Gegensatz zu PVY Ko-infizierten Pflanzen war der Virustiter in der Blattlamina nicht nur leicht erhöht, sondern sogar durchschnittlich höher als er in Blattstielen gemessen werden konnte. Dies spiegelte sich auch in einer hohen Anzahl von infizierten Mesophyllzellen (1:165) wider. Ebenso wie bei der Ko-Infektion mit PVY festgestellt wurde, war auch hier in der größten Anzahl von Mesophyllzellen keine BMV-Infektion nachweisbar. Eine Infektion von BMV *Amplicon*-transgenen und nicht-transgenen *N. benthamiana* mit BYV führte in kurzer Zeit zum Absterben der Pflanzen. Die Ausbildung von starken Symptomen konnte nur an den jüngsten Blättern in Form von Adernekrosen und starken Blattvergilbungen beobachtet werden. Die starke Akkumulation von Virusproteinen im Phloem führt nach Dolja (2003) zu einer Blockierung der Siebröhren, was zu einem Absterben der Triebspitze und schließlich der ganzen Pflanze führt. In BYV Ko-infizierten transgenen Pflanzen konnte in allen Proben aus dem oberen Stängelbereich nur ein geringer BMV-Titer nachgewiesen werden. Da die Probennahme zur Untersuchung des BMV-Titers zu einem Zeitpunkt erfolgte, in dem die jüngsten Blätter bereits starke Symptome einer BYV-Infektion aufwiesen, kann ein Zusammenhang zwischen einer Akkumulation von BYV-Proteinen und dem kaum nachweisbaren BMV-Titer im oberen Stängelbereich nicht ausgeschlossen werden. Die durch Akkumulation von BYV-Proteinen ausgelöste Einschränkung des Assimilattransportes in den Siebröhren, führt wahrscheinlich zu einer Reduktion des Zellstoffwechsels im betroffenen Pflanzengewebe. Eine Herabsetzung des Zellstoffwechsels beeinflusst unter Umständen sowohl die BMV-Replikation als auch die Expression des BMV_{fi} als Transgen negativ. Grundsätzlich konnte aber, ähnlich wie bei den PVY Ko-infizierten Pflanzen, ein synergistischer Effekt auf den BMV-Virustiter festgestellt werden. Der stark erhöhte BMV-Virustiter in der Blattlamina und die hohe Anzahl an infizierten Mesophyllzellen lassen vermuten, dass die Ursache eine Suppression von pflanzlichen *silencing*-Mechanismen ist. Das einzige Protein, das bei Closteroviren bisher als effektiver Suppressor identifiziert werden konnte, ist das P21 (Reed *et al.*, 2003). Im BMV/BYV Synergismus zeigen das P21 oder andere BYV-

Proteine einen stärkeren Effekt auf die Suppression des *silencing*-Mechanismus als durch potyvirale Suppressoren oder andere PVY-Proteine festgestellt werden konnte. Da wie in PVY Ko-infizierten Pflanzen jedoch trotzdem in einem Großteil der Mesophyllzellen keine Expression des BMYV_{fl} festgestellt werden konnte, beruht die synergistische Wirkung der BYV Ko-Infektion auf einer Suppression des PTGS und nicht einer Aufhebung des möglicherweise vorliegenden TGS. Über die molekulare Wirkungsweise des P21 liegen bisher keine Untersuchungen vor (Moissiard & Voinnet, 2004). Die in dieser Arbeit festgestellte hohe Suppressoraktivität lässt jedoch, wie von Reed *et al.* (2003) bereits postuliert, die Vermutung auf eine bisher unbekannte Suppressor/PTGS Interaktionsmöglichkeit zu.

Die Ko-Infektion von Pflanzen der Linie 220.02.13 mit PEMV-1/-2 führte zu einem Anstieg des BMYV-Titers in der Blattlamina. Die verstärkte Akkumulation von BMYV in diesem Gewebe war auch fünf Wochen nach der Ko-Infektion nachweisbar. In der Symbiose des Enamovirus PEMV-1 mit dem Umbravirus PEMV-2 kodiert nur das zu der Familie *Luteoviridae* gehörende PEMV-1 den für die Poleroviren BWYV, PLRV und CABYV beschriebenen Suppressor P0 (Pfeffer *et al.*, 2002). Falls der PEMV-1 P0 eine Suppressorfunktion besitzt ist anzunehmen, dass er, ähnlich wie bei den bisher untersuchten Poleroviren, aufgrund seiner geringen Konzentration in der Pflanze nicht in der Lage ist, ein etabliertes PTGS außerhalb des Phloems effektiv zu unterdrücken. Dies wird insbesondere dadurch bestätigt, dass die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen BMYV/PEMV-1/-2 synergistischen Effekte in Übereinstimmung mit PLRV/PEMV-2 synergistischen Effekten (Mayo *et al.*, 2000; Ryabov *et al.*, 2001a), also ohne Ko-Infektion des PEMV-1, sind. Wie in PLRV/PEMV-2 Mischinfektionen festgestellt, zeigten auch die PEMV-1/-2 Ko-infizierten BMYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* typische nekrotische Blattsymptome, und die Anzahl von infizierten Mesophyllzellen war stark erhöht. Da bisher kein Suppressor des PEMV-2 bekannt ist (Taliensky & Robinson, 2003), umgeht das Virus vermutlich auf andere Weise den pflanzlichen RNA-*silencing* Mechanismus. Wie zuvor durch Mayo *et al.* (2000) für BMYV/PEMV-2 und PLRV/PEMV-2 Mischinfektionen gezeigt, konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, dass PEMV-2 eine mechanische Übertragung des BMYV ermöglicht. Bisher konnten mechanische Übertragungen von Poleroviren nur in Mischinfektionen mit den Umbraviren PEMV-2 oder *Groundnut rosette virus* (GRV) nachgewiesen werden. Nach Ryabov *et al.* (2001a) wird eine mechanische Übertragung des PLRV nur von Umbraviren vermittelt, nicht aber durch das Potyvirus PVY, das Potexvirus PVX, das Tobamovirus TMV oder das Cucumovirus CMV. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur mechanischen Übertragung des BMYV unterstützen die Ergebnisse von Ryabov *et al.* (2001a) und Mayo *et al.* (2000) und

zeigen zusätzlich, dass auch das Closterovirus BYV keine mechanische BMYV-Übertragung unterstützt. Nach Mayo *et al.* (2000) und Ryabov *et al.* (1998, 2001a) kann das durch den ORF4 kodierte umbravirale Movementprotein das Fehlen einer Möglichkeit zur Ausbreitung von Poleroviren in nicht vaskulärem Gewebe komplementieren. Auch wenn mit den üblichen Testverfahren zur Detektierung einer Suppressorfunktion von viralen Proteinen bisher kein umbravirales Protein mit einer solchen Funktion nachgewiesen wurde ist anzunehmen, dass neben der Vermittlung einer Movementfunktion auch das effektive Umgehen von RNA-*silencing* Mechanismen für eine mechanische Übertragung benötigt werden (Mayo *et al.*, 2000; Ryabov *et al.* 2001b). Die durch PVY und BYV bereitgestellte Suppressorfunktion ist allein für eine mechanische Übertragung des BMYV nicht ausreichend. Dagegen erlaubt die durch PEMV-2 vermittelte Movementfunktion die Ausbreitung des BMYV durch Zell-zu-Zell Bewegung von primär mechanisch infizierten Zellen über Phloemgeleitzellen in die Siebröhren und an anderer Stelle eine Bewegung von den Siebröhren in die Phloemgeleitzellen und weiter bis zu systemischen Neuinfektionen von nicht-vaskulärem Gewebe (Ryabov *et al.*, 2001a).

Die erhöhte Anzahl infizierter Mesophyllzellen in PEMV-1/2 Ko-infizierten BMYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen ist durch den gleichen Mechanismus erklärbar, der die mechanische Übertragung des BMYV und anderer Poleroviren ermöglicht: (i) durch eine PEMV-2 vermittelte Möglichkeit zur Zell-zu-Zell Ausbreitung von BMYV in Geweben außerhalb des Phloems und (ii) eines noch unbekanntem umbraviralen Mechanismus der in der Lage ist, das pflanzliche Abwehrsystem zu umgehen.

In PEMV-1/-2 Ko-infizierten BMYV *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* wurden nekrotische Blattläsionen beobachtet, die an *Amplicon*-transgenen Pflanzen oder PEMV-1/-2 infizierten *N. benthamiana* allein nicht vorhanden waren. Die Untersuchung dieser Bereiche durch TPIA zeigte, dass um die nekrotischen Bereiche eine besonders hohe Akkumulation von BMYV und PEMV-1/-2 nachzuweisen war. Solche typischen Nekrosen wurden an PLRV/PEMV-2 mischinfizierten *N. benthamiana* (Mayo *et al.*, 2000; Ryabov *et al.*, 2001a) und auch an PEMV-2 Ko-infizierten PLRV-GFP *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* (Taliensky *et al.*, 2004) beobachtet. Die durch TPIA nachgewiesene verstärkte Virusakkumulation in diesen Geweben bestätigt die Beobachtung von Taliensky *et al.* (2004) in seinen PEMV-2 Ko-infizierten PLRV-GFP *Amplicon* Pflanzen, dass um das nekrotische Gewebe in einer besonders großen Anzahl von Zellen eine GFP-Fluoreszenz detektiert werden konnte. Die beobachteten Nekrosen entstehen danach nur durch eine verstärkte Replikation des Polerovirus in diesem Bereich, da nach Taliensky *et al.* (2004) das PLRV-GFP *Amplicon* nicht den Virustiter des Ko-infizierten Virus beeinflusst.

Die Ko-Infektion von BMYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen hat mit allen verwendeten Viren zu einer vermehrten Infektion von nicht-vaskulärem Gewebe geführt. Die hierbei festgestellten Unterschiede im Effekt der Ko-infizierten Viren beruhen vermutlich auf einer unterschiedlich effizienten Suppression des PTGS oder anderer pflanzlicher Abwehrmechanismen durch PVY bzw. BYV und auf einem Zusammenwirken einer bisher unbekanntem umbraviralen Suppressorfunktion und der PEMV-2 vermittelten Movementfunktion. Aufgrund der durchgeführten Versuche zur mechanischen Übertragung des BMYV kann für PVY und BYV davon ausgegangen werden, dass beide Viren, im Gegensatz zu PEMV-2, keine BMYV-Movementfunktion in nicht-vaskulärem Gewebe komplementieren können. Auch wenn durch alle Ko-infizierten Viren eine verstärkte BMYV-Akkumulation in der Blattlamina induziert wurde, war keines der Viren in der Lage, eine großflächige nachweisbare BMYV-Akkumulation in Mesophyllgewebe von *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* zu bewirken. Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass in einem Großteil der nicht infizierten BMYV-Zellbereiche ein transkriptionelles *silencing* vorlag, welches von den bisher untersuchten viralen Suppressoren nicht unterdrückt werden kann. Wenn nur in einer geringen Anzahl von Mesophyllzellen ein PTGS, aber kein TGS vorliegt, kann auch nur in diesen Zellen eine Suppression erfolgen.

Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere pflanzliche Mechanismen als *RNA-silencing* zu einer Restriktion des BMYV in *Amplicon*-transgenen *N. benthamiana* geführt haben. Durch Taliansky *et al.* (2004) konnte gezeigt werden, dass sowohl biotische als auch abiotische Faktoren zu einer Beeinflussung des PTGS in PLRV-GFP *Amplicon*-transgenen Pflanzen führen können. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Feststellung, dass es neben der Suppression des PTGS durch Pflanzenviren auch eine Umgehung (*escape*) des Mechanismus durch andere Faktoren gibt, die zu ähnlichen Effekten wie ein viraler Suppressor führen. So wurde gezeigt, dass eine Behandlung der PLRV-GFP *Amplicon*-transgenen Pflanzen mit dem Wachstumsregulator Etephon, dem Bakterium *Xanthomonas campestris* oder eine Hitzebehandlung zu einer verstärkten GFP-Expression führte. Der beobachtete Effekt war dabei in allen Fällen mit der Ausbildung nekrotischer Läsionen verbunden. Der mögliche Einfluss von biotischen und abiotischen Faktoren auf die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse kann jedoch vernachlässigt werden, da sie vermutlich alle Versuchspflanzen in gleichem Umfang betroffen hätten.

4.7 Infektionstestungen mit BChV-IPP *full-length* Klonen

Von den zehn aus der Populationsklonierung selektierten BChV_{fl} konnte kein Klon als infektiös eingestuft werden. Die Sequenzbestimmung des BChV_{fl} L400, der separat und nicht als Population in den binären Vektor überführt wurde, ergab eine hohe

Übereinstimmung zu den von Hauser *et al.* (2002) charakterisierten englischen und amerikanischen BChV-Isolaten. Die Nukleotidsequenzen für die an der Replikation beteiligten Proteine P1 und P2, des Suppressors P0, der Hüllproteine und des putativen Movementproteins P4 liegen im BChV_{fl} vor und werden von Leserahmen mit gleicher Größe wie bei den Isolaten BChV-CR und BChV-2a kodiert. Die Sequenzanalyse zeigte keine zusätzlichen Stopkodons innerhalb der kodierenden Bereiche und die an der Replikation von Poleroviren bekannten Motive, wie ein RdRp-Motiv, ein subgenomischer Promotor, das Proteasemotiv, die Prozessierungsstelle des VPg, eine *shifty sequence* und Pseudoknotstruktur wurden nachgewiesen. Da der BChV_{fl} in gleicher Weise wie der als infektiös getestete BMV_{fl} zwischen einen verdoppelten CaMV 35S Promotor und eine Ribozymsequenz kloniert wurde, war eine Infektiosität erwartet worden.

Sowohl die serologischen Untersuchungen als auch der Nachweis einer erfolgreichen BChV_{fl}-Agroinfektion durch RT-PCR mit BChV-spezifischen Oligonukleotiden waren jedoch nicht erfolgreich. Alle selektierten BChV_{fl} und AsclBChV_{fl} mussten daher als nicht infektiös eingestuft werden.

Das Ausbleiben von BChV-IPP Agroinfektionen ist dabei nicht mit der durchgeführten Methode der Agroinfektion oder der Wirtspflanzenauswahl zu erklären. Da das Isolat BChV-IPP für die Herstellung der *full-length* Klone aus einer infizierten *B. vulgaris* extrahiert wurde, hätten bei erfolgreichen Agroinfektionen, zumindest im agroinfiltrierten Inokulationsbereich von *B. vulgaris*, infizierte Zellen mit dem Antiserum MAFF24 nachgewiesen werden müssen. Wenn eine BChV-Replikation im inokulierten Gewebe unterhalb der serologischen Nachweisgrenze stattgefunden hätte, wäre zumindest bei einem Teil der Versuchspflanzen der Nachweis einer systemischen Infektion nach RNA-Extraktion und RT-PCR acht Wochen nach der Inokulation erwartet worden.

Die Probleme bei der Etablierung einer BChV_{fl}-Agroinfektion liegen daher vermutlich in einer vom natürlichen Vorbild abweichenden Nukleotidsequenz innerhalb des BChV_{fl} begründet. Obwohl eine hohe Übereinstimmung von 94% bzw. 93% der kodierenden Nukleotidsequenz des BChV-IPP und den Isolaten BChV-2a und BChV-CR vorliegt, führen auch geringe Abweichungen zu möglicherweise unterschiedlichen RNA-Strukturen oder Aminosäureabfolgen der kodierten Proteine. Für zahlreiche Pflanzenviren wurde gezeigt, dass nur ein einziger Aminosäureaustausch die virale Replikation verhindern kann oder reduziert, die Pathogenität beeinflusst oder eine systemische Infektion unterbindet (Sit *et al.*, 2001; Saenz *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2001; Moury *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Auch für die Poleroviren PLRV (Jaag *et al.*, 2003) und BWYV (Brault *et al.*, 2000) wurde gezeigt, dass singuläre

Aminosäuresubstitutionen zu einer Veränderung der viralen Replikation oder Akkumulation führen. Insbesondere Viren mit überlagernden Leserahmen, wie es bei Poleroviren der Fall ist, besitzen nur ein kleines Fenster, welches Möglichkeiten für Punktmutationen zulässt, da der Großteil der Mutationen zu einer Herabsetzung der Fitness oder nicht replikationsfähigen Virusmutanten führt (Guyader & Ducray, 2002). Bei der Herstellung des BChV_{fl} könnten möglicherweise während der reversen Transkription zur Erstellung der cDNA oder in nachfolgenden Amplifikationsschritten eine oder mehrere Nukleotidsubstitutionen zu veränderten RNA-Strukturen oder Aminosäureabfolgen geführt haben. Für die M-MLV Reverse Transkriptase, die für die Herstellung der BChV-IPP cDNA-Fragmente verwendet wurde, wurde eine Fehlerrate von 1×10^{-3} (1 Fehlinsertion pro 1000 Basen) beschrieben (Ricchetti & Buc, 1990). Obwohl durch Verwendung des gleichen Enzyms ein infektiöser BMV_{fl} selektiert werden konnte, könnten Nukleotidsubstitutionen während der reversen Transkription der Grund für das Ausbleiben der Infektiosität des BChV_{fl} sein. Solche Substitutionen können Sequenzbereiche außerhalb der bekannten und in dieser Arbeit nachgewiesenen an der Replikation beteiligten Motive betreffen. Zu solchen Motiven, die für eine Replikation unbedingt vorhanden sein müssen, gehören die internen ribosomalen Erkennungssequenzen (IRES, *internal ribosomal entry sites*). Solche IRES wurden bereits für zahlreiche Viren beschrieben (Martínez-Salas *et al.*, 2001). Eine IRES bewirkt, im Gegensatz zur ribosomalen Scanstrategie, die direkte interne Anlagerung der Ribosomen an eine mRNA in einem sequenzspezifischen Kontext. Nach Jaag *et al.* (2003) bilden IRES sekundäre und tertiäre RNA-Strukturen, die mit dem Translationskomplex interagieren und besitzen in unmittelbarer Nähe ein Startkodon. Von Jaag *et al.* (2003) wurde innerhalb des PLRV ORF1 eine solche IRES beschrieben, die für die Translation des 5 kDa replikations-assoziierten Proteins 1 (*Rap1*) verantwortlich ist. Die Translation des *Rap1* ist eine Voraussetzung für die PLRV-Replikation. Es konnte gezeigt werden, dass Nukleotidaustausche innerhalb der PLRV-spezifischen IRES die Replikation verhindern. Bisher gibt es keine Berichte von *Rap1* anderer Poleroviren, es ist aber wahrscheinlich, dass solche oder auch andere noch nicht identifizierte polerovirale Proteine eine Replikation des BMV und BChV beeinflussen. Aufgrund fehlender Vergleichsdaten ist ausgehend von den vorliegenden Nukleotidsequenzen allerdings keine Aussage für BMV und BChV möglich gewesen. Da die Sequenzanalyse des BChV_{fl} keine Hinweise auf das Fehlen bekannter poleroviraler Motive gegeben hat ist daher nicht auszuschließen, dass eine Mutation in einem bisher nicht analysierten BChV-Motiv die Replikation unterbindet. Die für die Herstellung der BChV_{fl} extrahierte BChV-IPP RNA stammte aus einer einzigen *B. vulgaris* Pflanze, die mit BMV-IPP mischinfiziert war. Vor diesem

Hintergrund konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das BMVYV-Isolat in der Mischinfektion eine synergistische Wirkung besitzt. Um zu überprüfen, ob eine Komplementation von nicht funktionsfähigen BChV_{fl}-Proteinen durch den BMVYV_{fl} erreicht werden kann, wurden Agromischinokulationen durchgeführt. Da in allen zehn agromischinokulierten *N. benthamiana* eine BMVYV-, aber keine BChV-Infektion acht Wochen nach der Inokulation nachgewiesen wurde, besitzt der BMVYV_{fl} keine Möglichkeit zur Komplementation des nicht-infektiösen BChV_{fl}. Die Möglichkeiten einer komplementären Wirkung, die zu einer systemisch nachweisbaren Ausbreitung des BChV_{fl} führen sollte, sind vermutlich nur auf wenige Phloemgeleitzellen als Orte der Virusreplikation mit direkter Verbindung zu den Siebröhren beschränkt. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine solche Zelle durch Agroinfektion sowohl durch den BMVYV_{fl} als auch durch den BChV_{fl} erreicht wird, ist möglicherweise gering. Zusätzlich wäre zu erwarten, dass eine replikationsdefekte Virus-RNA selbst bei einer Komplementation der Replikations- oder Verpackungsfunktion durch ein anderes Virus nur in äußerst geringen Mengen in der Pflanze vorliegt und seine Konzentration möglicherweise unter der Nachweisgrenze durch RT-PCR liegt.

4.8 Infektionstestungen mit BMVYV-BChV Viruschimären

Für eine Determination von BMVYV- und BChV-Genombereiche, die an der Wirtspflanzenspezifität beteiligt sind, wurden Viruschimären hergestellt. Zusätzlich sollte der Austausch ganzer Genombereiche zwischen dem BChV_{fl} und BMVYV_{fl} Hinweise geben, in welchem Bereich eine mögliche Mutation die Infektiosität des BChV_{fl} verhindert.

Weder die Integration des BMVYV_{fl} 3'-Genombereiches in den BChV_{fl} (BCBM_{Chi}) noch die Integration des BChV_{fl} 3'-Genombereiches in den infektiösen BMVYV_{fl} (BMBC_{Chi}) führte zu der Selektion einer replikationsfähigen Viruschimäre.

Die Infektionstestungen der Viruschimären und der BChV_{fl} beruhen auf der Annahme, dass die durchgeführte Methode der Agroinfektion eine Infektion von Pflanzen in ähnlichem Umfang ermöglicht, wie es für den BMVYV_{fl} festgestellt werden konnte. Nach den vorliegenden negativen Ergebnissen der Infektionstestungen mit Beteiligung von Genombereichen aus dem BChV_{fl}, muss davon ausgegangen werden, dass sowohl im 5'-Genombereich als auch im 3'-Genombereich des BChV_{fl} Mutationen vorliegen können, die zumindest die Bildung einer nachweisbaren Menge an Hüllprotein verhindern. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, können Mutationen, die unter Umständen die an der Replikation beteiligten Elemente und Motive zerstören, eine Replikation der Viruschimären unterbunden haben. Da der infektiöse BMVYV_{fl} alle für die virale Replikation erforderlichen Proteine und Motive besitzen muss, wurde davon ausgegangen, dass insbesondere die Integration des 3'-Genombereiches des

BChV_{fi}, der bei Poleroviren nicht für die Replikation benötigt wird (Reutenauer *et al.*, 1993), zu einer replikationsfähigen Viruschimäre führen würde. Die Nutzung einer BMVYV_{fi} internen Eco47 III Restriktionsschnittstelle, 76 nt entfernt vom stromaufwärts gelegenen BMVYV_{fi} ORF3 Startkodon, führte dabei zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz des BChV_{fi} P3, jedoch zu drei Substitutionen innerhalb der N-terminalen 13 Aminosäuren des BChV_{fi} P4. Diese Substitutionen innerhalb des BChV_{fi} Movementproteins können jedoch vernachlässigt werden, da ein Einfluss des P4 auf eine lokale Akkumulation in primär BMBC_{Chi}-agroinfigierten Zellen unwahrscheinlich ist. Wahrscheinlicher ist, dass der ausgebliebene Nachweis einer erfolgreichen BMBC_{Chi}-Agroinfektion seine Ursache in einer stark verminderten viralen Replikationsrate hat. Der Austausch des ORF3/4-Genomabschnittes in einem infektiösen CABYV *full-length* Klon mit entsprechenden Sequenzbereichen aus dem Polerovirus PLRV, führte zu einer Reduktion der viralen Replikation um 50% (Prüfer *et al.*, 1995). In den gleichen Untersuchungen führte die Substitution des gesamten CABYV-ORF5 (RTD) mit einem entsprechenden Bereich des Polerovirus BWYV zu einer viermal geringeren Menge an nachweisbarer viraler RNA. Wurden dagegen CABYV/BWYV Viruschimären hergestellt in denen die komplette 3'-terminale nicht kodierende Region des CABYV durch die entsprechende Sequenz des BWYV ersetzt wurde, konnte keine Virusreplikation in Protoplasten entdeckt werden. Nach Prüfer *et al.* (1995) liegen in dem 3'-terminalen nicht kodierenden Bereich von Luteoviren Erkennungssequenzen, die für eine Replikation notwendig sind: Die CABYV RdRp ist dabei nicht in der Lage die BWYV 3'-terminalen Sequenzen zu erkennen.

Aus der Familie der Luteoviren wird für das BYDV, das weder ein VPg noch eine 5'-terminale *cap*-Struktur besitzt, eine *cap*-unabhängige Initiierung der Translation beschrieben (Wang *et al.*, 1997). Für die Translationsinitiierung am 5'-terminalen Startkodon der viralen RNA wird ein fast 4700 nt entfernt gelegener 100 nt langer Sequenzbereich innerhalb des nicht-kodierenden Bereiches zwischen ORF5 und ORF6 benötigt. Zusätzlich zeigt der gesamte 800 nt lange 3'-terminale Sequenzbereich (3'-UTR) des BYDV als *cis*-agierendes Element eine Funktion als Translationsregulator und wird für die Virusreplikation unbedingt benötigt (Guo *et al.*, 2000; Koev *et al.*, 2002). Ähnliche Elemente werden für das noch keinem Genus in der Familie *Luteoviridae* zugeordnete BLRV vermutet (Domier *et al.*, 2002). Auch wenn nach Mayo & Miller (1999) solche *cis*-agierenden Elemente im 3'-terminalen Sequenzbereich von Poleroviren nicht vorliegen und von Juszczuk *et al.* (2000) für PLRV gezeigt wurde, dass die 3'-UTR zumindest *in vitro* nicht mit der *leader sequence* der sgRNA interagiert, ist ein Einfluss der poleroviralen 3'-UTR nach den Ergebnissen von Prüfer *et al.* (1995) auf die virale Replikation wahrscheinlich. In gleicher Weise wie eine

Inkompatibilität der regulierenden Sequenz in der CABYV/BWYV Viruschimäre vorliegt, kann dies für die BMBC_{Chi} angenommen werden. Neben einer Reduktion der RNA-Akkumulation und damit von nachweisbarem Hüllprotein in den Viruschimären, kann auch eine Inkompatibilität der BChV_{fl} 3'-UTR mit der BMYV RdRp eine nachweisbare Akkumulation der Viruschimäre verhindert haben. Es ist anzumerken, dass die 3'-terminalen Nukleotide des BChV_{fl} aufgrund des ausgewählten Oligonukleotides genau der Sequenz des von Hauser *et al.* (2002) beschriebenen BChV-2a entsprechen. Bisher wurde von keinem BChV-Isolat durch 3'-RACE eine Determination der terminalen Nukleotidsequenz durchgeführt und alle 18 terminalen Nukleotide der bereits beschriebenen BChV-Isolate basieren auf einer Oligonukleotidsequenz, die von Hauser *et al.* (2002) von dem Polerovirusisolat BMYV-2ITB abgeleitet wurde. Da im Gegensatz zu BMYV- und BWYV-Isolaten stromaufwärts dieses 18 nt langen Sequenzbereiches nur eine geringe Sequenzübereinstimmung zwischen BChV- und BMYV-Isolaten festgestellt werden kann (siehe Anhang), ist es möglich, dass der BMYV und BChV 3'-terminale Sequenzbereich nicht vollständig identisch ist. Die exakte 3'-terminale Sequenz des BChV könnte durch die verwendeten Oligonukleotide verändert worden sein. Dadurch könnten innerhalb der 18 terminalen Nukleotide Austausche vorliegen oder das verwendete Oligonukleotid hybridisiert nicht am direkten 3'-Ende der BChV-RNA, sondern erst stromaufwärts in einem bei Poleroviren konservierten Sequenzbereich. Wie an anderer Stelle beschrieben, kann eine ungenügende Erkennungsreaktion zwischen viraler RdRp und dem 3'-terminalen Sequenzbereich sowohl den Replikationsdefekt der Viruschimäre BMBC_{Chi} als auch das Ausbleiben einer erfolgreichen Agroinfektion bei den selektierten BChV_{fl} erklären.

4.9 Abschlussbetrachtung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten erfolgreich die Nukleotidsequenzen der beiden deutschen Polerovirusisolate BMYV-IPP und BChV-IPP bestimmt werden. Das BMYV-IPP ist das zweite bisher vollständig sequenzierte BMYV-Isolat. Die Integration beider Isolate in ein polerovirales phylogenetisches System bestätigte wie erwartet, die nahe Verwandtschaft von *B. vulgaris* infizierenden Poleroviren in ihrem 3'-Gencluster und eine geringe Übereinstimmung im 5'-Genombereich. Die beiden BMYV-Isolate BMYV-IPP und BMYV-2ITB zeigten in ihrem 5'-Genombereich eine erhöhte Übereinstimmung

mit CABYV, was die Vermutung von Guilley *et al.* (1995) bestätigt, dass beide Viren in diesem Genombereich einen gemeinsamen Ursprung besitzen.

Auf Grundlage der ermittelten Nukleotidsequenzen des BMVYV-IPP und BChV-IPP konnten von beiden Isolaten cDNA *full-length* Klone hergestellt werden. Nach Optimierung der Methode der Agroinfektion wurden infektiöse BMVYV_{fi} selektiert. Mit der durchgeführten Inokulation der BMVYV_{fi}-rekombinanten Agrobakterien konnten an *N. benthamiana* Infektionsraten von 100% erreicht werden. Durch BMVYV_{fi}-Agroinfektion von verschiedenen Testpflanzen konnte gezeigt werden, dass ein durch die Methode der Agroinfektion ermitteltes BMVYV-Wirtspflanzenspektrum identisch mit den in der Literatur beschriebenen Wirtspflanzenspektren nach Übertragung durch Aphiden ist. Die Methode der Agroinfektion ermöglichte durch TPIA von agroinokuliertem Mesophyllgewebe die Unterscheidung zwischen lokal oder systemisch infizierten Wirtspflanzen. Dass die Methode der Agroinfektion nicht zu einer Erweiterung des bekannten BMVYV-Wirtspflanzenspektrums geführt hat, muss in weiteren Untersuchungen mit anderen Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen bestätigt werden und hat unter Umständen einen Einfluss auf die bisherige Einstufung der durchgeführten Arbeiten in die Sicherheitsstufe 2.

Das Ausbleiben von erfolgreichen BChV_{fi}-Agroinfektionen konnte nicht abschließend geklärt werden. Da zur Herstellung und Testung der Infektiosität die gleichen Methoden angewandt wurden, die zur Selektion eines infektiösen BMVYV_{fi} geführt haben, ist jedoch naheliegend, dass eine zum BChV-IPP abweichende Nukleotidsequenz des BChV_{fi} die Infektiosität verhindert. Insbesondere das bisher noch nicht durch 3'-RACE bestimmte terminale Ende der BChV-RNA besitzt im BChV_{fi} möglicherweise eine veränderte Nukleotidsequenz. Da dieser Sequenzbereich unter Umständen ein virusspezifisches Erkennungsmotiv für die virale RdRp enthält, erklärt auch das Ausbleiben von erfolgreichen Agroinfektionen mit den BMVYV/BChV-Viruschimären BMBC_{Chi} und BCBM_{Chi}. Die Bestimmung des 3'-terminalen Sequenzbereiches des BChV ist daher eine unbedingte Voraussetzung für die Herstellung eines neuen *full-length* Klons. Ob die 3'-terminale Sequenz des BChV_{fi} tatsächlich seine Infektiosität verhindert, kann zusätzlich durch Herstellung einer Viruschimäre unter Beibehaltung der BMVYV-RdRp und der BMVYV 3'-terminalen Sequenz aus dem BMVYV_{fi} überprüft werden. Nach einem Austausch von kodierenden Sequenzbereichen im BMVYV_{fi} 3'-Gencluster mit entsprechenden Sequenzbereichen aus dem BChV_{fi}, würde dann eine Infektiosität erwartet werden.

Die Markierung des BMVYV_{fi} mit dem *Green fluorescent protein* (GFP) war erfolgreich. Die GFP-Integration unter Verwendung des funktionellen P2A-Sequenzbereichs des FMDV an den C-terminalen Bereich der BMVYV-RdRp bzw. N-terminalen Bereich des

BMVYV-P0 führte allerdings zu einer Reduktion der viralen Replikation. Dies wurde deutlich, da nach Agroinfection mit GFP-markierten BMVYV_{fl} in weitaus weniger Zellen im Inokulationsbereich Hüllprotein nachweisbar war, als in BMVYV_{fl}-agroinfiziertem Mesophyllgewebe beobachtet wurde. Zusätzlich konnte eine GFP-Fluoreszenz nur in wenigen Zellen im agroinokulierten Bereich detektiert werden. Da die GFP-Konzentration aufgrund des Integrationsortes direkt an die Konzentration der von genomischer RNA translatierten Proteine P0 oder P1/2 abhängig war, bestätigt die geringe Anzahl von GFP-markierten Zellen die Untersuchungen von Fomitcheva *et al.* (2004) und Pfeffer *et al.* (2002), dass beide Proteine in infizierten Pflanzen nur in geringer Konzentration vorliegen. Da keine systemische Ausbreitung von GFP-markierten BMVYV_{fl} festgestellt werden konnte, ist zu vermuten, dass durch eine Verlängerung des viralen Genoms um über 700 nt keine effiziente Aufnahme der Virus-RNA in das isometrische Partikel möglich ist. Die Integration der P2A-GFP Sequenz 3'-terminal an den von subgenomischer RNA translatierten ORF3 und Deletion eines nicht für die Ausbreitung und Replikation benötigten Sequenzbereiches des ORF5 (RTD) von ~700 nt würde unter Umständen zur Selektion eines GFP-markierten BMVYV_{fl} mit Möglichkeit zur systemischen Ausbreitung führen.

Nach Transformation von *N. benthamiana* mit dem infektiösen BMVYV_{fl} konnten erfolgreich BMVYV *Amplicon*-transgene Linien selektiert werden. Die *Amplicon*-transgenen Pflanzen zeigten normales Wachstum und waren von BMVYV_{fl}-agroinfizierten *N. benthamiana* nicht zu unterscheiden. Obwohl in diesen Pflanzen theoretisch jede Zelle die Möglichkeit besitzt den BMVYV_{fl} als Transgen zu exprimieren, konnte nur in einer geringen Anzahl an Mesophyllzellen eine BMVYV-Infektion nachgewiesen werden. Die Ko-Infektion der *Amplicon*-transgenen-Pflanzen mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2 führte zu einer Erhöhung des Virustiters in der Blattlamina und zu einer vermehrten Infektion von Mesophyllzellen. Im Großteil des Gewebes konnte aber weiterhin keine BMVYV-Infektion nachgewiesen werden. Der Mechanismus, der eine effiziente Akkumulation des BMVYV in einem Großteil des untersuchten Gewebes verhindert, wurde in dieser Arbeit nicht im Detail analysiert. Die Erhöhung des Virustiters in der Blattlamina von Ko-infizierten BMVYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen zeigte, dass eine synergistische Wirkung der Ko-infizierten Viren vorlag. Da zumindest für PVY und BYV nachgewiesen wurde, dass sie Suppressoren des RNA-Silencing besitzen, liegt es nahe, dass der BMVYV-Virustiter zumindest teilweise aufgrund einer Suppression des pflanzlichen Abwehrmechanismus wie PTGS erhöht war. Da PVY und BYV das Mesophyllgewebe von *N. benthamiana* großflächig infizieren können und damit eine Suppression des PTGS in einem Großteil der Zellen stattfinden müsste, konnte im überwiegenden Anteil von Mesophyllzellen kein BMVYV nachgewiesen

werden. In diesen BMYV-freien Zellen ist daher die Suppressorfunktion des Koinfizierten Virus nicht effektiv. Da virale Suppressoren kein TGS sondern nur PTGS unterdrücken bzw. aufheben können, ist zu vermuten, dass in BMYV-freien Zellen ein TGS etabliert ist. Grundsätzlich würde das bedeuten, dass in BMYV *Amplicon*-transgenen Pflanzen sowohl PTGS als auch TGS vorliegt. Für eine genaue Analyse des *Silencing*-Mechanismus müssten mit BMYV *Amplicon*-transgene Pflanzen eine Methylierungsanalyse des CaMV 35S-Promotors und ein Nachweis von *Amplicon*-spezifischen siRNAs durchgeführt werden.

5 Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden auf nationalen und internationalen Tagungen in Form von Posterpräsentationen und Vorträgen veröffentlicht. Weitere Publikationen in internationalen Zeitschriften sind in Vorbereitung. Die Veröffentlichungen sind nachstehend in chronologischer Reihenfolge aufgeführt.

Götz, R., Stephan, D., Commandeur, U. & Maiss, E. (1999). Untersuchungen zum möglichen Auftreten von Rekombinationsereignissen bei Infektionen von Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) mit Luteoviren mit Hilfe von agroinfizierten und agrotransformierten PLRV-VLK. *Phytomedizin, Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft*, 3, 80-81.

Stephan, D., Götz, R., Commandeur, U. & Maiss, E. (2001). Infection of *Nicotiana benthamiana* with Poleroviruses by agrotransformed and agroinfected PLRV full-length clone. *Phytomedizin, Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft*, 2, 36.

Stephan, D. & Maiss E. (2002). Untersuchungen zur Infektiosität eines *Beet mild yellowing virus* Volle-Längen-Klons. *Phytomedizin, Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft*, 2, 32.

Stephan, D. & Maiss, E. (2003). Klonierung und biologische Charakterisierung eines Volle-Längen-Klons des *Beet mild yellowing virus*. *Phytomedizin, Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft*, 2, 23-24.

Maiss, E., Dietrich, C. & Stephan, D. (2003). Plant virus *full-length* clones – discovery of virus functions in single and mixed infections. EMBO Workshop, Genomic Approaches in Plant Virology, 28.-31. Mai in Keszthely, Hungary.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Durch ELISA und RT-PCR festgestellte Verbreitung von Vergilbungsviren.....	5
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Genomorganisation von BMV.....	8
Abbildung 1.3: Virussymptome ausgelöst durch BMV und BChV.....	12
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Genomorganisation des BYV.....	14
Abbildung 1.5: Genomorganisation des Enamovirus PEMV-1.....	24
Abbildung 1.6: Genomorganisation von Umbraviren.....	26
Abbildung 1.7: Genomorganisation von PVY.....	29
Abbildung 2.1: Klassifizierung der Blattadern in <i>N. benthamiana</i>	52
Abbildung 2.2: Methoden der Agroinfektion.....	93
Abbildung 3.1: Virusnachweis durch RT-PCR mit BMV-, BChV- und BYV-spezifischen Oligonukleotiden nach Virusübertragung durch <i>Myzus persicae</i>	97
Abbildung 3.2: Vergilbungssymptome von BMV/BYV infizierten <i>B. vulgaris</i>	97
Abbildung 3.3: TPIA-Aufnahmen einer BMV/BChV-mischinfizierten <i>B. vulgaris</i> , BMV-infizierten <i>N. benthamiana</i> und nicht-infizierten <i>C. capitatum</i>	98
Abbildung 3.4: Genetische Karte der BMV-IPP RNA mit Angabe der ORF.....	99
Abbildung 3.5: Darstellung der Fremdnukleotide, die zu einer 5'- und 3'-terminalen Verlängerung der BMVfl-RNA führen.....	101
Abbildung 3.6: Klonierungsstrategie zur Herstellung des BMV _{fl}	102
Abbildung 3.7: Genetische Karte der BChV _{fl} -RNA mit Angabe der ORF.....	103
Abbildung 3.8: Klonierungsstrategie zur Herstellung des BChV _{fl}	105
Abbildung 3.9: Alignment von P1 Aminosäuresequenzen verschiedener Polioviren.....	108
Abbildung 3.10: Putative Pseudoknot-Strukturen verschiedener Polioviren	110
Abbildung 3.11: Vergleich der 5'-terminalen Nukleotidsequenzen der genomischen RNA mit einem internen Ausschnitt am 3'-Ende des ORF2.....	111
Abbildung 3.12: Darstellung des BMV _{fl} mit Ausschnitt der Region zwischen dem CaMV 35S-Promotor 3'-Terminus und dem Beginn der viralen Sequenz.....	115
Abbildung 3.13: TPIA (MAb5G4) Aufnahmen von AsclΔBMV _{fl} agroinokuliertem Mesophyllgewebe.....	116
Abbildung 3.14: TPIA (MAb5G4) Aufnahmen von BMV _{fl} -agroinfizierten <i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i> , <i>B. vulgaris</i> und <i>L. purpureum</i>	120
Abbildung 3.15: Vergilbungssymptome der Interkostalflächen an BMV _{fl} -agroinfizierten <i>N. benthamiana</i>	121

Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der GFP-Insertionen zur Herstellung der 5'P0-BMYV _{flGFP}	124
Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der P2A-GFP Integration im 3'REP-BMYV _{flGFP}	125
Abbildung 3.18: Ausschnitt aus dem das P2A umfassenden Sequenzbereich des 3'REP-BMYV _{flGFP} und 5'P0-BMYV _{flGFP}	126
Abbildung 3.19: 5'P0-BMYV _{flGFP} und 3'REP-BMYV _{flGFP} infizierte <i>N. benthamiana</i> Epidermiszellen nach Agroinfektion.....	128
Abbildung 3.20: Systemischer Virusnachweis durch RT-PCR mit BMYV- und GFP-spezifischen Oligonukleotiden.....	129
Abbildung 3.21: Western-Blot Analyse (Mab5G4) von BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i>	132
Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der T-DNA zwischen deren linker und rechter Bordersequenz der BMYV _{fl} lokalisiert ist.....	135
Abbildung 3.23: Southern-Blot Analyse der Linien 220.01, 220.02.13, 221.01 und einer nicht-transgenen <i>N. benthamiana</i>	136
Abbildung 3.24: Modelle von möglichen Anordnungen der T-DNA Kopien in den BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen Linien.....	138
Abbildung 3.25: DAS-ELISA Absorptionsmesswerte aus Blattstielen von einzelnen BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen Pflanzen der Linien 220.01 und 220.02.13.....	139
Abbildung 3.26: TPIA (Mab5G4) Aufnahmen von Blattstielen und Mesophyllgewebe von <i>Myzus persicae</i> BMYV-infizierten, BMYV _{fl} -agroinfizierten, BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen und nicht infizierten <i>N. benthamiana</i> Pflanzen.....	140
Abbildung 3.27: DAS-ELISA Absorptionswerte aus Blattstielpflanzen von Ko-infizierten BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen Pflanzen der Linie 220.01 mit PVY oder BYV und Vergleichswerte von nicht-transgenen <i>N. benthamiana</i>	142
Abbildung 3.28: Elektronenoptische Aufnahmen von BMYV-Partikeln.....	143
Abbildung 3.29: Blattnekrosen an PEMV-1/-2 Ko-infizierten und nicht Ko-infizierten BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i>	144
Abbildung 3.30: DAS-ELISA Absorptionswerte von BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen Einzelpflanzen der Linie 220.02.13 zwei bzw. drei Wochen nach der Ko-Infektion....	145
Abbildung 3.31: DAS-ELISA Absorptionswerte von identischen Einzelpflanzen wie in Abbildung 3.30 vier bzw. fünf Wochen nach der Ko-Infektion.....	147
Abbildung 3.32: TPIA-Aufnahmen von PVY, BYV oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> Mesophyllzellen.....	150
Abbildung 3.33: Serologischer Nachweis von PVY, BYV, PEMV-1/-2 und BMYV in Mesophyllgeweben mit virusspezifischen Antisera.....	151

Abbildung 3.34: Phylogenetischer Baum nach multiplen <i>Alignment</i> von poleroviralen Gesamtnukleotidsequenzen.....	158
Abbildung 3.35: Grafische Darstellung der Aminosäuresequenz-Übereinstimmung der Proteine P0-P5 verschiedener Poleroviren.....	159
Abbildung 3.36: Paarweises FLAG <i>Alignment</i> der Nukleinsäuresequenzen des BMYV-IPP und BChV-IPP.....	160
Abbildung 3.37: Schematische Darstellung der BCBM _{Chi} und BMBC _{Chi} mit Angabe der offenen Leserahmen.....	162
Abbildung 3.38: Klonierungsstrategie zur Herstellung der BCBM _{Chi}	163
Abbildung 3.39: Klonierungsstrategie zur Herstellung der BMBC _{Chi}	164
Abbildung 4.1: Hypothetische Modelle, die einen -1 Leserasterwechsel an der BChV bzw. putativen BMYV <i>slippery sequence</i> beschreiben.....	171
Abbildung 9.1: Die komplette Nukleotidsequenz des BMYV-IPP.....	250
Abbildung 9.2: Die komplette Nukleotidsequenz des BChV-IPP.....	254
Abbildung 9.3: <i>Alignment</i> der 3'-terminalen Nukleotidsequenzen als DNA von Poleroviren.....	257
Abbildung 9.4: Schematische Darstellung des Vektors V174.....	274
Abbildung 9.5: Schematische Darstellung des Vektors pKali.....	275
Abbildung 9.6: Schematische Darstellung des Vektors pBIN_SN.....	276
Abbildung 9.7: Schematische Darstellung des Vektors p996.....	277
Abbildung 9.8: Schematische Darstellung des Vektors p442.....	278
Abbildung 9.9: Schematische Darstellung des Vektors L140.....	279
Abbildung 9.10: Schematische Darstellung der Herstellung der Ribozymsequenz nach Shintaku <i>et al.</i> (1996) und Klonierung des V162.....	280
Abbildung 9.11: Herstellung der funktionellen P2A-Sequenz.....	281
Abbildung 9.12: Klonierungsstrategie zur Herstellung der 5'P0-BMYV _{flGFP}	282
Abbildung 9.13: Deletion von sechs 5'-Fremdnukleotiden im BMYV _{fl}	283
Abbildung 9.14: Klonierungsstrategie zur Herstellung des AscI Δ BChV _{fl}	284
Abbildung 9.15: Herstellung der DIG- <i>nptII</i> und DIG-35S Sonden.....	285
Abbildung 9.16: Übersicht über Größenstandards.....	286

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Feste Chemikalien	33
Tabelle 2.2: Flüssige Chemikalien.....	35
Tabelle 2.3: Übersicht über verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme.	35
Tabelle 2.4: Übersicht über verwendete <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme.....	35
Tabelle 2.5: Übersicht über verwendete Virus-Isolate.....	36
Tabelle 2.6: Übersicht über verwendete Pflanzenarten mit Herkunftsangabe.	36
Tabelle 2.7: Übersicht über verwendete Plasmide und Nukleinsäuren	37
Tabelle 2.8: Oligonukleotide für die Herstellung und Nachweis des BMVYV _{fl}	38
Tabelle 2.9: Oligonukleotide zur Herstellung des AsclΔBMVYV _{fl}	38
Tabelle 2.10: Oligonukleotide für die Sequenzierung des BMVYV _{fl}	39
Tabelle 2.11: Oligonukleotide zur GFP-Markierung des BMVYV _{fl}	39
Tabelle 2.12: Oligonukleotide für die Herstellung und den Nachweis des BChV _{fl}	40
Tabelle 2.13: Oligonukleotide zur Herstellung des Ascl-BChV _{fl}	41
Tabelle 2.14: Oligonukleotide zum Nachweis einer BYV-Infektion.....	41
Tabelle 2.15: Oligonukleotide für die Sequenzierung des BChV _{fl}	41
Tabelle 2.16: Oligonukleotide für die Herstellung von DIG-markierten PCR Sonden ..	42
Tabelle 2.17: Übersicht über verwendete Restriktionsendonukleasen.....	42
Tabelle 2.18: Übersicht über weitere nukleinsäure- oder proteinmodifizierende Enzyme mit Konzentrations- und Herstellerangaben.....	43
Tabelle 2.19: Übersicht über verwendete Medienbestandteile und -zusätze.....	44
Tabelle 2.20: Übersicht über eingesetzte Antiseren mit Herstellerangabe.....	48
Tabelle 2.21: Übersicht über verwendete Geräte.....	48
Tabelle 2.22: Übersicht über weitere Materialien für Versuchsdurchführungen.....	49
Tabelle 2.23: Übersicht über eingesetzte Software.....	49
Tabelle 3.1: Durch RT-PCR und TPIA festgestellte Virusinfektionen nach Blattlaus- übertragung von einer BMVYV-, BChV- und BYV-mischinfizierten <i>B. vulgaris</i>	96
Tabelle 3.2: Vergleich der Genom- und Leserahmengröße des BMVYV-IPP und des BChV-IPP mit denen verschiedener BMVYV- und BChV-Isolate.....	107
Tabelle 3.3: BMVYV _{fl} Agroinfektionsversuche mit Methode A oder B.....	112
Tabelle 3.4: BMVYV _{fl} Agroinfektionsraten in <i>N. benthamiana</i> bei Verwendung von rekombinanten ATHV- oder LBA4404-Zellen als Wirtsbakterien.....	113
Tabelle 3.5: Übersicht über durchgeführte Agroinokulationen von <i>N. benthamiana</i> mit AsclΔBMVYV _{fl} und BMVYV _{fl}	116

Tabelle 3.6: Durch TPIA nachgewiesene systemische BMYV-Infektionen nach Blattlausübertragung (<i>Myzus persicae</i>) von BMYV _{fl} -agroinfizierten <i>N. benthamiana</i>	117
Tabelle 3.7: Wirtspflanzendiagnose des BMYV _{fl} durch TPIA.....	119
Tabelle 3.8: Vergleich der durch serologischen Nachweis festgestellten BMYV-IPP und BMYV _{fl} -Wirtspflanzenspektren.....	122
Tabelle 3.9: Agroinokulationen mit 5'P0-BMYV _{fl} GFP und 3'REP-BMYV _{fl} GFP.....	127
Tabelle 3.10: DAS-ELISA Absorptionsmesswerte aus Blattstielproben der BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen T ₀ -Mutterpflanzen.....	130
Tabelle 3.11: Segregationsanalyse der BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> T ₁ -Linien auf kanamycinhaltigem Medium.....	133
Tabelle 3.12: Segregationsanalyse der T ₂ -Linien 220.02.13, 220.01.06 und 220.01.12 auf kanamycinhaltigem Medium.....	134
Tabelle 3.13: Durch BMYV-DAS-EILSA ermittelte Absorptionsmesswerte in BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> und PVY, BYV und PEMV-1/-2 Ko-infizierten transgenen Pflanzen.zwei bzw. drei Wochen nach der Ko-Infektion....	146
Tabelle 3.14: Durch BMYV-DAS-EILSA ermittelte Absorptionsmesswerte in BMYV <i>Amplicon</i> -transgenen <i>N. benthamiana</i> und PVY und PEMV-1/-2 Ko-infizierten transgenen Pflanzen vier bzw. fünf Wochen nach der Ko-Infektion.....	148
Tabelle 3.15: Durch TPIA nachgewiesene systemische BMYV-Infektionen nach mechanischer Inokulation von <i>N. benthamiana</i>	152
Tabelle 3.16: Übersicht über durchgeführte BChV _{fl} -Agroinfektionen an <i>N. benthamiana</i> , <i>B. vulgaris</i> und <i>C. capitatum</i>	154
Tabelle 3.17: Infektionstestungen der AscIBChV _{fl}	156
Tabelle 3.18: Übersicht über durchgeführte BChV _{fl} /BMYV _{fl} und AscIBChV _{fl} /BMYV _{fl} Agroinfektionen an <i>N. benthamiana</i>	157
Tabelle 3.19: Übersicht von Infektionstestungen und TPIA-Ergebnissen der BCBM _{Chi} und des BMYV _{fl} nach Agroinfektion verschiedener Testpflanzen.....	165
Tabelle 3.20: Agroinfektionstestungen der BMBC _{Chi} und des BMYV _{fl}	166
Tabelle 9.1: Relative Molekulargewichte (M _r) der durch BMYV-IPP kodierten putativen Proteine mit dem Programm PEPTIDEMASS.....	253
Tabelle 9.2: Relative Molekulargewichte (M _r) der durch BChV-IPP kodierten putativen Proteine mit dem Programm PEPTIDEMASS.....	258
Tabelle 9.3: Vergleich der putativen Aminosäuresequenzen der P1-P5 des BMYV-IPP mit entsprechenden Sequenzbereichen anderer Poleroviren.....	258
Tabelle 9.4: Vergleich der putativen Aminosäuresequenzen der P1-P5 des BChV-IPP mit entsprechenden Sequenzbereichen anderer Poleroviren.....	259

Tabelle 9.5: Übersicht über die in den Sequenzvergleichen verwendeten Virussequenzen mit Angabe der GENBANK <i>Accession</i> Nummer.....	259
Tabelle 9.6: Festgestelltes BMVYV-Wirtspflanzenspektrum nach Agroinfektion im Vergleich zu Wirtspflanzenspektra, von denen in verschiedenen Versuchen nach BMVYV-Blattlausübertragungen berichtet wurde.....	260
Tabelle 9.7: Absorptionsmesswerte nach DAS-ELISA von Blattstielproben mit Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen.....	261
Tabelle 9.8: DAS-ELISA Absorptionswerte aus Blattstielproben der Linie 220.01 nach Ko-Inokulation mit PVY oder BYV.....	262
Tabelle 9.9: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.8 dargestellten Absorptionswerte nach paarweisem Vergleich durch den U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney.....	263
Tabelle 9.10: DAS-ELISA Absorptionswerte aus dem oberen Stängelbereich in Pflanzen der Linie 220.02.13 zwei bzw. drei Wochen nach der Ko-Inokulation.....	264
Tabelle 9.11: DAS-ELISA Absorptionswerte aus dem oberen Stängelbereich in Pflanzen der Linie 220.02.13 vier bzw. fünf Wochen nach der Ko-Inokulation.....	265
Tabelle 9.12: DAS-ELISA Absorptionswerte aus dem mittleren Stängelbereich in Pflanzen der Linie 220.02.13 zwei bzw. drei Wochen nach der Ko-Inokulation.....	266
Tabelle 9.13: DAS-ELISA Absorptionswerte aus dem mittleren Stängelbereich in Pflanzen der Linie 220.02.13 vier bzw. fünf Wochen nach der Ko-Inokulation.....	267
Tabelle 9.14: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 und Tabelle 9.12 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der nicht Ko-infizierten Pflanzen.....	268
Tabelle 9.15: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.11 und Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der nicht Ko-infizierten Pflanzen.....	268
Tabelle 9.16: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 und Tabelle 9.12 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der PVY Ko-infizierten Pflanzen.....	269
Tabelle 9.17: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.11 und Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der PVY Ko-infizierten Pflanzen.....	269
Tabelle 9.18: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 und Tabelle 9.12 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen.....	270
Tabelle 9.19: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.11 und Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen.....	270
Tabelle 9.20: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 und Tabelle 9.12 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der BYV Ko-infizierten Pflanzen.....	271
Tabelle 9.21: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 bis Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte der PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen im Vergleich zu PVY Ko-infizierten Pflanzen.....	271

Tabelle 9.22: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 bis Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte der PVY, BYV oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 im Vergleich zur nicht Ko-infizierten Kontrolle.....	272
Tabelle 9.23: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 bis Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte der PVY oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen im Vergleich zu BYV Ko-infizierten Pflanzen.....	273

8 Literaturverzeichnis

Adam, G., Sander, E. & Shepherd, R.J. (1979). Structural differences between pea enation mosaic virus strains affecting transmissibility by *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Virology*, 92, 1-14.

Agranovsky, A.A., Boyko, V.P., Karasev, A.V., Koonin, E.V. & Dolja, V.V. (1991). Putative 65 kDa protein of Beet yellows closterovirus is a homologue of HSP70 heat shock proteins. *J.Mol.Biol.*, 217, 603-610.

Agranovsky, A.A., Koonin, E.V., Boyko, V.P., Maiss, E., Frotschl, R., Lunina, N.A. & Atabekov, J.G. (1994). Beet yellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. *Virology*, 198, 311-324.

Ahlquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, 296, 1270-1273.

Ahlquist, P. & Janda, M. (1984). cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol.Cell Biol.*, 4, 2876-2882.

Ahlquist, P., French, R., Janda, M. & Loesch-Fries, L. (1984). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 81, 7066-7070.

Ahlquist, P., French, R. & Bujarski, J.J. (1987). Molecular studies of brome mosaic virus using infectious transcripts from cloned cDNA. *Adv.Virus Res.*, 32, 215-242.

Ahlquist, P., Noueiry, A.O., Lee, W.M., Kushner, D.B. & Dye, B.T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J.Virol.*, 77, 8181-8186.

Alam, S.L., Atkins, J.F. & Gesteland, R.F. (1999). Programmed ribosomal frameshifting: much ado about knotting! *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 14177-14179.

Allen, G.C., Spiker, S. & Thompson, W.F. (2000). Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol.Biol.*, 43, 361-376.

Alt-Moerbe, J., Neddermann, P., von Lintig, J., Weiler, E.W. & Schröder, J. (1988). Temperature-sensitive step in Ti plasmid *vir*-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacteria*. *Mol.Gen.Genet.*, 213, 1-8.

- Alt-Moerbe, J., Kühlmann, H. & Schröder, J. (1989). Differences in induction of Ti plasmid virulence genes *virG* and *virD*, and continued control of *virD* expression by four external factors. *Mol.Plant-Microbe Interact.*, 2, 301-308.
- Alzhanova, D.V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V. & Dolja, V.V. (2000). Genetic analysis of the cell-to-cell movement of Beet yellows closterovirus. *Virology*, 268, 192-200.
- Alzhanova, D.V., Napuli, A.J., Creamer, R. & Dolja, V.V. (2001). Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO J.*, 20, 6997-7007.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. & Vance, V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 13079-13084.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M., Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V.B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 290, 142-144.
- Angell, S.M. & Baulcombe, D.C. (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating Potato virus X RNA. *EMBO J.*, 16, 3675-3684.
- Arbatova, J., Lehto, K., Pehu, E. & Pehu, T. (1998). Localization of the P1 protein of Potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *J.Gen.Virol.*, 79, 2319-2323.
- Arnedo-Andres, S., Gil-Ortega, R., Luis-Arteaga, M. & Hormaza, I. (2002). Development of RAPD and SCAR markers linked to the Pvr4 locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor.Appl.Genet.*, 105, 1067-1074.
- Ashoub, A., Rohde, W. & Prüfer, D. (1998). In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acids Res.*, 26, 420-426.
- Atabekov, J.G. & Taliansky, M.E. (1990). Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv.Virus Res.*, 38, 201-248.
- Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Wilk, J., Matzke, A.J. & Matzke, M. (2002). RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 16499-16506.

- Baranov, P.V., Gurvich, O.L., Fayet, O., Prere, M.F., Miller, W.A., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. & Giddings, M.C. (2001). RECODE: a database of frameshifting, bypassing and codon redefinition utilized for gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 29, 264-267.
- Barker, H. (1987). Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by Potato leafroll Luteovirus is enhanced in plants also infected with Potato Y Potyvirus. *J.Gen.Virol.*, 68, 1223-1227.
- Barker, H. (1989). Specificity of the effect of sap-transmissible viruses in increasing the accumulation of luteoviruses in co-infected plants. *Ann.Appl.Biol.*, 115, 71-78.
- Barker, H. & Harrison, B.D. (1982). Infection of potato mesophyll protoplasts with five plant viruses. *Plant Cell Rep.*, 1, 247-249.
- Barker, H. & Harrison, B.D. (1985). Restricted multiplication of Potato leafroll virus in resistant potato genotypes. *Ann.Appl.Biol.*, 107, 205-212.
- Barker, H. & Harrison, B.D. (1986). Restricted distribution of Potato leafroll virus antigen in resistant potato genotypes and its effect on transmission of the virus by aphids. *Ann.Appl.Biol.*, 109, 595-604.
- Barker, H., McGeachy, K.D., Ryabov, E.V., Commandeur, U., Mayo, M.A. & Taliansky, M. (2001). Evidence for RNA-mediated defence effects on the accumulation of Potato leafroll virus. *J.Gen.Virol.*, 82, 3099-3106.
- Barry, J.K. & Miller, W.A. (2002). A -1 ribosomal frameshift element that requires base pairing across four kilobases suggests a mechanism of regulating ribosome and replicase traffic on a viral RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 11133-11138.
- Bastar, M.T., Luthar, Z., Skof, S. & Bohanec, B. (2004). Quantitative determination of mosaic GFP gene expression in tobacco. *Plant Cell Rep.*, 22, 939-944.
- Baulcombe, D. (2002). RNA silencing. *Curr.Biol.*, 12, R82-R84.
- Beczner, L., Horváth, H., Romhányi, I. & Foerster, H. (1984). Studies on the etiology of tuber ringspot disease in potato. *Potato Res.*, 27, 339-351.
- Berger, P.H., Hunt, A.G., Domier, L.L., Hellmann, G.M., Stram, Y., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P. (1989). Expression in transgenic plants of a viral gene product that mediates insect transmission of potyviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86, 8402-8406.

- Bevan, M. (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.
- Björling, K. (1976). Virus yellowing; incidence, epidemiology and agronomic control. In: *Proc. 39th IIRB Winter Congr.*, Brussels, 1-11.
- Bjoerling, K. & Nilsson, B. (1966). Observations on host range and vector relations of Beet mild yellowing virus. *Socker Handlingar II*, 21, 1-14.
- Björling, K. & Möllerström, G. (1974). Incidence and importance of beet yellowing viruses in Sweden 1946 to 1973. *Socker Handlingar*, 26, 1-14.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. & Pirone, T.P. (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J.Gen.Virol.*, 79, 3119-3122.
- Blanco-Urgoiti, B., Sanchez, F., Perez de San, R.C., Dopazo, J. & Ponz, F. (1998). Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *J.Gen.Virol.*, 79, 2037-2042.
- Bonhomme, S., Horlow, C., Vezon, D., de Laissardiere, S., Guyon, A., Ferault, M., Marchand, M., Bechtold, N. & Pelletier, G. (1998). T-DNA mediated disruption of essential gametophytic genes in Arabidopsis is unexpectedly rare and cannot be inferred from segregation distortion alone. *Mol.Gen.Genet.*, 260, 444-452.
- Boyer, J.C. & Haenni, A.L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 198, 415-426.
- Brault, V., van den Heuvel, J.F.J.M., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J.-C., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1995). Aphid transmission of Beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J.*, 14, 650-659.
- Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M.T., Herrbach, E., Richards, K. & Ziegler-Graff, V. (2000). Effects of point mutations in the readthrough domain of the Beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J.Virol.*, 74, 1140-1148.

- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H. & Marky, L.A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 3746-3750.
- Brierley, I., Digard, P. & Inglis, S.C. (1989). Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell*, 57, 537-547.
- Brierley, I., Meredith, M.R., Bloys, A.J. & Hagervall, T.G. (1997). Expression of a coronavirus ribosomal frameshift signal in *Escherichia coli*: influence of tRNA anticodon modification on frameshifting. *J.Mol.Biol.*, 270, 360-373.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. & Baulcombe, D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.*, 17, 6739-6746.
- Bruyere, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M.T., van den Heuvel, J.F., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G. & Herrbach, E. (1997). Effects of mutations in the Beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology*, 230, 323-334.
- Budar, F., Thla-Toong, L., van Montagu, M. & Hernalsteens, J.-P. (1986). *Agrobacterium*-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single Mendelian factor. *Genetics*, 114, 303-313.
- Butaye, K.M., Goderis, I.J., Wouters, P.F., Pues, J.M., Delaure, S.L., Broekaert, W.F., Depicker, A., Cammue, B.P. & De Bolle, M.F. (2004). Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *Plant J.*, 39, 440-449.
- Cariolle, M. (1990). Beet Yellows in Europe: Recent development, incidence, epidemiological data and warning systems. In: *Proc. 53rd IIRB Winter Congr.*, Brussels, 307-322.
- Carrington, J.C. (2000). RNA silencing. Moving targets. *Nature*, 408, 150-151.
- Carrington, J.C. & Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301, 336-338.
- Carrington, J.C., Cary, S.M. & Dougherty, W.G. (1988). Mutational analysis of tobacco etch virus polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of polyproteins containing the 49-kilodalton proteinase. *J.Virol.*, 62, 2313-2320.

- Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D. & Dougherty, W.G. (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.*, 8, 365-370.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. & Schaad, M.C. (1996). Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell*, 8, 1669-1681.
- Castle, L.A., Errampalli, D., Atherton, T.L., Franzmann, L.H., Yoon, E.S. & Meinke, D.W. (1993). Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in Arabidopsis. *Mol.Gen.Genet.*, 241, 504-514.
- Chapman, S., Kavanagh, T. & Baulcombe, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.*, 2, 549-557.
- Chay, C.A., Smith, D.M., Vaughan, R. & Gray, S.M. (1996). Diversity among isolates within the PAV serotype of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology*, 86, 370-377.
- Chevallier, D., Engel, A., Wurtz, M. & Putz, C. (1983). The Structure and Characterization of a Closterovirus, Beet Yellow Virus, and a Luteovirus, Beet Mild Yellowing Virus, by Scanning Transmission Electron Microscopy, Optical Diffraction of Electron Images and Acrylamide Gel Electrophoresis. *J.Gen.Virol.*, 64, 2289-2293.
- Chilton, M.D. & Que, Q. (2003). Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiol.*, 133, 956-965.
- Chrzanowska, M. (1994). Differentiation of Potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathol.Pol.*, 8, 15-20.
- Clark, M.F. & Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen.Virol.*, 34, 475-483.
- Clinch, P.E.M. & Loughnane, J.B. (1948). Seed transmission of virus yellows of sugar beet and the existence of strains in Eire. *Roy.Dublin Soc.Proc.*, 24, 307.
- Cline, J., Braman, J.C. & Hogrefe, H.H. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 24, 3546-3551.
- Clover, G.R.G., Azam-Ali, S.N., Jaggard, K.W. & Smith, H.G. (1999). The effects of Beet yellows virus on the growth and physiology of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Pathol.*, 48, 129-138.

- Commandeur, U. & Martin, R. (1993). Investigations into the molecular biology of Potato leafroll virus by means of agroinfection. *Phytopathology*, 83, 1426.
- Coons, G.H. & Kotila, J.E. (1951). Virus yellows of sugar beets and tests for its occurrence in the United States. *Phytopathology*, 41, 559.
- Costa, A.S., Duffus, J.E. & Bardin, R. (1959). Malva yellows, an aphid-transmitted virus disease. *J. American Soc. Sugar Beet Technol.*, 10, 371-393.
- Culver, J.N. (1996). Tobamovirus cross protection using a potexvirus vector. *Virology*, 226, 228-235.
- D'Arcy, C.J., Torrance, L. & Martin, R.R. (1989). Discrimination among Luteoviruses and their strains by monoclonal antibodies and identification of common epitopes. *Phytopathology*, 79, 869-873.
- Dagless, E.M., Shintaku, M.H., Nelson, R.S. & Foster, G.D. (1997). A CaMV 35S promoter driven cDNA clone of tobacco mosaic virus can infect host plant tissue despite being uninfecious when manually inoculated onto leaves. *Arch.Virol.*, 142, 183-191.
- Dawson, W.O., Beck, D.L., Knorr, D.A. & Grantham, G.L. (1986). cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 1832-1836.
- de Bokx, J.A. & Huttinga, H. (1981). *Potato virus Y*. In: B.D. Harrisin & A.F. Murrant (Eds.), *Descriptions of plant viruses*, Commonwealth Mycological Institute, Kew and Association of Applied Biologists, Wellesbourne, No. 242.
- de Koeijer, K.J. & van der Werf, F. (1999). Effects of Beet yellows virus and Beet mild yellowing virus on leaf area dynamics of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Field Crops Res.*, 61, 163-177.
- de Miranda, J.R., Stevens, M., de Bruyne, E., Smith, H.G., Bird, C. & Hull, R. (1995). Sequence comparison and classification of beet luteovirus isolates. *Arch.Virol.*, 140, 2183-2200.
- de Miranda, J.R., Stevens, M., de Bruyne, E., Smith, H.G., Bird, C. & Hull, R. (1995). Beet luteovirus coat protein sequence variation. *Ann.Appl.Biol.*, 127, 113-124.

- de Zoeten, G.A. & Gaard, G. (1983). Mechanisms underlying systemic invasion of pea plants by pea enation mosaic virus. *Intervirology*, 19, 85-94.
- de Zoeten, G.A. & Skaf, J.S. (2001). Pea enation mosaic and the vagaries of a plant virus. *Adv. Virus Res.*, 57, 323-350.
- Deineko, E.V., Novoselya, T.V., Zagorskaya, A.A., Filipenko, E.A. & Shumnyi, V.K. (2000). Expression instability of the marker *nptII* Gene in transgenic tobacco plants. *Russian J. Plant Physiol.*, 47, 394-399.
- Demler, S.A. & de Zoeten, G.A. (1991). The nucleotide sequence and luteovirus-like nature of RNA 1 of an aphid non-transmissible strain of pea enation mosaic virus. *J.Gen.Virol.*, 72, 1819-1834.
- Demler, S.A., Rucker, D.G. & de Zoeten, G.A. (1993). The chimeric nature of the genome of pea enation mosaic virus: the independent replication of RNA 2. *J.Gen.Virol.*, 74, 1-14.
- Demler, S.A., Borkhsenius, O.N., Rucker, D.G. & de Zoeten, G.A. (1994a). Assessment of the autonomy of replicative and structural functions encoded by the luteo-phase of pea enation mosaic virus. *J.Gen.Virol.*, 75, 997-1007.
- Demler, S.A., Rucker, D.G., Nooruddin, L. & de Zoeten, G.A. (1994b). Replication of the satellite RNA of pea enation mosaic virus is controlled by RNA 2-encoded functions. *J.Gen.Virol.*, 75, 1399-1406.
- Demler, S.A., Rucker, D.G., de Zoeten, G.A., Ziegler, A., Robinson, D.J. & Murrant, A.F. (1996a). The satellite RNAs associated with the groundnut rosette disease complex and pea enation mosaic virus: sequence similarities and ability of each other's helper virus to support their replication. *J.Gen.Virol.*, 77, 2847-2855.
- Demler, S.A., de Zoeten, G.A., Adam, G., & Harris, K.F. (1996b). Pea enation: properties and aphid transmission. *The Plant Viruses, Volume 5, Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes*, Plenum Press, New York, 303-344.
- Demler, S.A., Rucker-Feeney, D.G., Skaf, J.S. & de Zoeten, G.A. (1997). Expression and suppression of circulative aphid transmission in pea enation mosaic virus. *J.Gen.Virol.*, 78, 511-523.

- Denholm, I., Devine, G., Foster, S., Gorman, K. & Nauen, R. (2002). Incidence and management of insect resistance to neonicotinoids. *Proc. Brighton Crop Protect.Conf. 2002 - Pest and Diseases*, 1, 161-168.
- Derrick, P.M. & Barker, H. (1997). Short and long distance spread of Potato leafroll luteovirus: effects of host genes and transgenes conferring resistance to virus accumulation in potato. *J.Gen.Virol.*, 78, 243-251.
- Devonshire, A.L., Morres, G.D. & French-Constant, R.H. (1986). Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with *Phorodon humili* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae). *Bul.Entomol.Res.*, 76, 97-107.
- Dewar, A.M., Haylock, L.A., Garner, B.H., Baker, P. & Sands, R.J.N. (2003). The effect of clothianidin on aphids and virus yellows in sugar beet. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 56, 127-146.
- Dinesh-Kumar, S.P., Brault, V. & Miller, W.A. (1992). Precise mapping and in vitro translation of a trifunctional subgenomic RNA of barley yellow dwarf virus. *Virology*, 187, 711-722.
- Ding, S.W., Li, H., Lu, R., Li, F. & Li, W.X. (2004). RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.*, 102, 109-115.
- Dinman, J.D., Icho, T. & Wickner, R.B. (1991). A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 88, 174-178.
- Dolinski, K., Balakrishnan, R., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hong, E.L., Nash, R., Oughtred, R., Theesfeld, C.L., Binkley, G., Lane, C., Schroeder, M., Sethuraman, A., Dong, S., Weng, S., Miyasato, S., Andrada, R., Botstein, D. & Cherry, J.M. (2003). *Saccharomyces Genome Database-Webprimer*, <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>, Access: 08/2003.
- Dolja, V.V. (2003). Beet yellows virus: the importance of being different. *Mol. Plant Pathol.*, 4, 91-98.
- Dolja, V.V., Herndon, K.L., Pirone, T.P. & Carrington, J.C. (1993). Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *J.Virol.*, 67, 5968-5975.

- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. & Carrington, J.C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, 206, 1007-1016.
- Dolja, V.V., Hong, J., Keller, K.E., Martin, R.R. & Peremyslov, V.V. (1997). Suppression of potyvirus infection by coexpressed closterovirus protein. *Virology*, 234, 243-252.
- Domier, L.L., McCoppin, N.K., Larsen, R.C. & D'Arcy, C.J. (2002). Nucleotide sequence shows that Bean leafroll virus has a Luteovirus-like genome organization. *J.Gen.Virol.*, 83, 1791-1798.
- Donnelly, M.L., Hughes, L.E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D. & Ryan, M.D. (2001). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J.Gen.Virol.*, 82, 1027-1041.
- Donnelly, M.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D. & Ryan, M.D. (2001). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J.Gen.Virol.*, 82, 1013-1025.
- Duffus, J.E. (1960). Radish Yellows, a Disease of Radish, Sugar Beet, and other Crops. *Phytopathology*, 50, 389-394.
- Duffus, J.E. (1961). Economic Significance of Beet Western Yellows (Radish Yellows) on Sugar Beet. *Phytopathology*, 51, 605-607.
- Duffus, J.E. (1964). Host Relationships of Beet Western Yellows Virus Strains. *Phytopathology*, 54, 736-738.
- Duffus, J.E. (1973). The Yellowing Diseases of Beet. *Adv. Virus Res.*, 18, 347-386.
- Duffus, J.E. & Russell, G.E. (1970). Serological and Host Range Evidence for the Occurrence of Beet Western Yellows Virus in Europe. *Phytopathology*, 60, 1199-1202.
- Duffus, J.E. & Russell, G.E. (1972). Serological Relationship Between Beet Western Yellows and Turnip Yellows Viruses. *Phytopathology*, 62, 1274-1277.
- Duffus, J.E. & Russell, G.E. (1975). Serological relationship between Beet western yellows and Beet mild yellowing viruses. *Phytopathology*, 811-815.

- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S. & Robaglia, C. (2002). The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.*, 32, 927-934.
- Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.*, 19, 1349.
- Erokhina, T.N., Zinovkin, R.A., Vitushkina, M.V., Jelkmann, W. & Agranovsky, A.A. (2000). Detection of Beet yellows closterovirus methyltransferase-like and helicase-like proteins in vivo using monoclonal antibodies. *J.Gen.Virol.*, 81, 597-603.
- Erokhina, T.N., Vitushkina, M.V., Zinovkin, R.A., Lesemann, D.E., Jelkmann, W., Koonin, E.V. & Agranovsky, A.A. (2001). Ultrastructural localization and epitope mapping of the methyltransferase-like and helicase-like proteins of Beet yellows virus. *J.Gen.Virol.*, 82, 1983-1994.
- Esau, K. & Hoefert, L.L. (1971). Cytology of Beet yellows virus infection in Tetragonia. *Protoplasma*, 72, 273.
- Feldmann, K.A., Coury, D.A. & Christianson, M.L. (1997). Exceptional segregation of a selectable marker (KanR) in Arabidopsis identifies genes important for gametophytic growth and development. *Genetics*, 147, 1411-1422.
- Fernandez, A., Lain, S. & Garcia, J.A. (1995). RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in Escherichia coli. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res.*, 23, 1327-1332.
- Flavell, R.A., Sabo, D.L., Bandle, E.F. & Weissmann, C. (1974). Site-directed mutagenesis: generation of an extracistronic mutation in bacteriophage Q beta RNA. *J.Mol.Biol.*, 89, 255-272.
- Fomitcheva, V.W., Sukhacheva, E.A. & Schubert, J. (2004). Detection of Turnip Yellows Virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase using monoclonal antibodies. *Arch.Phytopathol. Plant Protect.*, 37, 9-17.
- Foster, S.P., Harling, Z.K., Moores, G.D., and Devonshire, A.L. (1997). Resistance due to insensitive acetylcholinesterase in peach-potato aphids, *Myzus persicae*. In: *Proc. 60th IIRB Congr.*, Cambridge, 461-464.

- Foster, S.P., Denholm, I. & Thompson, R. (2003). Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera; Aphididae). *Pest Management Sci.*, 59, 166-173.
- Franco-Lara, L.F., McGeachy, K.D., Commandeur, U., Martin, R.R., Mayo, M.A. & Barker, H. (1999). Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of Potato leafroll virus: evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *J.Gen.Virol.*, 80, 2813-2822.
- Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H. & Hall, T.C. (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol.Biol.*, 27, 405-409.
- Fullner, K.J. & Nester, E.W. (1996). Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Bacteriol.*, 178, 1498-1504.
- Garcia, A., van Duin, J. & Pleij, C.W. (1993). Differential response to frameshift signals in eukaryotic and prokaryotic translational systems. *Nucleic Acids Res.*, 21, 401-406.
- Garcia, J.A., Lain, S., Cervera, M.T., Riechmann, J.L. & Martin, M.T. (1990). Mutational analysis of plum pox potyvirus polyprotein processing by the Nla protease in *Escherichia coli*. *J.Gen.Virol.*, 71, 2773-2779.
- Garret, A., Kerlan, C. & Thomas, D. (1993). The intestine is a site of passage for Potato leafroll virus from the gut lumen into the haemocoel in the aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Arch.Virol.*, 131, 377-392.
- Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 67, 16-37.
- Gibbs, M.J., Cooper, J.I. & Waterhouse, P.M. (1996). The genome organization and affinities of an Australian isolate of carrot mottle umbravirus. *Virology*, 224, 310-313.
- Gildow, F.E., Reavy, B., Mayo, M.A., Duncan, G.H., Woodforf, J.A.T., Lamb, J.W. & Hay, R.T. (2000). Aphid Acquisition and Cellular Transport of Potato leafroll virus-like Particles Lacking P5 Readthrough Protein. *Virology*, 90, 1153-1161.
- Glais, L., Kerlan, C., Tribodet, M., Astier-Manificier, S. & Robaglia, C. (1996). Molecular characterization of Potato Virus Y^N isolates by PCR-RFLP. *Eur.J.Plant Pathol.*, 102, 655-662.

Glais, L., Tribodet, M., Gauthier, J.P., Astier-Manifacier, S., Robaglia, C. & Kerlan, C. (1998). RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of Potato virus Y. *Arch. Virol.*, 143, 2077-2091.

Glais, L., Tribodet, M. & Kerlan, C. (2002). Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. *Arch. Virol.*, 147, 363-378.

Godefroy-Colburn, T., Erny, C., Schoumacher, F., Berna, A., Gagey, M.-J., & Stussi-Garaud, C. (1991). Cell-to-cell movement of plant viruses. In: R.G. Herrmann & B. Larkins (Eds.), *Plant Molecular Biology 2*, Plenum Press, New York, 35-48.

Gonsalves, D. & Shepherd, R.J. (1972). Biological and physical properties of the two nucleoprotein components of pea enation mosaic virus and their associated nucleic acids. *Virology*, 48, 709-723.

González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F.A., Barajas, D., Vargas, M., Díaz-Riuz, J. & Díaz-Riuz, J.R. (2004). Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with Potato virus X. *Molecular Plant Pathology*, 5, 39-35.

Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Blinov, V.M. & Koonin, E.V. (1989). Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett.*, 243, 103-114.

Govier, D. (1985). Purification and partial characterization of Beet mild yellowing virus and its serological detection in plants and aphids. *Ann.appl.Biol.*, 107, 439-447.

Graichen, K. & Rabenstein, F. (1996). European isolates of Beet western yellows virus (BWYV) from oilseed rape (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) are non-pathogenic on sugar beet (*Beta vulgaris* L. var. *altissima*) but represent isolates of turnip yellows virus (TuYV). *J. Plant Dis.Protect.*, 103, 233-245.

Gramstat, A., Prüfer, D. & Rohde, W. (1994). The nucleic acid-binding zinc finger protein of Potato virus M is translated by internal initiation as well as by ribosomal frameshifting involving a shifty stop codon and a novel mechanism of P-site slippage. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3911-3917.

Grimsley, N. (1995). Agroinfection. *Methods Mol.Biol.*, 44, 325-342.

Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T. & Walden, R. (1986). "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti-plasmid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 3282-3286.

Grimsley, N., Hohn, B., Ramos, C., Kado, C. & Rogowsky, P. (1989). DNA transfer from *Agrobacterium* to *Zea mays* or *Brassica* by agroinfection is dependent on bacterial virulence functions. *Mol.Gen.Genet.*, 217, 309-316.

Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balazs, E. & Richards, K.E. (1982). Transcription of Cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell*, 30, 763-773.

Guilley, H., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Lecoq, H. & Jonard, G. (1994). Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology*, 202, 1012-1017.

Guilley, H., Richards, K.E. & Jonard, G. (1995). Nucleotide sequence of Beet mild yellowing virus RNA. *Arch.Virol.*, 140, 1109-1118.

Guo, D., Rajamaki, M.L., Saarma, M. & Valkonen, J.P. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J.Gen.Virol.*, 82, 935-939.

Guo, L., Allen, E. & Miller, W.A. (2000). Structure and function of a cap-independent translation element that functions in either the 3' or the 5' untranslated region. *RNA*, 6, 1808-1820.

Guyader, S. & Ducray, D.G. (2002). Sequence analysis of Potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *J.Gen.Virol.*, 83, 1799-1807.

Hagedorn, D.J., Layne, R.E.C. & Ruppell, E.G. (1964). Host range of pea enation mosaic virus and use of *Chenopodium album* Willd. as a local lesion host. *Phytopathology*, 54, 843-852.

Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286, 950-952.

Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.*, 21, 4671-4679.

- Hampton, R.O., Keller, K.E. & Baggett, J.R. (1998). Beet Western Yellows Luteovirus in Western Oregon. *Plant Dis.*, 82, 140-148.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.*, 166, 557-580.
- Harrison, B.D., Finch, J.T., Gibbs, A.J., Hollings, M., Shepherd, R.J., Valenta, V. & Wetter, C. (1971). Sixteen groups of plant viruses. *Virology*, 45, 356-363.
- Hauser, S., Stevens, M., Mougel, C., Smith, H.G., Fritsch, C., Herrbach, E. & Lemaire, O. (2000a). Biological, Serological, and Molecular Variability Suggest Three Distinct Polerovirus Species Infecting Beet or Rape. *Phytopathology*, 90, 460-466.
- Hauser, S., Weber, C., Vetter, G., Stevens, M., Beuve, M. & Lemaire, O. (2000b). Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. *J.Virol.Methods*, 89, 11-21.
- Hauser, S., Deniau, K., Muchembled, C., Beuve, M., Herrbach, E., & Lemaire, O. (2000c). Epidemiology of Polerovirus-induced mild yellowing of sugar beet :a survey carried out in France in 1999. In: *Proc. 63rd IIRB Congr.*, Interlaken, 553-568.
- Hauser, S., Stevens, M., Beuve, M. & Lemaire, O. (2002). Biological properties and molecular characterization of Beet chlorosis virus (BChV). *Arch.Virol.*, 147, 745-762.
- He, X.-H., Rao, A.L.N. & Creamer, R. (1997). Characterization of Beet Yellows Closterovirus-Specific RNAs in Infected Plants and Protoplasts. *Phytopathology*, 87, 347-352.
- Heijbroek, W. (1990). The effects of Beet yellows virus (BYV) and sugar Beet mild yellowing virus (BMV) on yield of sugar beet. In: *Proc. 53rd IIRB Winter Congr.*, Brussels, 323-331.
- Heiling, A., Steudel, W. & Thielemann, R. (1956). Zur Frage der gegenseitigen Beziehungen zweier epidemisch auftretender Krankheiten der Beta-Rübe. *Phytopathol.Z.*, 26, 401-437.
- Hellico-Kervarrec, C., Riault, G. & Jacquot, E. (2002). Biolistic-mediated inoculation of immature wheat embryos with Barley yellow dwarf virus-PAV. *J.Virol.Methods*, 102, 161-166.

- Herrbach, E. (1999). Vector-Virus Interaction. In: H.G. Smith & H. Barker (Eds.), *The Luteoviridae*, Cabi Publishing, New York, 85-146.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. & Schilpoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.
- Hofacker, I.L. (2003). Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3429-3431.
- Hoffmann, K., Verbeek, M., Romano, A., Dulleman, A.M., van den Heuvel, J.F. & van der Wilk, F. (2001). Mechanical transmission of poleroviruses. *J.Virol.Methods*, 91, 197-201.
- Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. & Chilton, M.D. (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J.Bacteriol.*, 168, 1291-1301.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227, 1229-1231.
- Horsfield, J.A., Wilson, D.N., Mannering, S.A., Adamski, F.M. & Tate, W.P. (1995). Prokaryotic ribosomes recode the HIV-1 gag-pol-1 frameshift sequence by an E/P site post-translocation simultaneous slippage mechanism. *Nucleic Acids Res.*, 23, 1487-1494.
- Howden, R., Park, S.K., Moore, J.M., Orme, J., Grossniklaus, U. & Twell, D. (1998). Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. *Genetics*, 149, 621-631.
- Huang, X. (1994). On Global Sequence Alignment. *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 227-235.
- Hull, R. (2002). *Matthews' plant virology*. Vierte Auflage, Academic Press, San Diego.

- Hull, R. (1963). Control of yellows in sugar beet. *Journal of the National Institute of Agricultural Botany*, 9, 452-455.
- Hull, R. & Lane, L.C. (1973). The unusual nature of the components of a strain of pea enation mosaic virus. *Virology*, 55, 1-13.
- Izadpanah, K. & Sheperd, R.J. (1966). *Galactia* sp. as a local lesion host for pea enation mosaic virus. *Phytopathology*, 56, 458-459.
- Jaag, H.M., Kawchuk, L., Rohde, W., Fischer, R., Emans, N. & Prüfer, D. (2003). An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a Potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100, 8939-8944.
- Jacks, T., Madhani, H.D., Masiarz, F.R. & Varmus, H.E. (1988). Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell*, 55, 447-458.
- Jakowitsch, J., Papp, I., Moscone, E.A., van der Winden, J., Matzke, M. & Matzke, A.J. (1999). Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J.*, 17, 131-140.
- Janda, M., French, R. & Ahlquist, P. (1987). High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on transcript infectivity. *Virology*, 158, 259-262.
- Jenner, C.E., Wang, X., Tomimura, K., Ohshima, K., Ponz, F. & Walsh, J.A. (2003). The dual role of the potyvirus P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 16, 777-784.
- Jin, S., Song, Y.N., Deng, W.Y., Gordon, M.P. & Nester, E.W. (1993). The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *J.Bacteriol.*, 175, 6830-6835.
- Juszczuk, M., Paczkowska, E., Sadowy, E., Zagorski, W. & Hulanicka, D.M. (2000). Effect of genomic and subgenomic leader sequences of Potato leafroll virus on gene expression. *FEBS Lett.*, 484, 33-36.
- Kamer, G. & Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.*, 12, 7269-7282.

- Karasev, A.V. (2000). Genetic Diversity and Evolution of Closteroviruses. *Annu.Rev.Phytopathol.*, 38:293-324., 293-324.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 95, 461-470.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (2001). Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology*, 285, 71-81.
- Kasschau, K.D., Cronin, S. & Carrington, J.C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology*, 228, 251-262.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. & Carrington, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev.Cell*, 4, 205-217.
- Katavic, V., Haughn, G.W., Reed, D., Martin, M. & Kunst, L. (1994). In planta transformation of Arabidopsis thaliana. *Mol.Gen.Genet.*, 245, 363-370.
- Katul, L. (1992). Serologische und molekularbiologische Charakterisierung des *Bean leafroll virus* (BLRV) und des *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV). Dissertation, Fachbereich Agrarwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen.
- Kawchuk, L., Jaag, H.M., Toohey, K., Martin, R., Rohde, W. & Ramos, C. (2002). In planta agroinfection by Canadian and German *Potato leafroll virus* full-length. *Can.J.Plant Pathol.*, 24, 239-243.
- Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L. & Guillet, M. (1999). Variability of Potato Virus Y in Potato Crops in France. *J. Phytopathology*, 147, 643-651.
- Kiernan, J.M., Goldberg, K.B., Young, M.J., Schoelz, J.E. & Sheperd, R.J. (1989). Transformation and regeneration of *Nicotiana edwardsonii*. *Plant Science*, 64, 67-78.
- Kift, N.B., Dewar, A.M. & Dixon, A.F.G. (1996). The effect of plant age and infection with virus yellows on the survival of *Myzus persicae* on sugar beet. *Ann.Appl.Biol.*, 129, 371-378.

- Kim, Y.G., Maas, S., Wang, S.C. & Rich, A. (2000). Mutational study reveals that tertiary interactions are conserved in ribosomal frameshifting pseudoknots of two luteoviruses. *RNA*, 6, 1157-1165.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A.G. & Shaw, J.G. (1994). Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology*, 204, 759-769.
- Koev, G., Liu, S., Beckett, R. & Miller, W.A. (2002). The 3prime prime or minute-terminal structure required for replication of Barley yellow dwarf virus RNA contains an embedded 3prime prime or minute end. *Virology*, 292, 114-126.
- Kohli, A., Twyman, R.M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E. & Christou, P. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant.Mol.Biol.*, 52, 247-258.
- Komari, T. (1990). Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Rep.*, 9, 303-306.
- Kujawa, A.B., Drugeon, G., Hulanicka, D. & Haenni, A.L. (1993). Structural requirements for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA-dependent RNA polymerase of Potato leafroll virus. *Nucleic Acids Res.*, 21, 2165-2171.
- Kühne, T., Proeseler, G., Richter, J., Stanarius, A. & Proll, E. (1985). Mildes Rübenvergilbungs-Virus (Beet mild yellowing virus): Vermehrung, Reinigung und Herstellung von Antiseren. *Arch.Phytopath.Pflanz.*, 21, 3-12.
- Lai, M.M. (2000). The making of infectious viral RNA: No size limit in sight. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 5025-5027.
- Lain, S., Riechmann, J.L. & Garcia, J.A. (1990). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res.*, 18, 7003-7006.
- Lain, S., Martin, M.T., Riechmann, J.L. & Garcia, J.A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J.Virol.*, 65, 1-6.
- Langenberg, W.G. & Zhang, L. (1997). Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J.Struct.Biol.*, 118, 243-247.

- Le Romancer, M., Kerlan, C. & Nedellec, C.M. (1994). Biological characterization of various geographical isolates of Potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.*, 43, 138-144.
- Lee, L., Palukaitis, P. & Gray, S.M. (2002). Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kda protein in virus movement. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 15, 1086-1094.
- Leiser, R.M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with Beet western yellows luteovirus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 89, 9136-9140.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G. & Laliberte, J.F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J.Virol.*, 74, 7730-7737.
- Leonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M.G. & Laliberte, J.F. (2004). Interaction of VPg-Pro of turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J.Gen.Virol.*, 85, 1055-1063.
- Lewellen, R.T., Wisler, G.C., Liu, H.Y., Kaffka, S.R., Sears, J.L. & Duffus, J.E. (1999). Reaction of sugarbeet breeding lines and hybrids to Beet chlorosis luteovirus. *J. Sugar Beet Res.*, 36, 76.
- Lewellen, R.T. (2004a). Registration of Sugarbeet Germplasm Lines C67/2, C69/2, C78/3, and C80/2 with Resistance to Virus Yellows and Rhizomania. *Crop Science*, 44, 358-359.
- Lewellen, R.T. (2004b). Registration of Sugarbeet Germplasm Lines C927-4, C929-62, C930-19, and C930-35 with Resistance to Rhizomania, Virus Yellows, and Bolting. *Crop Science*, 44, 359-361.
- Li, W.X. & Ding, S.W. (2001). Viral suppressors of RNA silencing. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 12, 150-154.
- Li, X., Ryan, M.D. & Lamb, J.W. (2000). Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *J.Gen.Virol.*, 81, 1857-1864.
- Liu, H.Y., Wisler, G.C., Sears, J.L. & Duffus, J.E. (1999). Beet chlorosis virus - A new luteovirus affecting sugarbeet. *J. Sugar Beet Res.*, 36, 69.

- Llave, C., Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 13401-13406.
- Lopez-Moya, J.J., Wang, R.Y. & Pirone, T.P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J.Gen.Virol.*, 80, 3281-3288.
- Lopinski, J.D., Dinman, J.D. & Bruenn, J.A. (2000). Kinetics of ribosomal pausing during programmed -1 translational frameshifting. *Mol.Cell Biol.*, 20, 1095-1103.
- Lu, Z.-X., Laroche, A. & Huang, H.C. (2004). Segregation patterns for integration and expression of *Coniothyrium minitans* xylanase gene in *Arabidopsis thaliana* transformants. *Bot.Bull.Acad.Sin.*, 45, 23-31.
- Lucchesi, J., Makelainen, K., Merits, A., Tamm, T. & Makinen, K. (2000). Regulation of -1 ribosomal frameshifting directed by cocksfoot mottle sobemovirus genome. *Eur.J.Biochem.*, 267, 3523-3529.
- Mahajan, S., Dolja, V.V. & Carrington, J.C. (1996). Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *J.Virol.*, 70, 4370-4379.
- Maia, I.G., Haenni, A. & Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J.Gen.Virol.*, 77, 1335-1341.
- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V.B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, 13, 571-583.
- Mallory, M.C., Mlotshwa, S., Bowman, L.H. & Vance, V.B. (2003). The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J.*, 35, 82-92.
- Marathe, R., Smith, T.H., Anandalakshmi, R., Bowman, L.H., Fagard, M., Mourrain, P., Vaucheret, H. & Vance, V.B. (2000). Plant viral suppressors of post-transcriptional silencing do not suppress transcriptional silencing. *Plant J.*, 22, 51-59.
- Martin, R.R., Keese, P.K., Young, J.M., Waterhouse, P.M. & Gerlach, W.L. (1990). Evolution and molecular biology of luteoviruses. *Annu.Rev.Phytopathol.*, 28, 341-361.

- Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E. & Lopez de Quinto, S. (2001). Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J.Gen.Virol.*, 82, 973-984.
- Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L., Devonshire, A.L. & Williamson, M.S. (1999). A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol. Biol.*, 8, 339-346.
- Matzke, M., Aufsatz, W., Kanno, T., Daxinger, L., Papp, I., Mette, M.F. & Matzke, A.J. (2004). Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim.Biophys.Acta*, 1677, 129-141.
- Mayo, M.A. & Ziegler-Graff, V. (1996). Molecular biology of luteoviruses. *Adv.Virus Res.*, 46, 413-460.
- Mayo, M.A. & D'Arcy, C.J. (1999). Family Luteoviridae: a Reclassification of Luteoviruses. In: H.G. Smith & H. Barker (Eds.), *The Luteoviridae*, Cabi Publishing, New York, 15-21.
- Mayo, M.A. & Miller, W.A. (1999). The Structure and Expression of Luteovirus Genomes. In: H.G. Smith & H. Barker (Eds.), *The Luteoviridae*, Cabi Publishing, New York, 23-42.
- Mayo, M.A., Robinson, D.J., Jolly, C.A. & Hyman, L. (1989). Nucleotide sequence of Potato leafroll luteovirus RNA. *J.Gen.Virol.*, 70, 1037-1051.
- Mayo, M., Ryabov, E., Fraser, G. & Taliansky, M. (2000). Mechanical transmission of Potato leafroll virus. *J.Gen.Virol.*, 81, 2791-2795.
- Medina, V., Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y. & Dolja, V.V. (1999). Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by Beet yellows closterovirus. *Virology*, 260, 173-181.
- Mejlhede, N., Atkins, J.F. & Neuhard, J. (1999). Ribosomal -1 frameshifting during decoding of *Bacillus subtilis* cdd occurs at the sequence CGA AAG. *J.Bacteriol.*, 181, 2930-2937.
- Mejlhede, N., Licznar, P., Prere, M.F., Wills, N.M., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. & Fayet, O. (2004). -1 frameshifting at a CGA AAG hexanucleotide site is required for transposition of insertion sequence IS1222. *J.Bacteriol.*, 186, 3274-3277.

- Merits, A., Guo, D. & Saarma, M. (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J.Gen.Virol.*, 79, 3123-3127.
- Merits, A., Rajamaki, M.L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen, J.P. & Saarma, M. (2002). Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J.Gen.Virol.*, 83, 1211-1221.
- Mette, M.F., Matzke, A.J. & Matzke, M.A. (2001). Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. *Curr.Biol.*, 11, 1119-1123.
- Meyer, P. (2000). Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Mol.Biol.*, 43, 221-234.
- Meza, T.J., Enerly, E., Boru, B., Larsen, F., Mandal, A., Aalen, R.B. & Jakobsen, K.S. (2002). A human CpG island randomly inserted into a plant genome is protected from methylation. *Transgenic Res.*, 11, 133-142.
- Miller, W.A., Dinesh-Kumar, S.P. & Paul, C.P. (1995). Luteovirus Gene Expression. *CRC Crit Rev Plant Sci.*, 14, 179-211.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W., Pruss, G. & Vance, V.B. (2002). RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell*, 14, 289-301.
- Mlynarova, L., Hricova, A., Loonen, A. & Nap, J.P. (2003). The presence of a chromatin boundary appears to shield a transgene in tobacco from RNA silencing. *Plant Cell*, 15, 2203-2217.
- Moissiard, G. & Voinnet, O. (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol. Plant Pathol.*, 5, 71-82.
- Moloney, M.M., Maurice, M., Walker, J.M. & Sharma, K.K. (1989). High efficiency transformation of Brassica napus using Agrobacterium vectors. *Plant Cell Rep.*, 8, 238-242.
- Morres, G.D., Devine, G.J. & Devonshire, A.L. (1994). Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pestic.Biochem.Physiol.*, 49, 114-120.

- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. & Jacquemond, M. (2004). Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 17, 322-329.
- Mutterer, J.D., Stussi-Garaud, C., Michler, P., Richards, K.E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (1999a). Role of the Beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii*. *J.Gen. Virol.*, 80, 2771-2778.
- Mutterer, J.D., Ziegler-Graff, V., & Richards, K.E. (1999b). Agro-infection as a Means of Transmitting Luteoviruses to Host Plants for Study of Gene Expression. In: H.G. Smith & H. Barker (Eds.), *The Luteoviridae*, Cabi Publishing, New York, 43-68.
- Naphtine, S., Vidakovic, M., Ginary, R., Namy, O. & Brierley, I. (2003). Prokaryotic-style frameshifting in a plant translation system: conservation of an unusual single-tRNA slippage event. *EMBO J.*, 22, 3941-3950.
- Napuli, A.J., Falk, B.W. & Dolja, V.V. (2000). Interaction between HSP70 homolog and filamentous virions of the Beet yellows virus. *Virology*, 274, 232-239.
- Napuli, A.J., Alzhanova, D.V., Doneanu, C.E., Barofsky, D.F., Koonin, E.V. & Dolja, V.V. (2003). The 64-kilodalton capsid protein homolog of Beet yellows virus is required for assembly of virion tails. *J.Virol.*, 77, 2377-2384.
- Nie, X. & Singh, R.P. (2003). Evolution of North American PVY^{NTN} Strain Tu660 from Local PVYN by Mutation rather than Recombination. *Virus Genes*, 26, 39-47.
- Nixon, P.L., Cornish, P.V., Suram, S.V. & Giedroc, D.P. (2002). Thermodynamic analysis of conserved loop-stem interactions in P1-P2 frameshifting RNA pseudoknots from plant Luteoviridae. *Biochemistry*, 41, 10665-10674.
- Nurkiyanova, K.M., Ryabov, E.V., Commandeur, U., Duncan, G.H., Canto, T., Gray, S.M., Mayo, M.A. & Taliansky, M.E. (2000). Tagging Potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *J.Gen. Virol.*, 81, 617-626.
- Odell, J.T., Nagy, F. & Chua, N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810-812.
- Parkin, N.T., Chamorro, M. & Varmus, H.E. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J.Virol.*, 66, 5147-5151.

- Parrella, G., Ruffel, S., Moretti, A., Morel, C., Palloix, A. & Caranta, C. (2002). Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor.Appl.Genet.*, 105, 855-861.
- Pasquinelli, A.E. & Ruvkun, G. (2002). Control of developmental timing by micrnas and their targets. *Annu.Rev Cell Dev.Biol.*, 18, 495-513.
- Paul, C.P., Barry, J.K., Dinesh-Kumar, S.P., Brault, V. & Miller, W.A. (2001). A sequence required for -1 ribosomal frameshifting located four kilobases downstream of the frameshift site. *J.Mol.Biol.*, 310, 987-999.
- Peiffer, M.L., Gildow, F.E. & Gray, S.M. (1997). Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *J.Gen.Virol.*, 78, 495-503.
- Peremyslov, V.V. & Dolja, V.V. (2002). Identification of the subgenomic mRNAs that encode 6-kDa movement protein and Hsp70 homolog of Beet yellows virus. *Virology*, 295, 299-306.
- Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y. & Dolja, V.V. (1998). Genes required for replication of the 15.5-kilobase RNA genome of a plant closterovirus. *J.Virol.*, 72, 5870-5876.
- Petherbridge, F.R. & Strirrup, H.H. (1935). Pests and diseases of the sugar beet. *Bulletin of Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London*, 93, 40-47.
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K.E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (2002). P0 of Beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J.Virol.*, 76, 6815-6824.
- Plant, E.P., Wang, P., Jacobs, J.L. & Dinman, J.D. (2004). A programmed -1 ribosomal frameshift signal can function as a cis-acting mRNA destabilizing element. *Nucleic Acids Res.*, 32, 784-790.
- Powell, C.A. & de Zoeten, G.A. (1977). Replication of pea enation mosaic virus RNA in isolated pea nuclei. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 74, 2919-2922.
- Prokhnevsky, A.I., Peremyslov, V.V., Napuli, A.J. & Dolja, V.V. (2002). Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of Beet yellows virus. *J.Virol.*, 76, 11003-11011.

Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. & Bowman, V., V (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, 9, 859-868.

Pruss, G.J., Lawrence, C.B., Bass, T., Li, Q.Q., Bowman, L.H. & Vance, V. (2004). The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology*, 320, 107-120.

Prüfer, D., Tacke, E., Schmitz, J., Kull, B., Kaufmann, A. & Rohde, W. (1992). Ribosomal frameshifting in plants: a novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative viral replicase of Potato leafroll luteovirus. *EMBO J.*, 11, 1111-1117.

Prüfer, D., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Guilley, H., Lecoq, H. & Jonard, G. (1995). Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology*, 214, 150-158.

Prüfer, D., Schmitz, J., Tacke, E., Kull, B. & Rohde, W. (1997). In vivo expression of a full-length cDNA copy of Potato leafroll virus (PLRV) in protoplasts and transgenic plants. *Mol.Gen.Genet.*, 253, 609-614.

Prüfer, D., Kawchuk, L., Monecke, M, Nowok, S., Fischer, R. & Rohde, W. (1999). Immunological analysis of Potato leafroll luteovirus (PLRV) P1 expression identifies a 25 kDa RNA-binding protein derived via P1 processing. *Nucleic Acids Res.*, 27, 421-425.

Puustinen, P. & Mäkinen, K.M. (2004). Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J.Biol.Chem.*, 279, 38103-38110.

Qu, F. & Morris, T.J. (1997). Encapsidation of turnip crinkle virus is defined by a specific packaging signal and RNA size. *J.Virol.*, 71, 1428-1435.

Qu, F. & Morris, T.J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 15, 193-202.

Racaniello, V.R. & Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 214, 916-919.

- Racchah, B., Huet, H., & Blanc, S. (2001). Potyviruses. In: K.F. Harris, O.P. Smith, & J.E. Duffus (Eds.), *Virus-Insect-Plant Interactions*, Academic Press, London, 181-206.
- Rajamaki, M.L. & Valkonen, J.P. (1999). The 6K2 protein and the VPg of Potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 12, 1074-1081.
- Reed, J.C., Kasschau, K.D., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Pogue, G.P., Carrington, J.C. & Dolja, V.V. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology*, 306, 203-209.
- Reil, H., Kollmus, H., Weidle, U.H. & Hauser, H. (1993). A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells. *J. Virol.*, 67, 5579-5584.
- Reinbold, C., Gildow, F.E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Goncalves, M.C., van den Heuvel, J.F. & Brault, V. (2001). Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *J.Gen.Virol.*, 82, 1995-2007.
- Reisman, D. & de Zoeten, G.A. (1982). A covalently linked protein at the 5'-ends of the genomic RNA of Pea enation mosaic virus. *J.Gen.Virol.*, 62, 187-190.
- Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1993). Identification of Beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology*, 195, 692-699.
- Ricchetti, M. & Buc, H. (1990). Reverse transcriptases and genomic variability: the accuracy of DNA replication is enzyme specific and sequence dependent. *EMBO J.*, 9, 1583-1593.
- Riechmann, J.L., Lain, S. & Garcia, J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J.Gen.Virol.*, 73, 1-16.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S. & Casse-Delbart, F. (1989). Nucleotide sequence of Potato virus Y (N Strain) genomic RNA. *J.Gen.Virol.*, 70, 935-947.
- Roberts, A.G., Cruz, S.S., Roberts, I.M., Prior, D., Turgeon, R. & Oparka, K.J. (1997). Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. *Plant Cell*, 9, 1381-1396.

- Rodriguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P. & Shaw, J.G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J.Gen.Virol.*, 74, 1945-1949.
- Roland, G. (1936). Recherches sur la jaunisse de la betterave et quelques observations sur la mosaïque de cette plante. *Sucr.Belge*, 55, 231-241.
- Roth, B.M., Pruss, G.J. & Vance, V.B. (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.*, 102, 97-108.
- Rovere, C.V., del Vas, M. & Hopp, H.E. (2002). RNA-mediated virus resistance. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 13, 167-172.
- Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. & Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against Potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.*, 32, 1067-1075.
- Russell, G.E. (1958). Sugar beet yellows: A preliminary study the distribution and interrelationships of viruses and virus strains found in East Anglia, 1955-57. *Ann.appl.Biol.*, 46, 393-398.
- Russell, G.E. (1960). Sugar beet yellows: further studies on viruses and virus strains and their distribution in East Anglia, 1958-59. *Annals of Applied Biology*, 48, 721.
- Russell, G.E. (1962). Sugar Beet Mild Yellowing Virus: a Persistent Aphid-transmitted Virus. *Nature*, 195, 1231.
- Russell, G.E. (1965). The host range of some english isolates of Beet yellowing viruses. *Ann.appl.Biol.*, 55, 245-252.
- Ryabov, E.V., Oparka, K.J., Santa, C.S., Robinson, D.J. & Taliansky, M.E. (1998). Intracellular location of two groundnut rosette umbravirus proteins delivered by PVX and TMV vectors. *Virology*, 242, 303-313.
- Ryabov, E.V., Robinson, D.J. & Taliansky, M.E. (1999a). A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 1212-1217.

- Ryabov, E.V., Roberts, I.M., Palukaitis, P. & Taliansky, M. (1999b). Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of cucumber mosaic virus are facilitated by the movement protein of groundnut rosette virus. *Virology*, 260, 98-108.
- Ryabov, E.V., Fraser, G., Mayo, M.A., Barker, H. & Taliansky, M. (2001a). Umbravirus gene expression helps Potato leafroll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. *Virology*, 286, 363-372.
- Ryabov, E.V., Robinson, D.J. & Taliansky, M. (2001b). Umbravirus-encoded proteins both stabilize heterologous viral RNA and mediate its systemic movement in some plant species. *Virology*, 288, 391-400.
- Ryan, M.D., King, A.M. & Thomas, G.P. (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J.Gen.Virol.*, 72, 2727-2732.
- Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M., David, C., Zagorski-Ostojka, W., Gronenborn, B. & Hulanicka, M.D. (2001a). The ORF0 product of Potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation. *J.Gen.Virol.*, 82, 1529-1532.
- Sadowy, E., Juszczuk, M., David, C., Gronenborn, B. & Hulanicka, M.D. (2001b). Mutational analysis of the proteinase function of Potato leafroll virus. *J.Gen.Virol.*, 82, 1517-1527.
- Saenz, P., Cervera, M.T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J.B., Riechmann, J.L. & Garcia, J.A. (2000). Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *J.Gen.Virol.*, 81, 557-566.
- Saenz, P., Quiot, L., Quiot, J.B., Candresse, T. & Garcia, J.A. (2001). Pathogenicity determinants in the complex virus population of a Plum pox virus isolate. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 14, 278-287.
- Salazar, L.F., Hammond, R.W., Diener, T.O. & Owens, R.A. (1988). Analysis of viroid replication following *Agrobacterium*-mediated inoculation of non-host species with Potato spindle tuber viroid cDNA. *J.Gen.Virol.*, 69, 879-889.
- Sambrook, J. & Russel, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sasaki, N., Fujita, Y., Mise, K. & Furusawa, I. (2001). Site-specific single amino acid changes to Lys or Arg in the central region of the movement protein of a hybrid bromovirus are required for adaptation to a nonhost. *Virology*, 279, 47-57.
- Savenkov, E.I. & Valkonen, J.P. (2002). Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. *J.Gen.Virol.*, 83, 2325-2335.
- Savenkov, E.I. & Valkonen, J.P. (2001). Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology*, 283, 285-293.
- Schaad, M.C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S. & Carrington, J.C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (Nla) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J.Virol.*, 70, 7039-7048.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E. & Carrington, J.C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.*, 16, 4049-4059.
- Schaad, M.C., Anderberg, R.J. & Carrington, J.C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus Nla protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology*, 273, 300-306.
- Schaegger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.*, 166, 368-379.
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rohde, W. & Rohfritsch, O. (1997). In situ localization of the putative movement protein (pr17) from Potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology*, 235, 311-322.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B., Kikkert, M. & Jackson, A.O. (1995). Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology*, 213, 425-438.
- Shi, X.M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J.C. & Vance, V.B. (1997). Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate Potato virus X/potyviral synergism. *Virology*, 231, 35-42.

- Shintaku, M.H., Carter, S.A., Bao, Y. & Nelson, R.S. (1996). Mapping nucleotides in the 126-kDa protein gene that control the differential symptoms induced by two strains of tobacco mosaic virus. *Virology*, 221, 218-225.
- Silhavy, D. & Burgyan, J. (2004). Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci.*, 9, 76-83.
- Sit, T.L., Haikal, P.R., Callaway, A.S. & Lommel, S.A. (2001). A single amino acid mutation in the carnation ringspot virus capsid protein allows virion formation but prevents systemic infection. *J. Virol.*, 75, 9538-9542.
- Skaf, J.S., Rucker, D.G., Demler, S.A., Wobus, C.E. & de Zoeten, G.A. (1997). The coat protein is dispensable for the establishment of systemic infections by Pea enation mosaic virus. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 10, 929-932.
- Skaf, J.S., Schultz, M.H., Hirata, H. & de Zoeten, G.A. (2000). Mutational evidence that the VPg is involved in the replication and not the movement of Pea enation mosaic virus-1. *J.Gen.Virol.*, 81, 1103-1109.
- Smith, H.G. (2001). Raymond Hull memorial lecture: Virus yellows - the problem solved? *British Sugar Beet Rev.*, 69, 1-9.
- Smith, G. A. (1990). The use of ELISA for detecting viruses in sugar beet and aphids. In: *Proc. 53rd IIRB Winter Congr.*, Brussels, 369-377.
- Smith, H.G. (1989). Distribution and infectivity of yellowing viruses in field-grown sugar-beet plants. *Ann.Appl.Biol.*, 114, 481-487.
- Smith, H.G. & Hallsworth, P.B. (1990). The effects of yellowing viruses on yield of sugar beet in field trials, 1985-1987. *Ann.Appl.Biol.*, 116, 503-511.
- Smith, H.G. & Hinckes, J.A. (1985). Studies on *Beet western yellows virus* in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). *Ann.Appl.Biol.*, 107, 473-484.
- Smith, H.G., Barker, I., Brewer, G., Stevens, M. & Hallsworth, P.B. (1996). Production and evaluation of monoclonal antibodies for the detection of Beet mild yellowing luteovirus and related strains. *Europ.J. Plant Pathol.*, 102, 163-169.

- Smith, S. D. J., Dewar, A. M., & Devonshire, A. L. (1990). Resistance of *Myzus persicae* to insecticides applied to sugar beet. In: *Proc. 53rd IIRB Winter Congr.*, Brussels, 379-398.
- Sonntag, K., Döscher, B. & Sellner, M. (2001). Genotype effects on *Agrobacterium* mediated genetic transformation of *Brassica napus*. *Acta Hort.(ISHS)*, 560, 215-217.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.*, 98, 503-517.
- Spetz, C. & Valkonen, J.P. (2004). Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 17, 502-510.
- Stachel, S.E., Messens, E., van Montagu, M. & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318, 624-628.
- Stevens, M. & Smith, H.G. (2001). Virus yellows strains and their effects on the yield of UK sugar beet. *British Sugar Beet Rev.*, 69, 44-46.
- Stevens, M., Smith, H.G. & Hallsworth, P.B. (1994). Identification of a second distinct strain of Beet mild yellowing luteovirus using monoclonal antibodies and transmission studies. *Ann.appl.Biol.*, 125, 515-520.
- Stevens, M., Dolby, C. A. & Smith, H. G. (1997). Comparison of properties of european isolates of BMV and BYV. In: *Proc. 60th IIRB Congr.*, Cambridge, 561-564.
- Stevens, M., Hallsworth, P.B. & Smith, H.G. (2004). The effects of *Beet mild yellowing virus* and *Beet chlorosis virus* on the yield of UK field-grown sugar beet in 1997, 1999 and 2000. *Ann.Appl.Biol.*, 144, 113-119.
- Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T. & Okuda, S. (2004). An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J.Gen.Virol.*, 85, 2087-2098.
- Symons, R.H. (1997). Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.*, 25, 2683-2689.

- Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, D. & Rohde, W. (1993). Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of Potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology*, 197, 274-282.
- Taliansky, M.E. & Robinson, D.J. (2003). Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors. *J.Gen.Virol.*, 84, 1951-1960.
- Taliansky, M., Roberts, I.M., Kalinina, N., Ryabov, E.V., Raj, S.K., Robinson, D.J. & Oparka, K.J. (2003). An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *J.Virol.*, 77, 3031-3040.
- Taliansky, M., Mayo, M.A. & Barker, H. (2003). Potato leafroll virus: a classic pathogen shows some new tricks. *Mol. Plant Pathol.*, 4, 81-89.
- Taliansky, M., Kim, S.H., Mayo, M.A., Kalinina, N.O., Fraser, G., McGeachy, K.D. & Barker, H. (2004). Escape of a plant virus from amplicon-mediated RNA silencing is associated with biotic or abiotic stress. *Plant J.*, 39, 194-205.
- Tamm, T. & Truve, E. (2000). Sobemoviruses. *J.Virol.*, 74, 6231-6241.
- Tang, H., Ren, Z., Wallbraun, M., Reustle, G. & Krczal, G. (2001). Regeneration of transgenic plants from walnut somatic embryos mediated with *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hort.*, 544, 201-205.
- Taniguchi, T., Palmieri, M. & Weissmann, C. (1978). Q β DNA-containing hybrid plasmids giving rise to Q β phage formation in the bacterial host. *Nature*, 274, 223-228.
- Thole, V., Dalmay, T., Burgyan, J. & Balazs, E. (1993). Cloning and sequencing of Potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*, 123, 149-156.
- Tinland, B., Fournier, P., Heckel, T. & Otten, L. (1992). Expression of a chimaeric heat-shock-inducible *Agrobacterium* 6b oncogene in *Nicotiana rustica*. *Plant Mol.Biol.*, 18, 921-930.
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A.M. & Hohn, B. (1995). The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J.*, 14, 3585-3595.

- Toepfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. & Steinbiss, H.H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.*, 15, 5890.
- Tordo, V.M., Chachulska, A.M., Fakhfakh, H., Le Romancer, M., Robaglia, C. & Astier-Manificier, S. (1995). Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of Potato virus Y genomic RNA. *J.Gen.Virol.*, 76, 939-949.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 76, 4350-4354.
- Tzfira, T., Frankman, L.R., Vaidya, M. & Citovsky, V. (2003). Site-specific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA via double-stranded intermediates. *Plant Physiol.*, 133, 1011-1023.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L. & Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.*, 74, 157-175.
- van den Heuvel, J.F., Bruyere, A., Hogenhout, S.A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F. & Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J.Virol.*, 71, 7258-7265.
- van den Heuvel, J.F., van der Vlugt, R.A., Verbeek, M., de Haan, P.T. & Huttinga, H. (1994). Characteristics of a resistance-breaking isolate of Potato virus Y causing Potato tuber necrosis ringspot disease. *Eur.J.Plant Pathol.*, 100, 347-356.
- van den Heuvel, J.F., de Blank, C.M., Peters, D. & van Lent, J.W. (1995). Localization of Potato leafroll virus in leaves of secondarily-infected potato plants. *Eur.J. Plant Pathol.*, 101, 567-571.
- van den Heuvel, J.F., Hogenhout, S.A. & van der Wilk, .F. (1999). Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. *Trends Microbiol.*, 7, 71-76.
- van der Graaff, E., Dulk-Ras, A. & Hooykaas, P.J. (1996). Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol.Biol.*, 31, 677-681.
- van der Werf, S., Bradley, J., Wimmer, E., Studier, F.W. & Dunn, J.J. (1986). Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 2330-2334.

- van der Wilk, F., Houterman, P., Hans, F., Dekker, B., van den Heuvel, J., Huttinga, H. & Goldbach, R. (1997). Expression of Potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease like symptoms in transgenic potato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10, 153-159.
- van Hoof, H.A. (1980). Aphid vectors of Potato virus Y. *Neth.J.Pl.Path.*, 86, 159-162.
- Vance, V. & Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science*, 292, 2277-2280.
- Vance, V., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G. & Shi, X.M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology*, 206, 583-590.
- Varrelmann, M. & Maiss, E. (2000). Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J.Gen.Virol.*, 81, 567-576.
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1988). Nucleotide sequence of Beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Res.*, 16, 9917-9932.
- Veidt, I., Bouzoubaa, S.E., Leiser, R.M., Ziegler-Graff, V., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1992). Synthesis of full-length transcripts of Beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology*, 186, 192-200.
- Verchot, J., Koonin, E.V. & Carrington, J.C. (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology*, 185, 527-535.
- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M. & Hoekema, A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 17, 2362.
- Vincent, J.R., Lister, R.M. & Larkins, B.A. (1991). Nucleotide sequence analysis and genomic organization of the NY-RPV isolate of barley yellow dwarf virus. *J.Gen.Virol.*, 72, 2347-2355.
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.*, 17, 449-459.

- Voinnet, O., Pinto, Y.M. & Baulcombe, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 14147-14152.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.*, 33, 949-956.
- Waggoner, P.E. & Dimond, A.E. (1952). Crown Gall Suppression by Ionizing Radiation. *American J.Bot.*, 39, 679-684.
- Wang, H.H., Yu, H.H. & Wong, S.M. (2004). Mutation of Phe50 to Ser50 in the 126/183-kDa proteins of *Odontoglossum* ringspot virus abolishes virus replication but can be complemented and restored by exact reversion. *J.Gen.Virol.*, 85, 2447-2457.
- Wang, R.Y., Powell, G., Hardie, J. & Pirone, T.P. (1998). Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. *J.Gen.Virol.*, 79, 1519-1524.
- Wang, S., Browning, K.S. & Miller, W.A. (1997). A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO J.*, 16, 4107-4116.
- Ward, C.W. & Shukla, D.D. (1991). Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology*, 32, 269-296.
- Watson, M.A. (1940). Studies on the transmission of sugar Beet yellows virus by the aphid *Myzus persicae* Sulz. *Proc.Roy.Soc.B*, 128, 535.
- Watson, M.A. (1951). Beet yellows virus and other yellowing virus diseases of sugar beet. *Rep.Rothamst.Exp.Sta. for 1951*, 157-167.
- Weidemann, H.L. & Maiss, E. (1996). Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of Potato virus Y (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *J. Plant Dis.Prot.*, 103, 337-345.
- Westwood, F., Bean, K.M., Dewar, A.M., Bromilow, R.H. & Chamberlain, K. (1998). Movement and persistence of (¹⁴C) imidacloprid in sugar-beet plants following application to pelleted sugar-beet seed. *Pesticide Science*, 52, 97-103.

- Wilkins, M.R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F. & Appel, R.D. (1997). Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis*, 18, 403-408.
- Williams, I.S., Kift, N.B., Dixon, A.F. G. & Dewar, A.M. (1997). The resistance of sugar beet to aphids. In: *Proc. 60th IIRB Congr.*, Cambridge, 595-599.
- Wisler, G.C. & Duffus, J.E. (2000). A century of plant virus management in the Salinas valley of California, 'East of Eden'. *Virus Res.*, 71, 161-169.
- Wisler, G.C., Purcifull, D.E. & Hiebert, E. (1995). Characterization of the P1 protein and coding region of the zucchini yellow mosaic virus. *J.Gen.Virol.*, 76, 37-45.
- Wobus, C.E., Skaf, J.S., Schultz, M.H. & de Zoeten, G.A. (1998). Sequencing, genomic localization and initial characterization of the VPg of pea enation mosaic enamovirus. *J.Gen.Virol.*, 79, 2023-2025.
- Wolters, A.M. & Visser, R.G. (2000). Gene silencing in potato: allelic differences and effect of ploidy. *Plant Mol.Biol.*, 43, 377-386.
- Yamaya, J., Yoshioka, M., Meshi, T., Okada, Y. & Ohno, T. (1988). Expression of tobacco mosaic virus RNA in transgenic plants. *Mol.Gen.Genet.*, 211, 520-525.
- Yang, L.J., Hidaka, M., Masaki, H. & Uozumi, T. (1998). Detection of Potato virus Y P1 protein in infected cells and analysis of its cleavage site. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 62, 380-382.
- Yelverton, E., Lindsley, D., Yamauchi, P. & Gallant, J.A. (1994). The function of a ribosomal frameshifting signal from human immunodeficiency virus-1 in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.*, 11, 303-313.
- Young, M.J., Kelly, L., Larkin, P.J., Waterhouse, P.M. & Gerlach, W.L. (1991). Infectious in vitro transcripts from a cloned cDNA of barley yellow dwarf virus. *Virology*, 180, 372-379.
- Zagorskaya, A.A., Deineko, E.V., Sidorchuck, Y.V. & Shumnyi, V.K. (2001). Inheritance of Altered Flower Morphology and Kanamycin-Resistance in Transgenic Tobacco Plants. *Russian Journal of Genetics*, 37, 643-648.

Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, D., Simonis, M.-T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1996). The coat protein of Beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 9, 501-510.

Zupan, J., Ward, D. & Zambryski, P. (2002). Inter-kingdom DNA transfer decoded. *Nat.Biotechnol.*, 20, 129-131.

9 Anhang

9.1 Nukleotidsequenzen von BMVY-IPP und BChV-IPP

```

1      ACAAAAGAAA CCAGCGAGGA TCTAGCAGTC GATGCAATTT CAACTCAAAA CAAATAGTTT CACTTGTTCG TTGAACCGAC
b                                     ORF0 M Q F Q L K T N S F T C S L N R P
81     CGCTAACAGC TACAGAGCGA GTTTGCAACA CCGCGTATTT TCTCACGCAT CATCTACCGC TCATAACTTT CGAGAATGAA
b      L T A T E R V C N T A Y F L T H H L P L I T F E N E
c                                     ORF1 M K
161    AACTGCATTC GTTCTCTTCT CGCTGCTCTG CCTTTGCTGC TTAGTAAGCA GCTCGACCCT GGGAGCCTCG TTTACTACTCC
b      N C I R S L L A A L P L L L S K Q L D P G S L V Y T P
c      T A F V L F S L L C L C C L V S S S T L G A S F T L P
241    CGGGAAACGC CAGTCTTTAC GACTGGCCCG GTTCTACAAC TACTGCGGAA CCGCTTTGCC CAGCACTCGC AACGTTGACT
b      G K R Q S L R L A R F Y N Y C G T A L P S T R N V D L
c      G N A S L Y D W P G S T T T A E P L C P A L A T L T
321    TACGAGTGCC CCCCAGAAAA GACGTTAAAA GATTTTACCT TGCCCGAAAT TCAGGCAGAA ATCTGGGGGA GAGGCTACAA
b      R V P P R K D V K R F Y L A R N S G R N L G E R L Q
c      Y E C P P E K T L K D F T L P E I Q A E I W G R G Y N
401    CGCCGTGGAG AAATTTTCTT TCACGGTGAA GCAGAGTTTA AAAAGTTCCT TTCAGTATGG TGTGCTGAAA GCGAAAGAAA
b      R R G E I F F H G E A E F K K F L S V W C A E S E R K
c      A V E K F S F T V K Q S L K S S F Q Y G V L K A K E N
481    ATTACGGGAG AGCCCTAAGA TCAACATTAA AATGGATCGT ATTATTATGG TCTTACGTGA TATGGGCACT CTCTGCACC
b      L R E S P K I N I K M D R I I M V L R D M G T L L H R
c      Y G R A L R S T L K W I V L L W S Y V I W A L S C T
561    GCCTGGTATT TGTGAAGAA CTATACCATA GAAACTACTA TGCTGAGCTC GCTTTTTGCG TTCACCACCT TTTTGGTGAA
b      L V F V E E L Y H R N T Y A E L A F C V H H L F G E
c      A W Y L L K N Y T I E I L M L S S L F A F T T F L V K
641    GCTCGCGGTA TGGATTTTGG GCGGTTGGCT AACTTCCCTG GTAATGAGTT TATTTGCTCT CACGAAACGT ATCTTGA AAA
b      A R G M D F W R L A N F P G K W F I C S H E T Y L E N
c      L A V W I F G G W L T S L V N G L F A L T K R I L K T
721    CTCCTTCATC CAGAAAGAGC TACGTTTGTG AGCGCTCTGT AGAAGGTTTT CTCACCTTTA CCATCAAGCA AAGCCCGCCG
b      S F I Q K E L R L *
c      L S S R K S Y V C E R S V E G F L T F T I K Q S P P
801    CGTAATTGCA TTCTTCAAA ACAACATGCA GACGGTTCCC ATGCCGGTTA TGCAACATGC GTAACCTTAT TCGACGGGAC
b      R N C I L Q I Q H A D G S H A G Y A T C V T L F D G T
c
881    TAACGGATTG TTAGTGC GC AACACGTAGT TGACGATTTT TACGAAGGAG ACCCGAAAA GACTCTAAAA GTCGTCTCCA
b      N G L L T A Q H V V D D F Y E G D P K K T L K V V S T
c
961    CCCGCAATGG AAACAAAATC CCCCTGATG AATTCAGAGT GACGTACACA TCTGAGAAAA GGGATCAATT GTTGATGCAT
b      R N G N K I P L D E F R V T Y T S E K R D Q L L M H
c
1041   GGGCCCCCAA ACTGGGAAGG AGTTCTTGCC TGTAAGGCAG TTCACATGAT TCCGGCATCG AGTGTTCGAA AATCGAAAGC
b      G P P N W E G V L A C K A V H M I P A S S V A K S K A
c
1121   AACTTTCTTT GCTCTGTCGG ATGGTGAATG GCATTCTCTT AATGCCGAGC TCGTTGGCAC ATCCAAGTGC GGAAATTC A
b      T F F A L S D G E W H S S N A E L V G T S K C G K F I
c
1201   TTTCTGTACT CAGTGACACA AAGAGTGGTC ATTCAGGCAC TCCCTATTTT AATGGTAAGA GTGTTCTTGG AGTTCACATA
b      S V L S D T K S G H S G T P Y F N G K S V L G V H I
c      putatives Protease Motiv
1281   GGTCTCCCGA AAGAATTTGA GTCAGAAAAT GTGAATTACA TGCTCTCTAT ACCACGTTTT CCTGGATTAA CCAGCCCGAA
b      G S P K E F E S E N V N Y M S P I P R F P G L T S P N
c
1361   CTACATATTT GAAACCACAG CCCTTGCTGG AAAATTTTTT AGTCAAGAGG AAGTCGAAGA GCTAATGGAA GATTTCTCTC
b      Y I F E T T A L A G K F F S Q E E V E E L M E D F S L
c      Start putatives VPg
1441   TCCAAGAGAT TTATTCTATA GCGACGGCAC GTGGGAAGTA TATAAAATAT GAGGCTTGTC CAGATGAAGA GACATTTTCA
b      Q E I Y S I A T A R G K Y I K Y E A C P D E E T F H
c
1521   GATGTGCTAA CAGATCCCTC CCCGATGCAG GGGGAAGGAA GGGCGGCTCC GACCCCGGGA ACAACCGGAA ACGCAAGC A
b      D V L T E S S P M Q G E G R A A P T A G T T G N A S T
c      ORF2 C A N R V L P D A G G R K G G S D R R N N R K R K H

```

Abbildung 9.1 (Fortsetzung)

```

1601 CCACGAGAGA TCCGCAGGAA ATGGAAAAAG CCCTCGTGCT GCTCCTTCTA CACCGCGGGA ACCTCGGTG AAAACTGCAC
c H E R S A G N G K S P R A A P S T P R E P S V K T A P
b P R E I R R K W K K P S C C S F Y T A G T L G E N C T

1681 CGCAAGCCAC GTACATTGCA CCTCAAAAAGA GGAATATGAC GAATGGCCGA GATGCTGGTG CCAAATTGCA GGCCACGACT
c Q A T Y I A P Q K R N M T N G R D A G A K L Q A T T
b A S H V H C T S K E E Y D E W P R C W C Q I A G H D C

1761 GCCACTACCG ATCAAATCTC AGAGATAAAG AAGGCTCTGA TAGACAAAAT GGATTGAAA TCGATCGAGA GACAAGTGGT
c A T T D Q I S E I K K A L I D K M D L K S I E R Q V V
b H Y R S N L R D K E G S D R Q N G F E I D R E T S G

1841 AGAGACACTA TCGTCGATGG CCATGAAGAA GCCCCGCTCA AGAGGGCGGA GAAGATCCAA GAACAAGCAA AACAAATTGG
c E T L S S M A M K K P R S R G R R R S K N K Q N N L D
b R D T I V D G H E E A P L K R A E K I Q E Q A K Q F G

1921 ATGCTTCTTC AAAACCCAGT ACCACTGGGA AAGAGCCGCA GAAGTCTGCC CCGGTTTCAT CAAAGTCGGT GAGCTCCCA
c A S S K P S T T G K E P Q K S A P V S S K S V S S P
b C F F K T Q Y H W E R A A E V C P G F I K V G E L P K

2001 AGTTTACTT CTCTAAACAA AAAGGATGCT CGGATTGGGG CACGAAGCTC ACCAGCCTCC ACCCAGAATT GGAGGAGAAA
c S F T S L N K K D A R I G A R S S P A S T Q N W R R K
b F Y F S K Q K G C S D W G T K L T S L H P E L E E K

2081 ACCCGAGGCT TCGGGTGGCC CAAGTTCGGG CCAGCGGCGG AATTGAAATC CTTGCGGCTA CAAGCCGCAA GATGGCTCGA
c P E A S G G P S S G Q R R N *
b T R G F G W P K F G P A A E L K S L R L Q A A R W L E

2161 ACGCGCCGAG CAAGTTAAAA TCCTTCGAC TGAGAAAGG GAGCGCGTCA TAGAGAAATG TGTGGAAGCA TTCTCGCCTA
b R A E Q V K I P S T E E R E R V I E K C V E A F S P T

2241 CTCAAACACG AGGTCCCATG GCCACAAGAG GAAGCAAAT GTCTTGAAC AATTCCTTG AAGATTTAA AACGGCAGTC
b Q T R G P M A T R G S K L S W N N F L E D F K T A V

2321 TTCTCTTAG AGCTCGAAGC CGGCGTAGGC GTCCCGTATG TTGCTTACGG TCGACGCACG CATAGAGGCT GGATTGAAGA
b F S L E L E A G V G V P Y V A Y G R R T H R G W I E D

2401 TCCAGATCTG TTGCCGTTT TAGCTCGTTT CACCTTTGAT CGATTACAGA AGTTATCGGA GCGGAAATTT GAGCATATGA
b P D L L P V L A R F T F D R L Q K L S E A K F E H M S

2481 GCCCTGAACA ACTGGTTCAG GAAGGCCTGT GTGACCCAAT ACGGTTATTC GTAAAAGGCG AGCCACACAA ACAATCCAAA
b P E Q L V Q E G L C D P I R L F V K G E P H K Q S K

2561 CTTGATGAGG GACGCTACCG CCTCATCATG AGTGTCTCAT TGGTTGATCA ACTGGTAGCC CGGGTTCTGT TTCAAATCA
b L D E G R Y R L I M S V S L V D Q L V A R V L F Q N Q

2641 GAACAAGCGC GAGATTGCGC TCTGGAGGGC GATTCCCTCA AAACCCGGTT TCGGATTGTC CACGGACGGA CAAGTCGTCG
b N K R E I A L W R A I P S K P G F G L S T D G Q V V D

2721 ATTCATGCA AGCATTATCG GCGCAGGTGG GAGTGAATAC TGCTGAATTA CTCCAAGATT GGAATCCCA CCTCATTCTC
b F M Q A L S A Q V G V N T A E L L Q D W K S H L I P

2801 ACAGATTGCT CCGGTTTTGA CTGGAGCGTT TCGGACTGGC TTCTAGAAGA TGAAATGGAA GTTCGAAACA GGCTCACGTT
b T D C S G F D W S V S D W L L E D E M E V R N R L T L

2881 GGATATAAAT GATCTAACCA GGCGATTGCG AGCTGGATGG CTTAAATGCC TCGCAAACAG CGTCCCTCTGT TTATCAGATG
b D I N D L T R R L R A G W L K C L A N S V L C L S D G

2961 GAACATTGCT CTCGCAGCAA GTACCTGGTG TGCAAAAGAG TGGCAGCTAC AACACCTCCT CGTCTAATTC TAGAATTCGA
b T L L S Q Q V P G V Q K S G S Y N T S S S N S R I R
RdRp-Motiv

3041 GTGATGGCTG CTTACCACTC CGGAGCCTCC TGGGCCATCG CCATGGGTGA TGATGCCCTT GAATCTGTAG ATGCAGACCT
b V M A A Y H S G A S W A I A M G D D A L E S V D A D A L

3121 AAGTCGATAC TCATCCTTAG GTTTCAAAGT CGAGGTTTCT TCACAACCTGG AATTCCTGCTC TCATATTTTT GAGGAGGAGA
b S R Y S S L G F K V E V S S Q L E F C S H I F E E E N

3201 ACCTCGCCGT TCCGGTCAAC AAAGCTAAAA TGCTTTATAA ATTGATACAT GGGTACGAAC CGGAATGTGG CAACTTAGAA
b L A V P V N K A K M L Y K L I H G Y E P E C G N L E

```

Abbildung 9.1 (Fortsetzung)

3281 GTTCTGACGA ATTATCTTGC GGCTTGTTC TCAATCTTGA ACGAGCTGAG ATCTGATCCA GAACTCGTTG CCCCCCTCTA
b V L T N Y L A A C F S I L N E L R S D P E L V A P L Y

3361 TCAGTGGCTG GTCCTTCAG TGCAGCCACA AAAGATATAA CGAGGGATAA CATAAACAGC CGGGTAAACA TCAGTTGCAA
b Q W L V L P V Q P Q K I *

3441 ACGCCGGAAG TTTAAAGTCT GATTACATAA CAAGCCAAAA TAGATTTCAA GTTTTTCAGCA GGATTTTCAA GTGGTCTATT

3521 GTCAGCAATA CCTGTAACGG TAATTGGCTT GTACTTCGTC TACCTGAAGA TTTCCACCA CGTTAGATCA ATCGTTAATG
a ORF3/5 M

3601 AATACGGTCG TGGGTAGGAG AACAAATCAAT GGAAGAAGAC GACCACGTAG GCAAACGCGA CGCGCTCAGC GCTCTCAGCC
a N T V V G R R T I N G R R R P R R Q T R R A Q R S Q P
b ORF4 M E E D D H V G K R D A L S A L S Q

3681 AGTGGTTGTG GTCCAAGCCT CTCGGACAAC ACAACGCCGA CCTCGACGAC GACGAAGAGG CAATAACCGG ACAAGAAGAA
a V V V V Q A S R T T Q R R P R R R R R G N N R T R R T
b W L W S K P L G Q H N A D L D D D E E A I T G Q E E

3761 CTGTTTCTAC CAGAGGAACA GGTTCGAGCG AGACATTGT TTTCTCAAAA GACAATCTCG CGGGAAGTTC CAGCGGATCA
a V S T R G T G S S E T F V F S K D N L A G S S S G S
b L F L P E E Q V R A R H L F S Q K T I S R E V P A D Q

3841 ATCACGTTTCG GGCCGAGTCT ATCAGACTGC CCGGCATTTCG CTGATGGAAT GCTCAAGGCC TACCATGAGT ATAAAATCTC
a I T F G P S L S D C P A F A D G M L K A Y H E Y K I S
b S R S G R V Y Q T A R H S L M E C S R P T M S I K S Q

3921 AATGGTCATT TTGGAGTTCG TCTCCGAAGC CTCTTCCCAA AATTCCGGTT CCATCGCTTA CGAGCTGGAC CCACACTGTA
a M V I L E F V S E A S S Q N S G S I A Y E L D P H C K
b W S F W S S S P K P L P K I P V P S L T S W T H T V

4001 AACTCAGTGC CCTTTCATCA ACTATCAACA AGTTCGGGAT TACAAAGCCC GGGAGGAGGG CATTACAGC GTCTTACATC
a L S A L S S T I N K F S G I T K P G R R A F T A S Y I
b N S V P F H Q L S T S S G L Q S P G G G H L Q R L T S

4081 AACGGGACGG ACTGGCACGA CGTTGCCAAG GACCAATCA GGATCCTCTA CAAAGGCAAT GGTCTTTCAT CGATAGCTGG
a N G T D W H D V A K D Q F R I L Y K G N G S S S I A G
b T G R T G T T L P R T N S G S S T K A M V L H R *
leaky UAG

4161 TTCTTTTAGA ATCACCATGA AGTGTCAAGT CCACAATCCC AAATAGGTAG ACAAGGAACC CGGCCCTAGC CCAGGGCCTT
a S F R I T M K C Q F H N P K * V D K E P G P S P G P S

4241 CTCCCTCTCC ACAACCCACA CCCTCAAAGA AATATCGTTC CATCGTCTAT ACTGGGTGCC CAGTGACCCG TATAATGGCC
a P S P Q P T P S K K Y R F I V Y T G V P V T R I M A

4321 CAATCTACTG ACGACGCCAT TTCTCTGTAC GACATGCCCT TACAGCGGTT TCGCTACATA GAAGACGAGA ATATGAACTG
a Q S T D D A I S L Y D M P L Q R F R Y I E D E N M N W

4401 GACGAACCTC GATTCTCGAT GGTATTCCCA GAATCTTTG AAAGCCATCC CAATGATAAT AGTACCAGTC CCTCAAGGTG
a T N L D S R W Y S Q N S L K A I P M I I V P V P Q G E

4481 AGTGGACTGT GGAAATTCG ATGGAGGGGT ATCAACCAAC CTCAAGCACT ACAGATCCTA ATAAGGACAA ACAAGATGGT
a W T V E I S M E G Y Q P T S S T T D P N K D K Q D G

4561 CTCATTGCAT ACAATGATGA CCTCAAGGAG GGTTCGGAATG TGGGGGTTTA TAACAATGTG GAGATAACCA ATAATAAGGC
a L I A Y N D D L K E G W N V G V Y N N V E I T N N K A

4641 CGATAATACT TTGAAGTACG GCCATCCAGA CATGGAGCTC AATAGTTGTC ATTTCAATCA AGGACAATGT TTGGAAAGAG
a D N T L K Y G H P D M E L N S C H F N Q G Q C L E R D

4721 ATGGAGATTG GACTTGTAC GTTAGAACAA CTGGTGACAA CGCCTCCTTC TTTATTGTTG GTCCCGCTGT CCAGAAGCAA
a G D L T C H V R T T G D N A S F F I V G P A V Q K Q

4801 TCCAAATACA ATTATGCCGT TTCATACGGA GCTTGGACAG ATCGGATGAT GGAGATAGGG ATGATAGCCA TAGCACTTGA
a S K Y N Y A V S Y G A W T D R M M E I G M I A I A L D

Abbildung 9.1 (Fortsetzung)

```

4881   TGAACAAGGC TCATCCGGTT CCGCAAAGAT AGAAAGACCA AAGAGAGTCG GGCACCTCCAT GGCAGTCTCA ACCTGGGAGA
a     E Q G S S G S A K I E R P K R V G H S M A V S T W E T

4961   CTATAAAGCT ACCGGAGAAG GAAAAGCTCG AGGAATTCAA AACCGATCAA AGACAAGATC TCAAAAGCTCC TCCCGCAGCT
a     I N L P E K E N S E E F K T D Q R Q D L K T P P A A

5041   GCGGGGAGTT CCGATATGCT GGATATCGTT CAAGGAGGCT TACCCCTTCC TGTGGAAGAA GACATCCCTG ATTCTATCAT
a     G G S S D M L D I V Q G G L P L P V E E D I P D S I M

5121   GGATGACCCT TGGTCCAATA TACCGGCCAA GAGTTCGAG GAAGGTGAGG CTATGACATC AAAGAGCGGT TTTAAACCCC
a     D D P W S N I P A K S S Q E G E A M T S K S G F K P Q

5201   AATTGAAGCC TCCTGGCCTG CCGAAACCAC AACCGGTTAG GACGATCCGA AATTTGATC CAAAACCGGA CTTAGTTGAG
a     L K P P G L P K P Q P V R T I R N F D P K P D L V E

5281   GCATGGCGAC CCGACGTGAA CCCCAGGATAT TCCAAGAAG ATGTGGCAGC GGCCACTGTC ATGTACGGGG GTTCCGTTAA
a     A W R P D V N P G Y S K E D V A A A T V M Y G G S V K

5361   AGAAGGCCGA TCTATGATTG ACAAGCGTGA TAAAGCTGTG TTAGACGGCC GCAAGAGTTG GGGTCTTCC TTAGCGTCTC
a     E G R S M I D K R D K A V L D G R K S W G S S L A S S

5441   CCTTAACGGG AGGAACGCTT AAGGCCTCTG CAAAGTCAGA GAAGCTTGCC AAAGTCACTT CGAGTGAAAG GCGCAATTC
a     L T G G T L K A S A K S E K L A K L T S S E R A Q F

5521   GAACGAATTA AGCGCCAGCA AGGTGCCACA CGAGCTTCAG AGTTCTTAGA ACAACTTCTG GCTGGCACAA ACCCTGACCC
a     E R I K R Q Q G A T R A S E F L E Q L L A G T N P D P

5601   AAGTTCTGA TGAACCTTTC CAAATCATCA CAGTCAAGCC CGTGACTTTA AACGTGGAAC GACTCCGAAA GGATAGGCAA
a     R F *

5681   CGAGTGTTTT ACGCTGGGAT AACTCCCTAC GGCACTTCGG TGT 5723

```

Abbildung 9.1: Die komplette Nukleotidsequenz des BMVYV-IPP als DNA mit Angabe der Leserahmen, konservierter Bereiche und Motive (unterstrichen oder beschriftet) aus L189.

Tabelle 9.1: Berechnung des relativen Molekulargewichts (M_r) der durch BMVYV-IPP kodierten putativen Proteine mit dem Programm PEPTIDEMASS (Wilkins *et al.*, 1997).

BMVYV-IPP Protein	M_r in kDa
P0	28,24
P1	72,01
P1/2	121,67
P3	22,57
P3/5	74,15
P4	19,47

Abbildung 9.2

```

1   ACAAAAGAAT AGCAGGAGGA CAGCGAATGA ACTTTGAGAT TTGTTTCAAA ACGAACAGCG AATTACTAGT GACCAGCGAA
c                                     ORF0 M N F E I C F K T N S E L L V T S E

81  AGATACTTGC CGCTAAAAGA GAGATCATTG ATAATTGGAA GATTTCTTAC GCAAATCCCC CAACTTTTGC ACCATTTCAA
c   R Y L P L K E R S F I I G R F L T Q I P Q L L H H F K

161 ATATGGTCAC CAAGTTGAAC AGTTCTTACG CTCTATTCTT TTTGAGCTCC CTAATCTTAT TTGGAGCTCT TGGGACCATG
c   Y G H Q V E Q F L R S I L F Q L P N L I W S S W D H G
a ORF1 M V T K L N S S Y A L F F F S S L I L F G A L G T M

241 GCACCATCTT ATATGGTGAC AGGCCCTTTA CACGCGCCGA AGATCTCCTC AGATTTTCCC TTACCACCGG ATATTACCCA
c   T I L Y G D R P F T R A E D L L R F S L T T G Y Y P
a   A P S Y M V T G P L H A P K I S S D F P L P P D I T Q

321 ACTCCTACTA GCACAGGACT CCGCGTGGGA CTGCCCTCTT CAGAAAAGGC TGTCAGATTA CAGCTACAAA GAACTTGTAA
c   T P T S T G L R V G L P S S E K A V R L Q L Q R T C N
a   L L L A Q D S A W D C P L Q K R L S D Y S Y K E L V I

401 TACACGTCTT GCAAAGAGGC TACAACGACA CCCAGAAATA CTGCCACAAA CTAGCATCAA TGGATTTCGG AAAGCACTGG
c   T R L A K R L Q R H P E I L A T T S I N G F R K A L G
a   H V L Q R G Y N D T Q K Y L P Q L A S M D F G K H W

481 GATACCATCT CAGGACAATT TACAGGATTG AATATCTGG AAAGATTGAT GTGGGGCCTC ATACGGTTAT GGGGTTATGT
c   Y H L R T I Y R I E Y P G K I D V G P H T V M G L C
a   D T I S G Q F T G L N I L E R L M W G L I R L W G Y V

561 GATCTGGGTT GTCAGCTCAT CCACGATGGG TTTCTTGATG AACAACTTGA GCTTAGCTAT AATAGTGGCC TCATTGATGG
c   D L G C Q L I H D G F L D E Q L E L S Y N S G L I D G
a   I W V V S S S T M G F L M N N L S L A I I V A S L M A

641 CTTTAAGCGT GCTTATGGCA CGGCAGCTC AATTATCTT CAAAATATTA CAACTATGCC TGCCTGTGTT GCGGCAAGA
c   F K R A Y G T G S S I I L Q N I T T M P A C V G G K N
a   L S V L M A R A A Q L F F K I L Q L C L P V L A A R

721 ATGGTGATGG GCGCGTTCAT CACGATGAAG AGAGTTTGA TAGAGAGACC TAAATCCTAT GTAAAAGAGT GTGCAGTCCG
c   G D G R V H H D E E S L H R E T *
a   M V M G A F I T M K R V C I E R P K S Y V K E C A V R

801 GGGGTTTACT ACATGGGCTG TACCAATGAA ACCCCCAAAA AGTTCGATTT TGCTCATAAG TCATGACGAC GTTTACACG
a   G F T T W A V P M K P P K S S I L L I S H D D G S H A

881 CAGGTTATGC AACTTGTGTG ACTCTACAG ACAGGCAATC AACCACTATF GGTTTGATAA CCTGCTCGCA TGCTCCCATC
a   G Y A T C V T L H D R Q S T T I G L I T C S H A P I

961 AATGGGAGTG TTTTCTCAAC CGTCACTGGC AATAAGATCA AAATGGAGAG TTTTAAAAC TCTATGATG ACGCTGAAAC
a   N G S V F S T V T G N K I K M E S F K T L Y D D A E T

1041 AGATGTAAG ATCTTATTCG GCCCACCCAA TTGGGAAAGC GTCATGGGAT GCAAAGCCTT AAAACTTACC ACCAGAGACA
a   D V K I L F G P P N W E S V M G C K A L K L T T R D S

1121 GCTTGGCGAA GGGGCCAGCC ACCATTTACA CTTTTGGTGA TAATGGATGG ACCTCTTAC AAGCCTCGAT TGTTGGCGCA
a   L A K G P A T I Y T F G D N G W T S S Q A S I V G A

1201 TACGATAAAA ACAAAGCATC CGTACTGAGC ATAACCGATA AAGGGCACAG TGGAGCCCCG TACATTAGTG GCAAAAACGT
a   Y D K N K A S V L S I T D K G H S G A P Y I S G K N V
                               putatives Protease-Motiv

1281 CATAGGAATC CACTCAGGAG GAGACGTCGT AGACAATGTG AATGTTTGT CTACGATTCC AAAGATTGTA AATCTTACAA
a   I G I H S G G D V V D N V N V C S T I P K I V N L T T

1361 CCCCTCGACT AGTCTTCGAG ACCACAGCCC CGCAAGGGAG ATTATTCTC GAGAAAGAAA TGGATGACCT GCTCGAATAC
a   P R L V F E T T A P Q G R L F L E K E M D D L L E Y
                               Start putatives VPg

1441 GACTGGTCAG GCCAAGAGGC TCGCGCTATA GTCAAAGAAA GATTTGAGCG CGGTTTATAT GAGGGCAAAG GAGTAAAGTC
a   D W S G Q E A R A I V K E R F E R G L Y E G K G V K S
                               "shifty" Heptanukleotid

1521 TTACGACTTT GAAACTACCA GTGATAATGT CTCCTATCCT ATTGTCCCC CGCATCTGCC GGGAAATGGA CTGAGCGCGG
a   Y D F E T T S D N V S Y P I V P P H L P G N G L S G A
c                                     ORF2 C L L S Y C P P A S A G K W T E R R

```

Abbildung 9.2 (Fortsetzung)

1601 CCGACCGCCA AACAAACGGC ACCCTCGAAA GCATCCAAAG TCAAATGCC CTTGTGGAG ATTCTCAAG GCACGATCTT
a D R Q T T G T L E S I Q S Q M P A C G D S S R H D L
c R P P N N R H P R K H P K S N A R L W R F L K A R S C

1681 GCTGCGACTC AGCCAAATTT CACACCCACA ACGCAGGTGG CTGGAACACA GATGACACCA AACCAAGGTG TTTCTGTGAT
a A A T Q P N F T P T T Q V A G T Q M T P N Q G V S V M
c C D S A K F H T H N A G G W N T D D T K P R C F C D

1761 GACCCAAGCC ACACCGAGTG CACCTTCGGT TCCAAGTACC GAAGTGGAAC TAATGGGCCT TCTATTAAAC CGAATAAATC
a T Q A T P S A P S V P S T E V E L M G L L L N R I N L
c D P S H T E C T F G S K Y R S G T N G P S I K P N K S

1841 TCGAGAATAT AGAAGAGAAA GTGACTGGAC TGATAGCGAA AAACGTGCAG AAGCTATCAA GGCCAGGCG AAGGAATTTG
a E N I E E K V T G L I A K N V Q K L S R P R R R N L
c R E Y R R E S D W T D S E K R A E A I K A Q A K E F G

1921 GAAAATTTTC CGAGGGTCAA TACAGTGGG GCATGGGTCC CACCATACAG GAGATCCGTG GGTTCGAAGA AGTCGGATCC
a E N F P R V N T G G A W V P P Y R R S V G S K K S D P
c K F S E G Q Y R W G M G P T I Q E I R G F E E V G S

2001 CTCCCCAAT TCTACCACTC AAAACAAGA CTCAAATTCGG AATACGGAGT TAGAGTGGCG AAAGAGCACA GTGAGCTCGA
a S P N S T T Q N K D S I R N T E L E W R K S T V S S K
c L P K F Y H S K Q R L N S E Y G V R V A K E H S E L E

2081 AGAACTCACA ACAGGATTTG GGTGGTCCAA GTTCGGTGCC CAAGCTGAAC TAACCTCCCT GCGACTGCAG GCTGACAGGT
a N S Q Q D L G G P S S V P K L N *
c E L T T G F G W S K F G A Q A E L T S L R L Q A D R W

2161 GGCTCCAACG GATGGAGTCC GCACAAATAC CCTCGCAGAA GGCGAGGGAA TCCGTTATAA ACAGGCTTAT TGAAGCCTAT
c L Q R M E S A Q I P S Q K A R E S V I N R L I E A Y

2241 AGTTGTGCGC GCACCAACGC GCCAACATCA ACCACCGCGC ATTCCCTAAC GTGGGAAGGT TTCATTGAAG ACTTTAAGGA
c S C A R T N A P T S T T G D S L T W E G F I E D F K E

2321 AGCTGTGAGC TCCTTAGAAT TGGAGCCCGG TGTGGGGTTC CCATACATTC CTTATGGGAC TCGAACCCAT AGAGACTGGG
c A V S S L E L D A G V G V P Y I A Y G T R T H R D W V

2401 TGTTCAACCA AGAGTTGCTA CCTGTGTTGA CTCGACTGAC TTTCAACCGC CTACAGAAGA TGTTGGAAGT CAACTCAGAC
c F N Q E L L P V L T R L T F N R L Q K M L E V N S D

2481 GACTTGAATG CGGAACAAC TGGTCAACAC GGACTTTGCG ACCCGATAAG GGTATTTGTT AAGGGAGAAC CCCACAAAGT
c D L N A E Q L V Q H G L C D P I R V F V K G E P H K V

2561 CTCTAAGCTG GAAGAAGGTC GCTACCGCCT TATAATGAGT GTATCCCTAG TGGATCAGTT GGTAGCCAGA GTTCTGTCTC
c S K L E E G R Y R L I M S V S L V D Q L V A R V L F Q

2641 AAAACCAGAA CAAACGAGAA ATAGAATCTT GGAGGGCAGT GCCCTCGAAG CCGGGATTG GTTTATCGAC CGATGACCAG
c N Q N K R E I E L W R A V P S K P G F G L S T D D Q

2721 ATCGAAGACT TCGTTAAAGT CTTGGCTTCA CAACTTGGTG AGGAACCACA AGAAGTTTTC AATAACTGGT CCACCAAGTT
c I E D F V K V L A S Q L G E E P Q E V F N N W S T K L

2801 GATACCAACA GATTGCTCCG GCTTTGACTG GAGTGTAGCG GACTGGATGC TCGAAGATGA CATGGAAGTC CGCAATCGCT
c I P T D C S G F D W S V A D W M L E D D M E V R N R L

2881 TGACCAGAAA CAACAACCAC ACAACAAAAC GATTACGATC GGTGTGGTTA AAATGCATAA GCAATTCAGT CTTGTGCCTT
c T R N N N H T T K R L R S V W L K C I S N S V L C L

2961 TCTGATGGGC GCCTTCTTTC ACAGAGAGTG CTGGAGTTC AGAAAAGTGG AAGTTACAAT ACTTCTCTTT CAACTCCCG
c S D G R L L S Q R V P G V Q K S G S Y N T S S S N S R
RdRp-Motiv

3041 CATCAGAGTT ATGGTGCAT ATCATTCGGG CGCTTCCTGG GCTATGGCGA TGGGCGATGA CGCCCTAGAA TCTGTTGACT
c I R V M A A Y H C G A S W A M A M G D D A L E S V D S

3121 CTAACCTAAC AGAGTATAAA AAGTTAGGTT TCAAAGTCGA GGTAGCCAAA CAACTGGAAT TTTGCTCACA TATCTTTAAG
c N L T E Y K K L G F K V E V A K Q L E F C S H I F K

3201 AATGAGCGCC TCGCATTACC GCTGAACATA AGGAAAATGC TTTACAAGCT AATTTACGGG TACAATCCCG ATAGCGGTAA
c N E R L A L P L N I R K M L Y K L I Y G Y N P D S G N

Abbildung 9.2 (Fortsetzung)

3281 CTTGGAAGCG ATCAAGAATT ACCTTGACGC TTGCCACTCG ATCGTGAATG AAATTCGTCA CGACGAGAGC TTGGTCCAGA
c L E A I K N Y L D A C H S I V N E I R H D E S L V Q K

3361 AAATAATATC GTGGTTGGTC ATTCCAGTCC AACCACAAAA CTAATTCAGG AGGATCAAGC ATATAAACAG CCGGGTAAAC
c I I S W L V I P V Q P Q N *

3441 ATCAGTTGCA AACACCGGAA GTTTTAGTCT GATTATGCAA CAAGCCAAAA TAGACTTCAA ATTTTATGCA GGATTTTCAA

3521 GCGGTCTATT GTCAGCAATA CCCGTAACGG TAATTTGGCTT GTATTTTGTG TACCTGAAAA TCTCCCAACA CGTAAGATCA

3601 ATAGTTAATG AATACGGTCG TGGGTAGGAG AACAAATCAAT GGAAGGAGAC GACCACGGAG GCAAACACGA CGCGCTCAGC
b ORF3/5 M N T V V G R R T I N G R R R P R R Q T R R A Q R
c ORF4 M E G D D H G G K H D A L S

3681 GCTCTCAGCC AGTGGTTGTG GTCCAAACCT CTCGGACAAC ACAACGCCGA CCTAGACGAC GACGAAGAGG TAACAACCGG
b S Q P V V V V Q T S R T T Q R R P R R R R G N N R
c A L S Q W L W S K P L G Q H N A D L D D D E E V T T G

3761 ACAAGAAGAA CTGCTTCTAC CAGAGGAGCA GGTCCAAGCG AAACATTTGT TTTCTCAGAA GACAATATCG CCGGAAGTTC
b T R R T A S T R G A G P S E T F V F S E D N I A G S S
c Q E E L L L P E E Q V Q A K H L F S Q K T I S R E V P

3841 CAGCGGAGCA ATCACGTTCC GGCCGAGTCT ATCAGACTGC CCGGCATTCT CTAATGGAAT GCTCAAGGCC TACCATGAGT
b S G A I T F G P S L S D C P A F S N G M L K A Y H E Y
c A E Q S R S G R V Y Q T A R H S L M E C S R P T M S

3921 ATAAAAATC GATGGTCATT TTGGAGTTCG TCTCCGAAAGC CTCTCCCAA AGTTCGGTT CCATCGCTTA CGAGCTGGAC
b K I S M V I L E F V S E A S S Q S S G S I A Y E L D
c I K S R W S F W S S S P K P L P K V P V P S L T S W T

4001 CCACACTGTA AACTCAATGC CCTTTCCTCA ACTATCAACA AATTCGGGAT CACGAAGCCC GGGAGGAGGA CGTTTACAGC
b P H C K L N A L S S T I N K F G I T K P G R R T F T A
c H T V N S M P F P Q L S T N S G S R S P G G G R L Q R

4081 GTCTTACATC AATGGAACGG AATGGCACAA CGTTGCCAAG GACCAATCA GGATCCTCTA CAAAGGCAAT GGTCTCTCGT
b S Y I N G T E W H N V A K D Q F R I L Y K G N G S S S
c L T S M E R N G T T L P R T N S G S S T K A M V L R
leaky UAG

4161 CGATAGCTGG TTCTTTCAGA ATCACTATAA AGTGCCAATT CCACAACCCC AAATAGGTAG ACGAGGAACC CGGCCCTAGC
b I A G S F R I T I K C Q F H N P K * V D E E P G P S
c R *

4241 CCAGGGCCTT CTCCTCTCC ACAACCCACA CCCCAAAGA AATACCGTTT TATCGTTTAT ACTGGTGTCC CTGTGACCCG
b P G P S P S P Q P T P Q K K Y R F I V Y T G V P V T R

4321 TATAATGGCT CAATCTACGG ACGATGCCAT CTCTTTGTAC GACATGCCGT CTCAACGGTT TCCTATATA GAGGACGAGA
b I M A Q S T D D A I S L Y D M P S Q R F R Y I E D E N

4401 ACATGAACTG GACGAACCTC GATTCTCGAT GGTATTCCCA GAATCTTTA AAAGCCATCC CCATGATAAT AGTACCAGTC
b M N W T N L D S R W Y S Q N S L K A I P M I I V P V

4481 CCTCAAGGCG AGTGGACTGT GAAATTTTCG ATGGAGGGGT ATCAACCAAC CTCAAGTACT ACAGATCCTA ACAAGGACAA
b P Q G E W T V E I S M E G Y Q P T S S T T D P N K D K

4561 ACAAGATGGT CTCATTGCAT ACAGTGATGA CCTCAAGGAA GGTGGAATG TGGGGGTTA TAACAATGTG GAGATAACCA
b Q D G L I A Y S D D L K E G W N V G V Y N N V E I T N

4641 ACAACAAGGC CGACAATACT TTGAAGTACG GCCATCCAGA CATGGAATC AACAGCTGTC GTTTTAAATCA AGGACAGTGT
b N K A D N T L K Y G H P D M E L N S C R F N Q G Q C

4721 CTGGAAGAG ATGGAGATT GACCTGCCAC GTCAAAACAA CTGGTGACAA CGCCTCCTTC TTCATTGTTA GTCCCCTGT
b L E R D G D L T C H V K T T G D N A S F F I V S P A V

4801 CCAAAGCAA TCCAAATATA ATTATGCCGT TTCATACGGG GCCTGGACAG ATCGGATGAT GGAGATAGGG ATGATAGCCA
b Q K Q S K Y N Y A V S Y G A W T D R M M E I G M I A I

4881 TAGCACTTGA TGAACAAGGC TCATCCGGTT CCGCAAAGAC AGAAAGACCA AAGAGAGTTG GGCCTCCAT GGCAGTCTCA
b A L D E Q G S S G S A K T E R P K R V G H S M A V S

4961 ACCTGGGAGA CTATAAACTT GCCGAGAAG GAAGACTCCG AGAAACTTAA AACCGGTCAA AGACAAGACC TTAAACTCC
b T W E T I N L P E K E D S E K L K T G Q R Q D L K T P

Abbildung 9.2 (Fortsetzung)

```

5041 TCTCACAATT GGTGAGAGTT CCGATATGAT GGGTATCGAT GAGAAAGGCT TGCCCCCTTCC TGCTGAAGAG GGTGTTCCCG
b L T I G E S S D M M G I D E K G L P L P A E E G V P D

5121 ATTTTGTGG GGTGACCCT TGTCCAAAG TGTCGATCAA GCAGTTGCAG GAAGAGGAGG CTATGACGTC TAAGAGTAGT
b F V G D D P W S K V S I K Q L Q E E E A M T S K S S

5201 CTTAGACCCC AGTTGAAGCC CCCTGGTCTG CCAAAACCAC AACCGGTTAG AACGATTACA GATTCAATC CAACGCCGGA
b L R P Q L K P P G L P K P Q P V R T I T D F N P T P D

5281 TTTGGTTGAA GCGTGGAGAC CCGATGTGAA CCCCAGATAT ACCAAGGAGG ATGTGGCAGC TGTCACGTGC CTCCAGGGGG
b L V E A W R P D V N P G Y T K E D V A A V T V L Q G G

5361 GTTCCATCAA AGACGCCCGG TCTATGATTG ACAAACGCGA TAAAGCTGTG TTAGACGGTC GCAAGCGTGG GGGTTCATCC
b S I K D G R S M I D K R D K A V L D G R K R W G S S

5441 TTGGCTTCTT CCTTAACAGG AGGAACGCTT AAGGTCTCCG CAAAGTCGGA GAAGTTTGCT CAACTCACCT CGAGTGAGAG
b L A S S L T G G T L K V S A K S E K F A Q L T S S E R

5521 GGCGAAATAT GAACAAATCA AACGCCAGCA GGGTTCCACA AGAGCCTCAG AATACTTAGA ATTTATTCTG GCTAGCATAA
b A K Y E Q I K R Q Q G S T R A S E Y L E F I L A S I N

5601 ATCCAACCCA AGGCTCTGGG ACATAGCCTA ATCCTTCCCG GTCCTGATGA ACCCATATAA ATCACCACCG TCAAGCCCGT
b P T Q G S G T *

5681 GACGTAAAC GAGGAACGAC TCCGCAAGGA TAGGCACGAG TGTTTCCTT AAAGGCTTAT ACAGTAGGAT CCTACGGCAC

5761 TTCGGTGT

```

Abbildung 9.2: Die komplette Nukleotidsequenz des BChV-IPP als DNA mit Angabe der Leserahmen, konservierter Bereiche und Motive (unterstrichen oder beschriftet) aus L362.

```

BChV-2a (5710) AAGGATAGGCA-CGAATGTTCCCTTATTTAAAGGTTATAACAGTAGGATCCTACGGCACTTCGGTGT
BChV-IPP (5706) AAGGATAGGCA-CGAGTGTTCCT----TAAAGGCTTATAACAGTAGGATCCTACGGCACTTCGGTGT
BChV-CR (5679) AAGGATAGGCAACGAGTGTACCCAT---TGCAGGTTACAGAAG-GACTCCTACGGCACTTCGGTGT
BMYV-2ITB (5668) AAGGATAGGCAACGAGTGTTTTAC-----GCTGGG----ATAA---CTCCTACGGCACTTCGGTGT
BMYV-IPP (5669) AAGGATAGGCAACGAGTGTTTTAC-----GCTGGG----ATAA---CTCCTACGGCACTTCGGTGT
BWYV-FL1 (5587) ACGGATAGGCAACGAGTGTTTTAC-----GCTGGG----AGAA---ATCCTACGGCACTTCGGTGT
CABYV (5606) AAGGATAGGCAACGAACGTTCCACG---TAGTGGAA-ACAGGGGATTCCCCCTGGCGTTTCGGTGT

```

Abbildung 9.3: Alignment der 3'-terminalen Nukleotidsequenzen als DNA von Poleroviren. Die 18 terminalen Nukleotide (unterstrichen) der Isolate BChV-2a und BChV-CR wurden von Hauser *et al.* (2002) nicht bestimmt, sondern von der Sequenz des BMYV-2ITB übernommen. Die 33 terminalen Nukleotide des BChV-IPP (unterstrichen) wurden von dem Isolat BChV-2a abgeleitet.

Tabelle 9.2: Berechnung des relativen Molekulargewichts (M_r) der durch BChV-IPP kodierten putativen Proteine mit dem Programm PEPTIDEMASS (Wilkins et al., 1997).

BChV-IPP Protein	M_r in kDa
P0	28,29
P1	71,86
P1/2	121,52
P3	22,57
P3/5	74,49
P4	19,47

9.2 Sequenzvergleiche

Die Aminosäuresequenzvergleiche wurden mit dem GAP Programm mit einer *gap penalty* von 8 und einer *extension penalty* von 2 berechnet (Huang, 1994).

Tabelle 9.3: Vergleich der putativen Aminosäuresequenzen der P1-P5 des BMYV-IPP mit entsprechenden Sequenzbereichen anderer Poleroviren.

	BMYV-2ITB	BChV-IPP	BWYV-FL1	CABYV	PLRV	CYDV
P0	91	24	26	41	22	21
P1	95	30	33	47	30	30
P2	98	57	57	66	55	56
P3	98	92	92	66	63	62
P4	93	88	93	41	40	39
P5	96	86	88	37	38	41

Aminosäuresequenz des P2 ab putativem Leserasterwechsel und des P5 ab Stopkodon des ORF3.

Tabelle 9.4: Vergleich der putativen Aminosäuresequenzen der P1-P5 des BChV-IPP mit entsprechenden Sequenzbereichen anderer Poleroviren.

	BChV-2a	BMVYV-IPP	BWYV-FL1	CABYV	PLRV	CYDV
P0	94	24	25	22	22	21
P1	94	30	30	32	27	26
P2	94	57	55	58	51	45
P3	94	92	92	65	61	62
P4	89	88	92	44	39	37
P5	88	86	85	37	38	37

Aminosäuresequenz des P2 ab putativem Leserasterwechsel und des P5 ab Stopkodon des ORF3.

Das FLAG Alignment der Nukleotidsequenzen des BMVYV-IPP und BChV-IPP wurde mit dem Programm FLAG Alignment Version 0.3 des Biomedical Engineering Center (BMEC) am Industrial Technology Research Institute (ITRI), Taiwan (<http://bioinformatics.itri.org.tw/prflag/prflag.php>) mit vorgegebenen Standard-Einstellungen durchgeführt.

Tabelle 9.5: Übersicht über die in den Sequenzvergleichen verwendeten Virussequenzen mit Angabe der GENBANK Accession Nummer.

Virusisolate	GENBANK Accession Nummer
BWYV-FL1	AF473561
CABYV	X76931
PLRV-Can	D13954
BChV-2a	AF352024
BMVYV-2ITB	X83110
CYDV-RPV	NC04751

Tabelle 9.6: Festgestelltes BMVY-Wirtspflanzenspektrum nach Agroinfection im Vergleich zu Wirtspflanzenspektra, von denen in verschiedenen Versuchen nach BMVY-Blattlausübertragungen berichtet wurde.

	BMVY _{IT} -Agroinfection	BMVY-IPP Blattlaus	Russel (1965), Symptome	Björling & Nilsson (1966), Symptome	Stevens <i>et al.</i> (1994), ELISA	Graichen & Rabenstein. (1996), ELISA	Mayo <i>et al.</i> (2000), ELISA	Hauser <i>et al.</i> (2002), ELISA
<u>Solanaceae</u>								
<i>N. benthamiana</i>	+	+				-	+	
<i>N. clevelandii</i>	+		-			-	+	
<i>N. tabacum</i> cv. 'Xanthi'	-		-					
<i>N. edwardsonii</i>	-							
<i>N. rustica</i>	-							
<i>N. glutinosa</i>	-							
<i>N. occidentalis</i>	-					-		
<u>Chenopodiaceae</u>								
<i>B. vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+		+
<i>C. capitatum</i>	-	-	-	+		+		-
<i>C. foliosum</i>	-		-	+				
<i>C. quinoa</i>	-		-	-				
<u>Brassicaceae</u>								
<i>C. bursa-pastoris</i>	+	+	+	+	+	+		+
<i>B. napus</i>	-			-	-	-		-
<u>Lamiaceae</u>								
<i>L. purpureum</i>	+				+			

bei freien Feldern wurden die entsprechende Pflanzenart nicht getestet.

+ = Wirtspflanze; - = keine Wirtspflanze.

9.3 Auflistung festgestellter Virustiter und statistische Auswertungen

9.3.1 Vergleich der BMYV_{fl}-transgenen Linien 220.01. und 220.02.13

Tabelle 9.7: Absorptionsmesswerte nach DAS-ELISA von Blattstielproben mit Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen.

	Linie 220.01 (n=9)		Linie 220.02.13 (n=10)	
Mittelwert	0,899		0,807	
Standardabweichung	0,32		0,26	
Messwerte	0,767	0,794	1,230	0,739
	0,859	0,641	1,321	0,666
	1,434	1,227	1,259	0,871
	1,332	1,222	1,203	0,875
	1,020	1,016	0,704	0,632
	1,028	0,970	0,612	0,707
	0,984	0,294	0,812	0,705
	1,005	0,280	0,842	0,559
	0,627		0,472	0,739
	0,685		0,533	0,666

Pro Probe wurden zwei Messwerte ermittelt (jeweils grau oder weiss innerhalb der Spalten).

U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney bei unabhängigen Stichproben:

Getestet zu $\alpha=0,05$: $Z=-0,980$, $p=0,356$

9.3.2 Ko-Inokulation der Linie 220.01 mit PVY oder BYV

Tabelle 9.8: DAS-ELISA Absorptionswerte aus Blattstielproben der Linie 220.01 nach Ko-Inokulation mit PVY oder BYV und von nicht-transgenen *N. benthamiana* Kontrollpflanzen mit Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen.

	220.01			nicht-transgene Kontrollen		
	ohne n=7	+PVY n=8	+BYV n=6	ohne n=2	+PVY n=2	+BYV n=2
Mittelwert	0,580	1,000	0,821	0,147	0,174	0,134
Standardabweichung	0,129	0,287	0,147	0,024	0,012	0,024
Messwerte	0,788	0,743	1,028	0,121	0,166	0,137
	0,734	0,771	1,039	0,134	0,188	0,115
	0,567	1,164	0,836	0,173	0,163	0,167
	0,539	1,273	0,784	0,163	0,180	0,117
	0,485	1,558	0,574			
	0,525	1,625	0,604			
	0,391	0,652	0,775			
	0,414	0,653	0,762			
	0,616	0,849	0,960			
	0,642	0,950	0,920			
	0,75	0,954	0,758			
	0,714	1,014	0,812			
	0,471	1,06				
	0,484	1,02				
		0,877				
		0,841				

Pro Probe wurden zwei Messwerte ermittelt (jeweils grau oder weiss innerhalb der Spalten).

Tabelle 9.9: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.8 dargestellten Absorptionswerte nach paarweisem Vergleich durch den U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/5=0,01$ (α -Adjustierung).

	220.0 1	220.01 +PVY	220.01+ BYV	nicht transgen	nicht transgen+ PVY	nicht transgen+ BYV
220.01		p<0,00 1 Z=-4,19	p<0,001 Z=-3,49	p=0,003 Z=-2,97	p=0,003 Z=-2,97	p=0,003 Z=-2,97
220.01+PVY			p=0,100 Z=-1,67	p=0,002 Z=-3,02	p=0,002 Z=-3,02	p=0,002 Z=-3,02
220.01+BYV				p=0,004 Z=-2,91	p=0,004 Z=-2,91	p=0,004 Z=-2,91
nicht transgen					p=0,110 Z=-1,56	p=0,386 Z=-0,87
nicht transgen + PVY						p=0,083 Z=-1,73
nicht transgen + BYV						
	b	c	c	a	a	a

9.3.3 Ko-Inokulation der Linie 220.02.13 mit PVY, BYV oder PEMV-1/-2

Tabelle 9.10: DAS-ELISA Absorptionswerte in Blattstielen (BS) und Blattlamina (BL) aus dem oberen Stängelbereich in Pflanzen der Linie 220.02.13 zwei (nicht Ko-infiziert, +PVY, +BYV) und drei (PEMV-1/-2) Wochen nach der Ko-Inokulation mit Angabe der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (St).

	220.02.13 n=9		220.02.13+PVY n=10		220.02.13+BYV n=8		220.02.13+PEMV n=9	
	BS	BL	BS	BL	BS	BL	BS	BL
#	\bar{x} 0,684	\bar{x} 0,253	\bar{x} 0,979	\bar{x} 0,316	\bar{x} 0,132	\bar{x} 0,060	\bar{x} 0,479	\bar{x} 0,264
	St \pm 0,18	St \pm 0,07	St \pm 0,16	St \pm 0,11	St \pm 0,12	St \pm 0,07	St \pm 0,33	St \pm 0,24
1	0,433	0,313	0,718	0,303	0,093	0,113	0,639	0,281
	0,458	0,306	0,728	0,275	0,072	0,086	0,693	0,263
2	0,462	0,337	0,986	0,428	0,114	0,000	0,635	0,644
	0,486	0,317	0,981	0,426	0,150	0,000	0,716	0,683
3	0,817	0,118	0,998	0,415	0,398	0,227	0,424	0,087
	0,860	0,122	0,953	0,440	0,410	0,231	0,429	0,097
4	0,649	0,191	0,843	0,444	0,071	0,000	1,183	0,248
	0,688	0,202	0,860	0,423	0,060	0,034	1,152	0,258
5	0,656	0,297	0,881	0,181	0,122	0,010	0,253	0,140
	0,666	0,297	0,913	0,148	0,112	0,019	0,247	0,126
6	0,677	0,279	0,781	0,193	0,000	0,100	0,212	0,148
	0,667	0,312	0,868	0,208	0,000	0,105	0,244	0,113
7	0,845	0,163	1,053	0,289	0,177	0,000	0,166	0,049
	0,883	0,190	1,104	0,261	0,198	0,000	0,150	0,072
8	0,539	0,314	1,229	0,180	0,035	0,009	0,105	0,051
	0,566	0,338	1,127	0,217	0,103	0,025	0,117	0,068
9	1,004	0,213	1,278	0,493			0,633	0,763
	0,960	0,243	1,297	0,422			0,621	0,656
10			0,994	0,295				
			0,985	0,288				

Pro Probe wurden zwei Messwerte ermittelt (jeweils grau oder weiss innerhalb der Spalten).

Tabelle 9.11: DAS-ELISA Absorptionswerte in Blattstielen (BS) und Blattlamina (BL) aus dem oberen Stängelbereich in Pflanzen der Linie 220.02.13 aus Tabelle 9.10 vier (nicht Ko-infiziert, +PVY) und fünf (PEMV-1/-2) Wochen nach der Ko-inokulation mit Angabe der Mittelwerte (\emptyset) und Standardabweichungen (St).

#	220.02.13 n=9		220.02.13+PVY n=10		220.02.13+PEMV n=9	
	BS	BL	BS	BL	BS	BL
	\emptyset 0,378 St \pm 0,29	\emptyset 0,067 St \pm 0,07	\emptyset 0,560 St \pm 0,16	\emptyset 0,276 St \pm 0,09	\emptyset 0,512 St \pm 0,13	\emptyset 0,235 St \pm 0,18
1	0,595	0,137	0,507	0,315	0,397	0,090
	0,664	0,137	0,554	0,351	0,365	0,088
2	0,888	0,274	0,548	0,387	0,537	0,133
	0,881	0,153	0,524	0,362	0,653	0,123
3	0,287	0,005	0,339	0,118	0,791	0,074
	0,217	0,010	0,265	0,197	0,787	0,062
4	0,181	0,073	0,461	0,248	0,444	0,068
	0,223	0,036	0,462	0,225	0,492	0,132
5	0,193	0,038	0,464	0,126	0,529	0,128
	0,174	0,062	0,482	0,140	0,519	0,111
6	0,696	0,061	-	-	0,345	0,152
	0,808	0,082	-	-	0,387	0,156
7	0,112	0,009	0,641	0,375	0,550	0,063
	0,125	0,016	0,648	0,274	0,629	0,073
8	0,270	0,000	0,703	0,350	0,465	0,328
	0,277	0,000	0,860	0,323	0,508	0,309
9	0,097	0,085	0,703	0,350	0,486	0,284
	0,108	0,026	0,860	0,323	0,335	0,296
10			0,339	0,118		
			0,265	0,197		

Pro Probe wurden zwei Messwerte ermittelt (jeweils grau oder weiss innerhalb der Spalten).

Tabelle 9.12: DAS-ELISA Absorptionswerte in Blattstielen (BS) und Blattlamina (BL) aus dem mittleren Stängelbereich in Pflanzen der Linie 220.02.13 zwei (nicht Ko-infiziert, +PVY, +BYV) und drei (PEMV-1/-2) Wochen nach der Ko-Inokulation mit Angabe der Mittelwerte (\emptyset) und Standardabweichungen (St).

#	220.02.13 n=9		220.02.13+PVY n=10		220.02.13+BYV n=8		220.02.13+PEMV n=9	
	BS	BL	BS	BL	BS	BL	BS	BL
	\emptyset 0,728	\emptyset 0,158	\emptyset 0,620	\emptyset 0,384	\emptyset 0,808	\emptyset 0,895	\emptyset 1,060	\emptyset 1,140
	St \pm 0,24	St \pm 0,19	St \pm 0,50	St \pm 0,16	St \pm 0,28	St \pm 0,46	St \pm 0,31	St \pm 0,58
1	1,255	0,120	1,451	0,489	1,226	0,076	1,854	0,752
	1,137	0,122	2,405	0,470	1,176	0,082	1,906	0,667
2	0,925	0,085	0,959	0,301	1,012	0,737	1,100	2,306
	0,917	0,074	0,715	0,319	1,097	0,664	1,074	2,033
3	0,943	0,640	0,648	0,425	0,943	1,351	1,115	1,242
	0,866	0,644	0,694	0,389	0,948	1,171	1,054	1,069
4	0,776	0,204	0,584	0,309	0,928	1,279	0,967	1,283
	0,789	0,204	0,508	0,296	0,958	0,978	1,023	1,192
5	0,709	0,189	0,510	0,408	0,883	1,164	1,074	2,057
	0,731	0,194	0,463	0,743	0,851	1,177	0,842	2,010
6	0,604	0,018	0,341	0,574	0,701	1,533	0,866	0,784
	0,677	0,026	0,421	0,546	0,585	1,440	1,018	0,826
7	0,480	0,051	0,394	0,255	0,445	1,094	0,857	1,026
	0,501	0,044	0,362	0,318	0,388	0,663	0,818	0,936
8	0,476	0,000	0,348	0,676	0,396	0,391	0,809	0,720
	0,458	0,002	0,317	0,430	0,398	0,510	0,792	0,727
9	0,433	0,122	0,318	0,167				0,452
	0,432	0,106	0,323	0,190				0,451
10			0,417	0,163				
			0,212	0,215				

Pro Probe wurden zwei Messwerte ermittelt (jeweils grau oder weiss innerhalb der Spalten).

Tabelle 9.13: DAS-ELISA Absorptionswerte in Blattstielen (BS) und Blattlamina (BL) aus dem mittleren Stängelbereich in Pflanzen der Linie 220.02.13 aus Tabelle 9.10 vier (nicht Ko-infiziert, +PVY) und fünf (PEMV-1/-2) Wochen nach der Ko-Inokulation mit Angabe der Mittelwerte (\emptyset) und Standardabweichungen (St).

#	220.02.13 n=9		220.02.13+PVY n=10		220.02.13+PEMV n=9	
	BS	BL	BS	BL	BS	BL
	\emptyset 0,553 St \pm 0,25	\emptyset 0,040 St \pm 0,03	\emptyset 0,710 St \pm 0,32	\emptyset 0,475 St \pm 0,28	\emptyset 0,634 St \pm 0,16	\emptyset 0,235 St \pm 0,18
1	0,433	0,045	0,510	0,441	0,590	0,016
	0,510	0,022	0,451	0,401	0,560	0,019
2	1,215	0,105	1,083	0,494	0,474	0,397
	1,087	0,052	1,010	0,443	0,663	0,404
3	0,584	0,003	0,434	0,345	0,593	0,105
	0,463	0,014	0,470	0,513	0,481	0,158
4	0,272	0,014	0,654	0,769	0,510	0,053
	0,300	0,011	0,734	0,860	0,669	0,035
5	0,312	0,027	0,240	0,127	0,833	0,358
	0,455	0,007	0,342	0,089	0,892	0,272
6	0,442	0,079	-	-	0,660	0,351
	0,568	0,006	-	-	0,590	0,279
7	0,611	0,020	0,857	0,370	0,730	0,663
	0,532	0,034	0,885	0,234	0,805	0,491
8	0,727	0,036	1,296	1,017	0,725	0,177
	0,661	0,016	1,443	1,095	0,916	0,206
9	0,402	0,119	0,588	0,315	0,367	0,105
	0,383	0,107	0,689	0,418	0,356	0,126
10			0,434	0,345		
			0,470	0,513		

Pro Probe wurden zwei Messwerte ermittelt (jeweils grau oder weiss innerhalb der Spalten).

Tabelle 9.14: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 und Tabelle 9.12 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der nicht Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den Wilcoxon-Test: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016$ (α -Adjustierung).

	220.02.13 Oben BS	220.02.13 Oben BL	220.02.13 Mitte BS	220.02.13 Mitte BL
220.02.13 Oben BS		p=0,008 Z=-2,66	p=0,678 Z=-0,42	nd
220.02.13 Oben BL			nd	p=0,138 Z=-1,48
220.02.13 Mitte BS				p=0,008 Z=-2,66
220.02.13 Mitte BL				

BS=Blattstiel; BL=Blattlamina; nd=nicht durchgeführt.

Tabelle 9.15: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.11 und Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der nicht Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den Wilcoxon-Test: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016$ (α -Adjustierung).

	220.02.13 Oben BS	220.02.13 Oben BL	220.02.13 Mitte BS	220.02.13 Mitte BL
220.02.13 Oben BS		p=0,008 Z=-2,66	p=0,051 Z=-1,95	nd
220.02.13 Oben BL			nd	p=0,260 Z=-1,12
220.02.13 Mitte BS				p=0,008 Z=-2,66
220.02.13 Mitte BL				

BS=Blattstiel; BL=Blattlamina; nd=nicht durchgeführt.

Tabelle 9.16: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 und Tabelle 9.12 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der PVY Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den Wilcoxon-Test: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016$ (α -Adjustierung).

+PVY	220.02.13 Oben BS	220.02.13 Oben BL	220.02.13 Mitte BS	220.02.13 Mitte BL
220.02.13 Oben BS		p=0,005 Z=-2,80	p=0,074 Z=-1,78	nd
220.02.13 Oben BL			nd	p=0,508 Z=-0,663
220.02.13 Mitte BS				p=0,114 Z=-1,58
220.02.13 Mitte BL				

BS=Blattstiel; BL=Blattlamina; nd=nicht durchgeführt.

Tabelle 9.17: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.11 und Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der PVY Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den Wilcoxon-Test: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016$ (α -Adjustierung).

+PVY	220.02.13 Oben BS	220.02.13 Oben BL	220.02.13 Mitte BS	220.02.13 Mitte BL
220.02.13 Oben BS		p=0,008 Z=-2,66	p=0,110 Z=-1,59	nd
220.02.13 Oben BL			nd	p=0,021 Z=-2,31
220.02.13 Mitte BS				p=0,021 Z=-2,31
220.02.13 Mitte BL				

BS=Blattstiel; BL=Blattlamina; nd=nicht durchgeführt.

Tabelle 9.18: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 und Tabelle 9.12 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den Wilcoxon-Test: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016$ (α -Adjustierung).

+PEMV	220.02.13 Oben BS	220.02.13 Oben BL	220.02.13 Mitte BS	220.02.13 Mitte BL
220.02.13 Oben BS		p=0,021 Z=-2,31	p=0,011 Z=-2,54	nd
220.02.13 Oben BL			nd	p=0,011 Z=-2,54
220.02.13 Mitte BS				p=0,953 Z=-0,06
220.02.13 Mitte BL				

BS=Blattstiel; BL=Blattlamina; nd=nicht durchgeführt.

Tabelle 9.19: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.11 und Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den Wilcoxon-Test: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016$ (α -Adjustierung).

+PEMV	220.02.13 Oben BS	220.02.13 Oben BL	220.02.13 Mitte BS	220.02.13 Mitte BL
220.02.13 Oben BS		p=0,008 Z=-2,66	p=0,110 Z=-1,59	nd
220.02.13 Oben BL			nd	p=0,314 Z=-1,00
220.02.13 Mitte BS				p=0,008 Z=-2,66
220.02.13 Mitte BL				

BS=Blattstiel; BL=Blattlamina; nd=nicht durchgeführt.

Tabelle 9.20: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 und Tabelle 9.12 dargestellten Absorptionswerte innerhalb der BYV Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den Wilcoxon-Test: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016$ (α -Adjustierung).

+BYV	220.02.13 Oben BS	220.02.13 Oben BL	220.02.13 Mitte BS	220.02.13 Mitte BL
220.02.13 Oben BS		p=0,343 Z=-0,94	p=0,012 Z=-2,52	nd
220.02.13 Oben BL			nd	p=0,017 Z=-2,38
220.02.13 Mitte BS				p=0,484 Z=-0,70
220.02.13 Mitte BL				

BS=Blattstiel; BL=Blatlamina; nd=nicht durchgeführt.

Tabelle 9.21: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 bis Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte der PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen im Vergleich zu PVY Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016^1$ bzw. $\alpha/2=0,025^2$ (α -Adjustierung).

PVY Ko-infizierte Pflanzen der Linie 220.02.13				
	oberer Stängelbereich		mittlerer Stängelbereich	
	Blattstiel	Blatlamina	Blattstiel	Blatlamina
220.02.13+PEMV				
<u>3 Wochen¹</u>				
Oben Blattstiel	p=0,001; Z=-3,02			
Oben Blatlamina		p=0,133; Z=-1,55		
Mitte Blattstiel			p=0,001; Z=-3,02	
Mitte Blatlamina				p<0,001; Z=-3,67
<u>5 Wochen²</u>				
Oben Blattstiel	p=0,489; Z=-0,75			
Oben Blatlamina		p=0,004; Z=-2,78		
Mitte Blattstiel			p=0,863; Z=-0,22	
Mitte Blatlamina				p=0,077; Z=-1,81

Tabelle 9.22: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 bis Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte der PVY, BYV oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 im Vergleich zur nicht Ko-infizierten Kontrolle durch den U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016^1$ bzw. $\alpha/2=0,025^2$ (α -Adjustierung).

nicht Ko-infizierte Pflanzen der Linie 220.02.13				
	oberer Stängelbereich		mittlerer Stängelbereich	
	Blattstiel	Blatlamina	Blattstiel	Blatlamina
220.02.13+PVY				
<u>2 Wochen¹</u>				
Oben Blattstiel	p=0,003; Z=-2,85			
Oben Blatlamina		p=0,447; Z=-0,81		
Mitte Blattstiel			p=0,008; Z=-2,57	
Mitte Blatlamina				p=0,013; Z=-2,44
<u>4 Wochen²</u>				
Oben Blattstiel	p=0,113; Z=-1,63			
Oben Blatlamina		p<0,001; Z=-3,31		
Mitte Blattstiel			p=0,258; Z=-1,14	
Mitte Blatlamina				p<0,001; Z=-3,48
220.02.13+BYV				
<u>2 Wochen¹</u>				
Oben Blattstiel	p<0,001; Z=-3,46			
Oben Blatlamina		p=0,001; Z=-3,08		
Mitte Blattstiel			p=0,743; Z=-0,38	
Mitte Blatlamina				p=0,006; Z=-2,69
220.02.13+PEMV				
<u>3 Wochen¹</u>				
Oben Blattstiel	p=0,113; Z=-1,63			
Oben Blatlamina		p=0,297; Z=-1,10		
Mitte Blattstiel			p=0,011; Z=-2,51	
Mitte Blatlamina				p<0,001; Z=-3,48
<u>5 Wochen²</u>				
Oben Blattstiel	p=0,190; Z=-1,36			
Oben Blatlamina		p=0,024; Z=-2,25		
Mitte Blattstiel			p=0,136; Z=-1,54	
Mitte Blatlamina				p=0,003; Z=-2,87

Tabelle 9.23: Statistische Auswertung der in Tabelle 9.10 bis Tabelle 9.13 dargestellten Absorptionswerte der PVY oder PEMV-1/-2 Ko-infizierten Pflanzen im Vergleich zu BYV Ko-infizierten Pflanzen der Linie 220.02.13 durch den U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney: Auflistung der errechneten p- und Z-Werte und Vergleich zu $\alpha/3=0,016$ (α -Adjustierung).

BYV Ko-infizierte Pflanzen der Linie 220.02.13				
	oberer Stängelbereich		mittlerer Stängelbereich	
	Blattstiel	Blattlamina	Blattstiel	Blattlamina
220.02.13+PVY				
<u>2 Wochen</u>				
Oben Blattstiel	p<0,001; Z=-3,55			
Oben Blattlamina		p<0,001; Z=-3,29		
Mitte Blattstiel			p=0,034; Z=-2,13	
Mitte Blattlamina				p=0,009; Z=-2,57
220.02.13+PEMV				
<u>3 Wochen</u>				
Oben Blattstiel	p=0,006; Z=-2,69			
Oben Blattlamina		p=0,015; Z=-2,40		
Mitte Blattstiel			p=0,059; Z=-1,92	
Mitte Blattlamina				p=0,606; Z=-0,57

9.4 Klonierungsstrategien, Vektorherstellung und Längenstandard

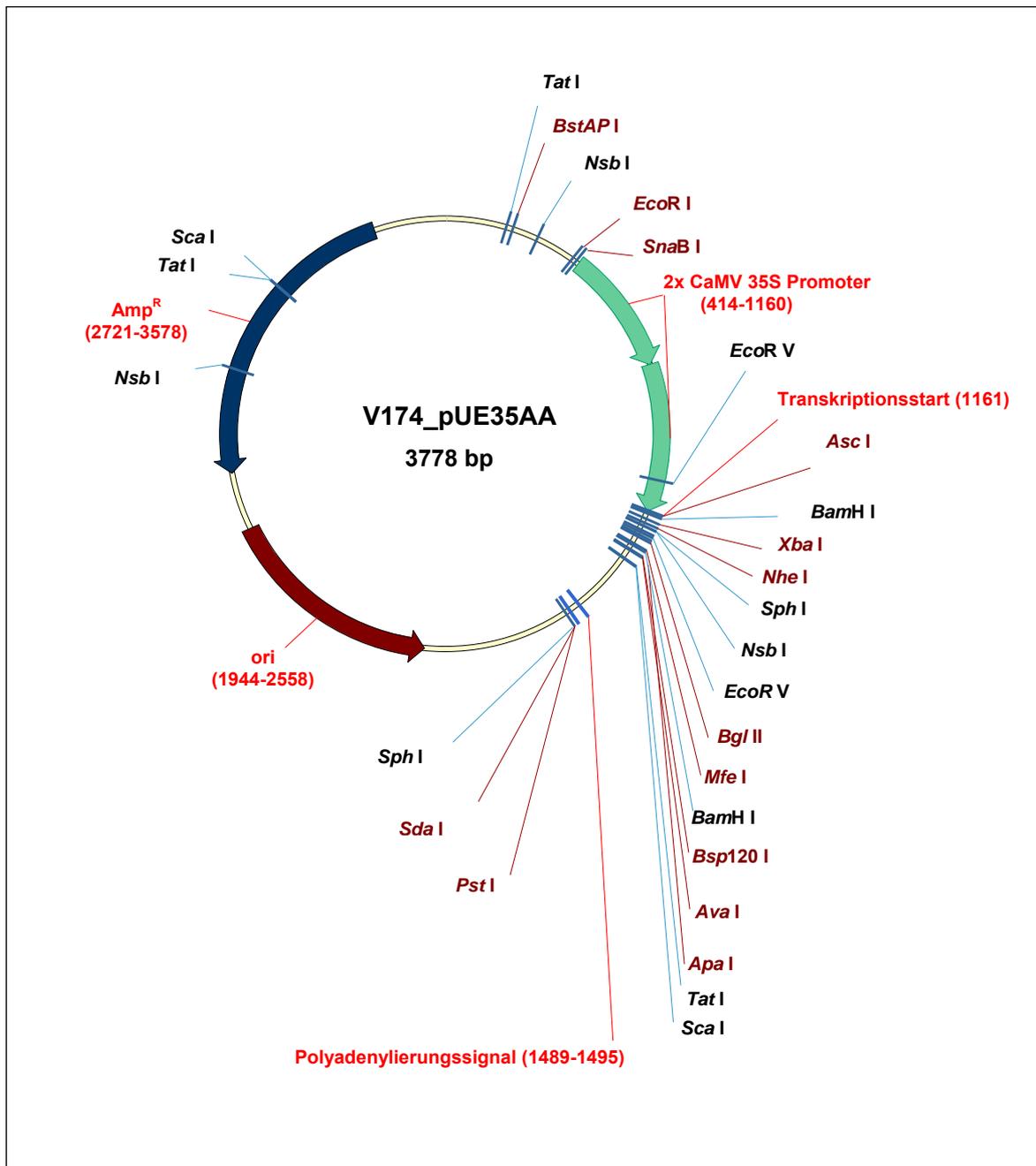


Abbildung 9.4: Schematische Darstellung des Vektors V174. Das Ursprungsplasmid pUC57 (MBI Fermentas, GenBank # Y14837) wurde um einen doppelten CaMV 35S Promotor und eine CaMV Polyadenylierungssequenz erweitert und ergab V174_pUE35AA. Die CaMV Transkriptionsregulatoren wurden aus pRT100 (Töpfer *et al.*, 1987, GenBank # X05868) entnommen und ergänzt. Die verdoppelte 35S Promotorsequenz ist angelehnt an die im pRT100 beschriebene 35S Promotorsequenz (Töpfer *et al.*, 1987).

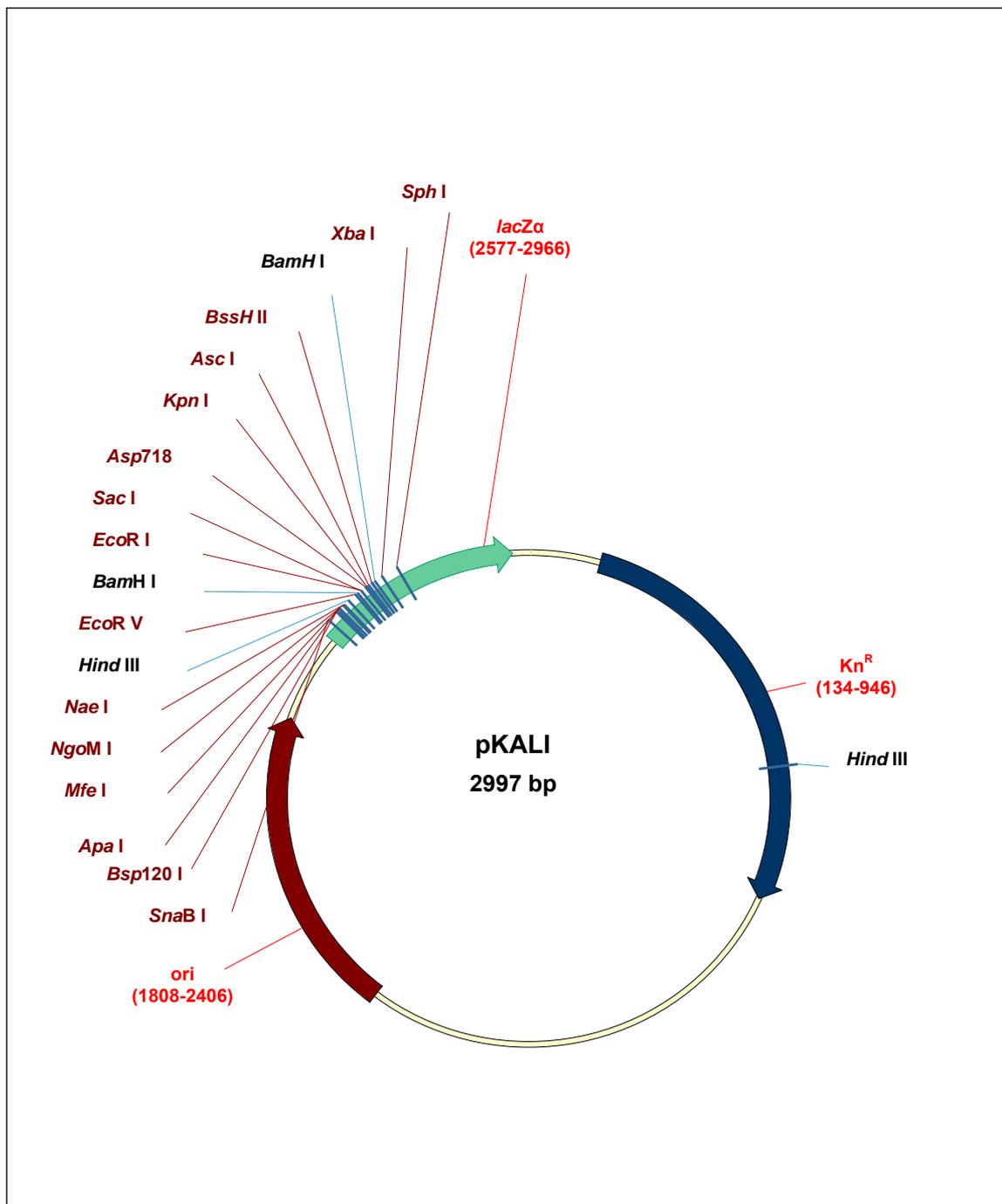


Abbildung 9.5: Schematische Darstellung des Vektors pKali. Das Ursprungspasmid pLitmus38 (NEB) wurde um Bereiche der MCS aus pNEB193 (NEB, *Kpn*I/*Hind*III) erweitert und ergab pLitmus193 (V146). In pLitmus193 wurde ein Kn-Resistenzgen aus pUC4K (Pharmacia, GenBank # 06404) über *Hinc* II (*blunt end*) und *Swa*I/*Hpa*I (*blunt end*) integriert und ergab pKali (V168).

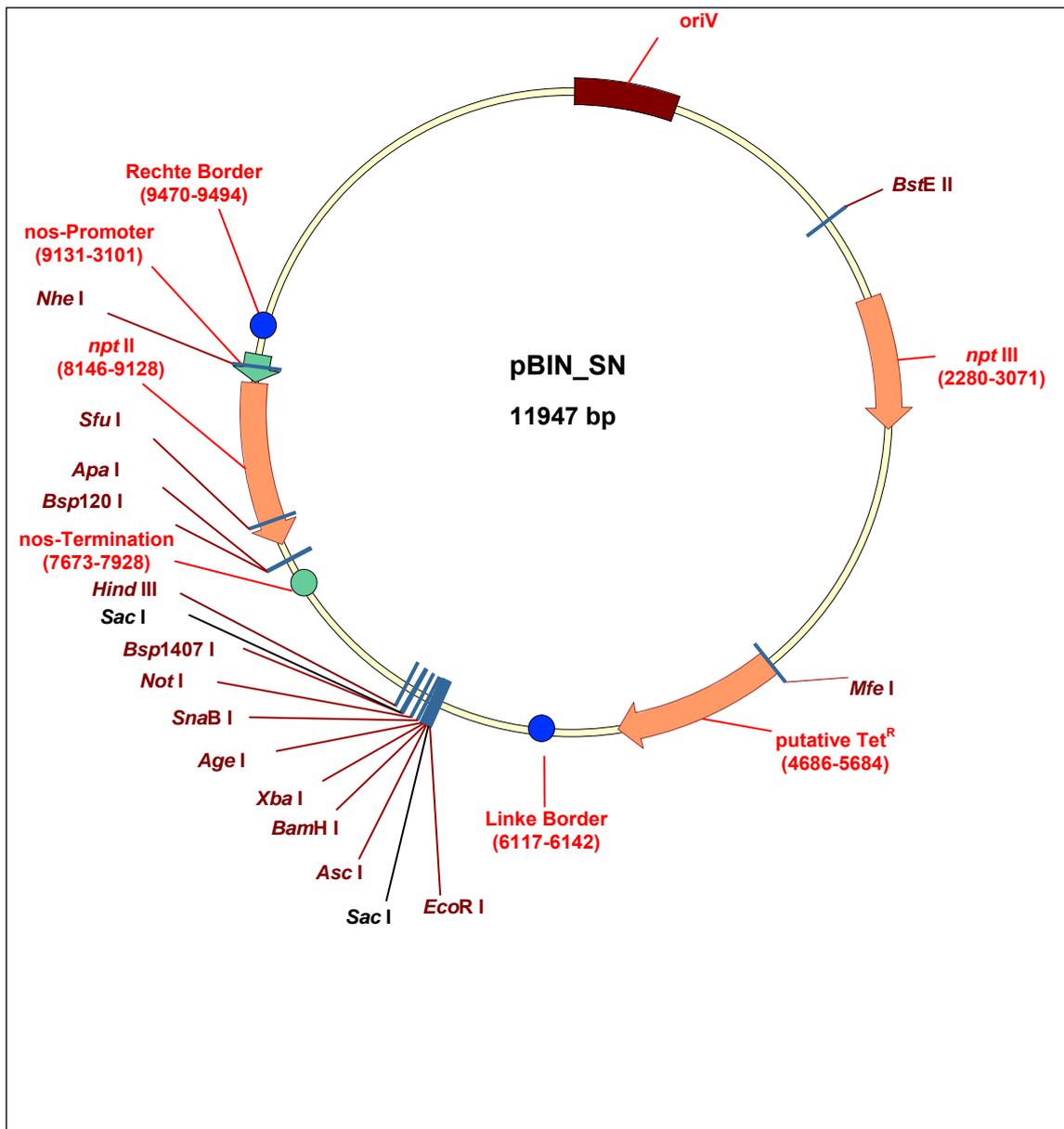


Abbildung 9.6: Schematische Darstellung des Vektors pBIN_SN. In den binären Vektor Bin19 (Bevan, 1984; Frisch *et al.*, 1995; GenBank # U09365) wurde über *EcoR I*/*Hind III* eine MCS aus pSLNEB (V89) integriert und ergab pBIN_SN (V92). Der pSLNEB entstand durch Integration eines *EcoR I*/*Xba I* Fragmentes aus pNEB193 (NEB, pUC19 Derivat) in den pSL1180 (V75, Amershan Bioscience, GenBank # U13865, pUC118 Derivat).

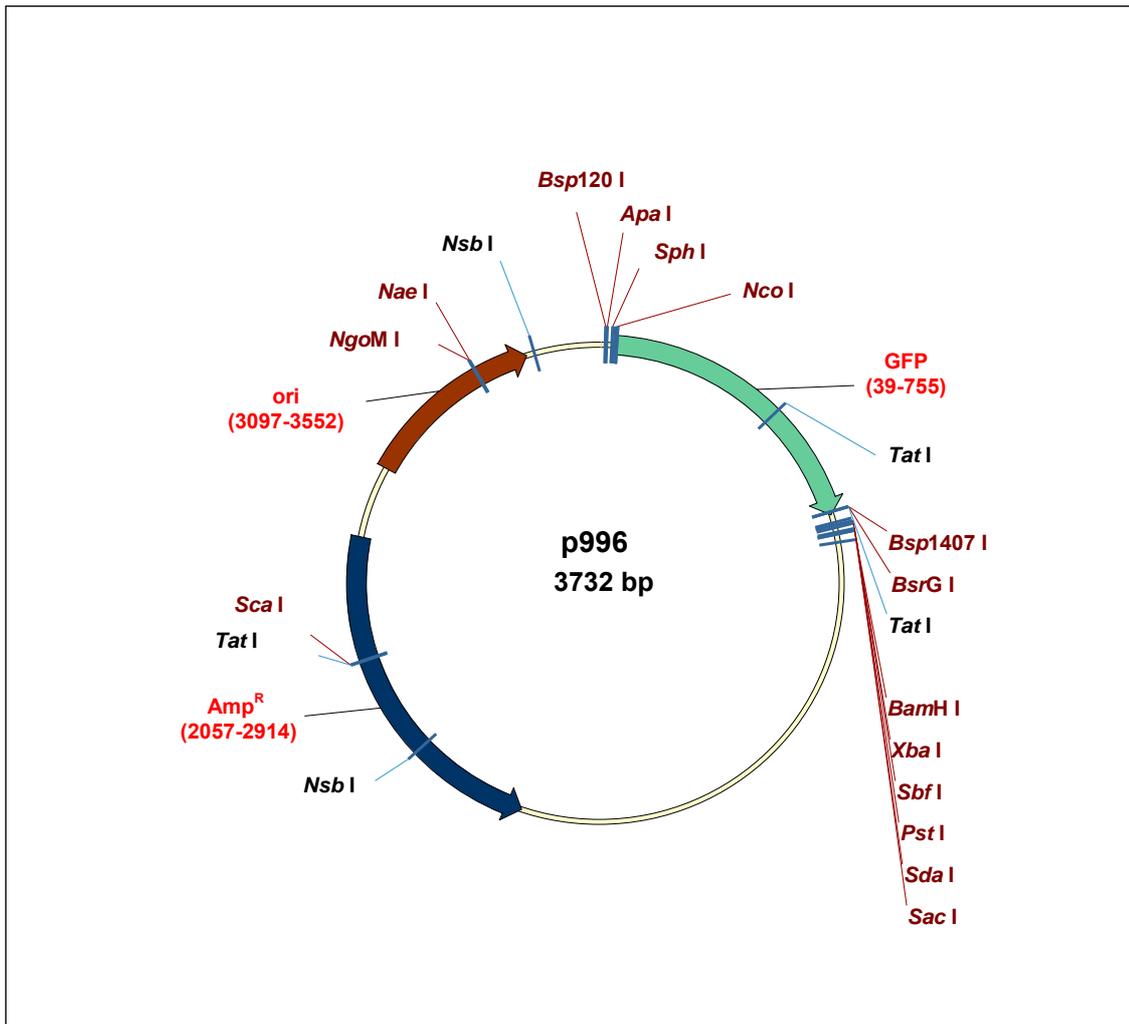


Abbildung 9.7: Schematische Darstellung des Vektors p996. In den Vektor pGEMTeasy (Promega) wurde über *Nco*I und *Pst*I eine GFP-Sequenz integriert.

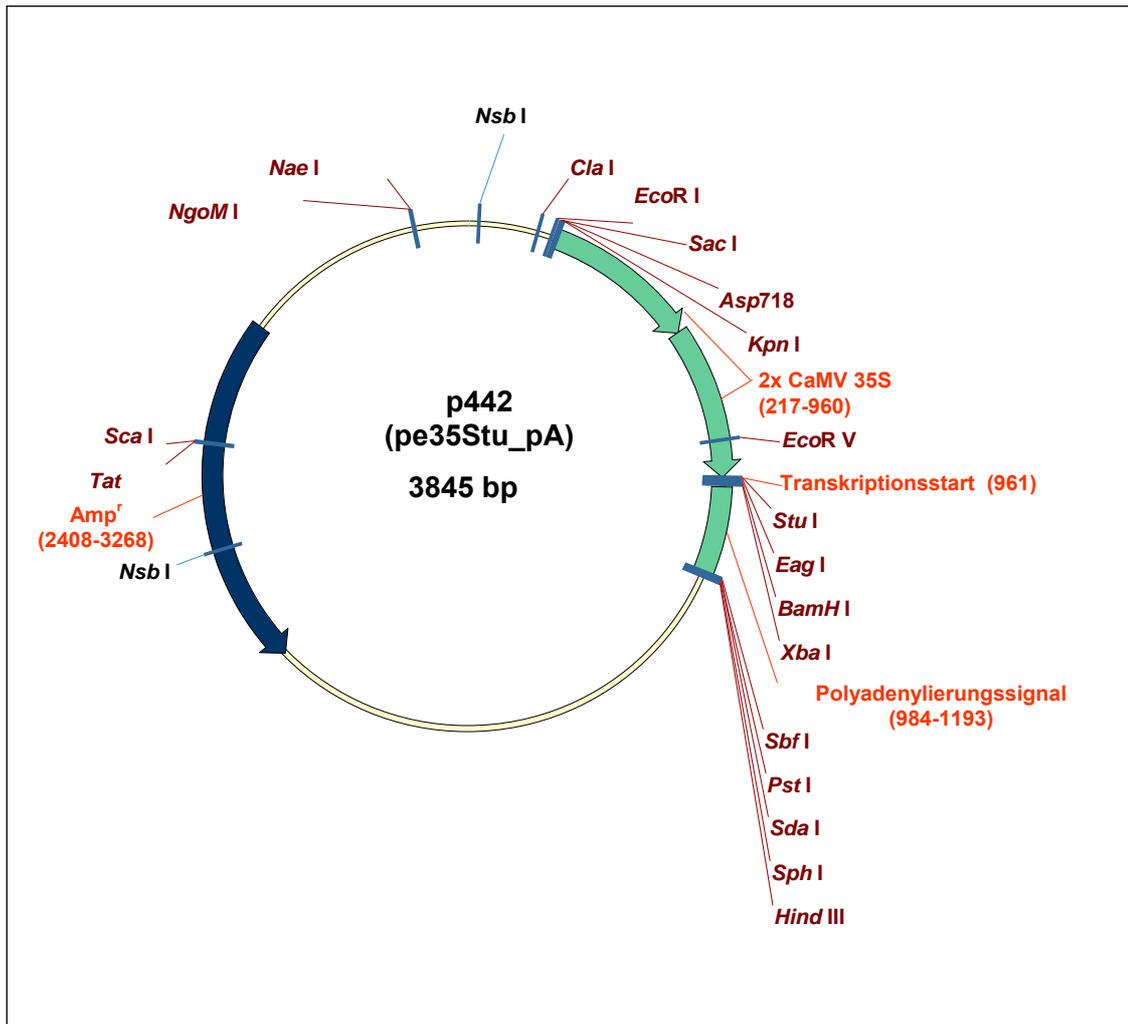


Abbildung 9.8: Schematische Darstellung des Vektors p442. In das Ursprungsplasmid pT7T319U (Pharmacia) ist eine verdoppelte CaMV 35S Promotor Sequenz und ein Polyadenylierungssignal integriert worden. Die verdoppelte 35S Promotorsequenz ist angelehnt an die im pRT100 beschriebene 35S Promotorsequenz (Töpfer *et al.*, 1987).

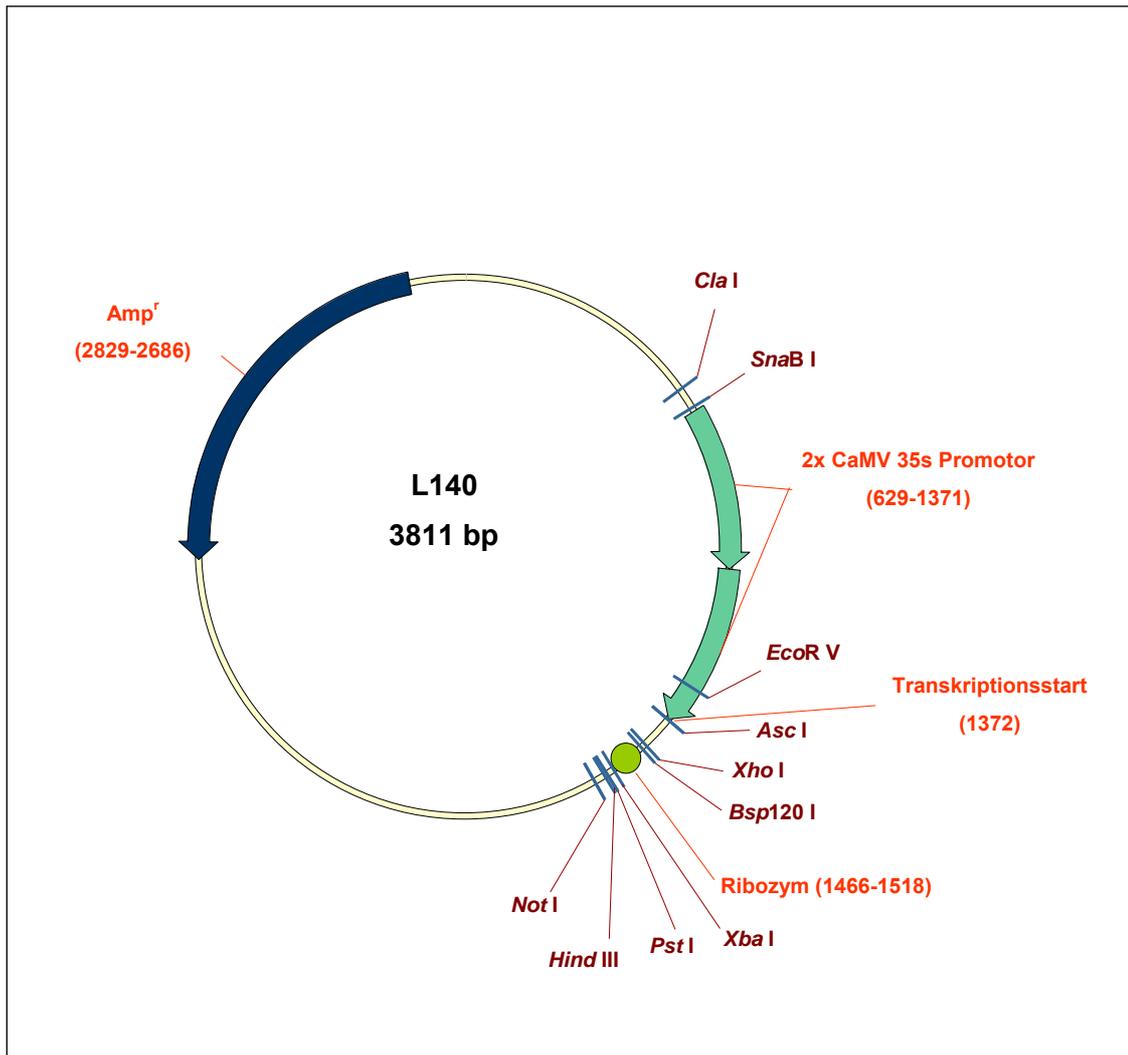


Abbildung 9.9: Schematische Darstellung des Vektors L140 der eine verdoppelte CaMV 35S Promotorsequenz (nach Töpfer *et al.*, 1987) und eine Ribozymsequenz enthält. Nach *NgoM IV / Bsa I* Restriktionsspaltung und Auffüllreaktion mit Klenow wurde in einen pBluescript II SKM (Stratagene) aus dem Vektor pGEM7Zf(+) (Promega) ein *Kpn I/BamH I* Fragment integriert (L139). Anschliessend wurde aus dem V162 nach einer *Cla I / Hind III* Restriktionsspaltung der verdoppelte CaMV 35S Promotor und die Ribozymsequenz in L139 kloniert und ergab L140.

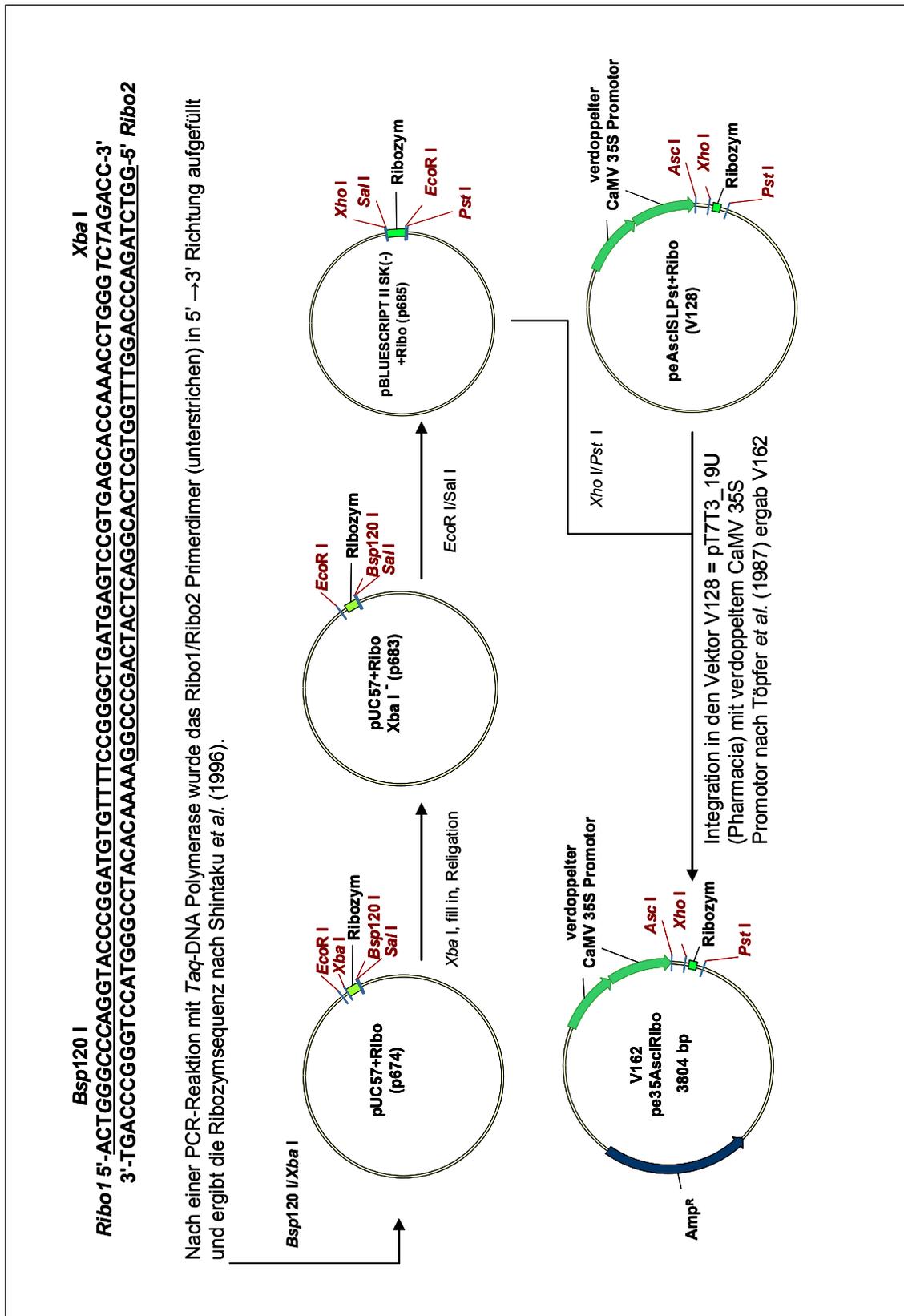


Abbildung 9.10: Schematische Darstellung der Herstellung der Ribozymsequenz nach Shintaku *et al.* (1996) und Klonierung des V162 mit verdoppeltem CaMV 35S-Promotor (Töpfer *et al.*, 1987) und Ribozymsequenz.

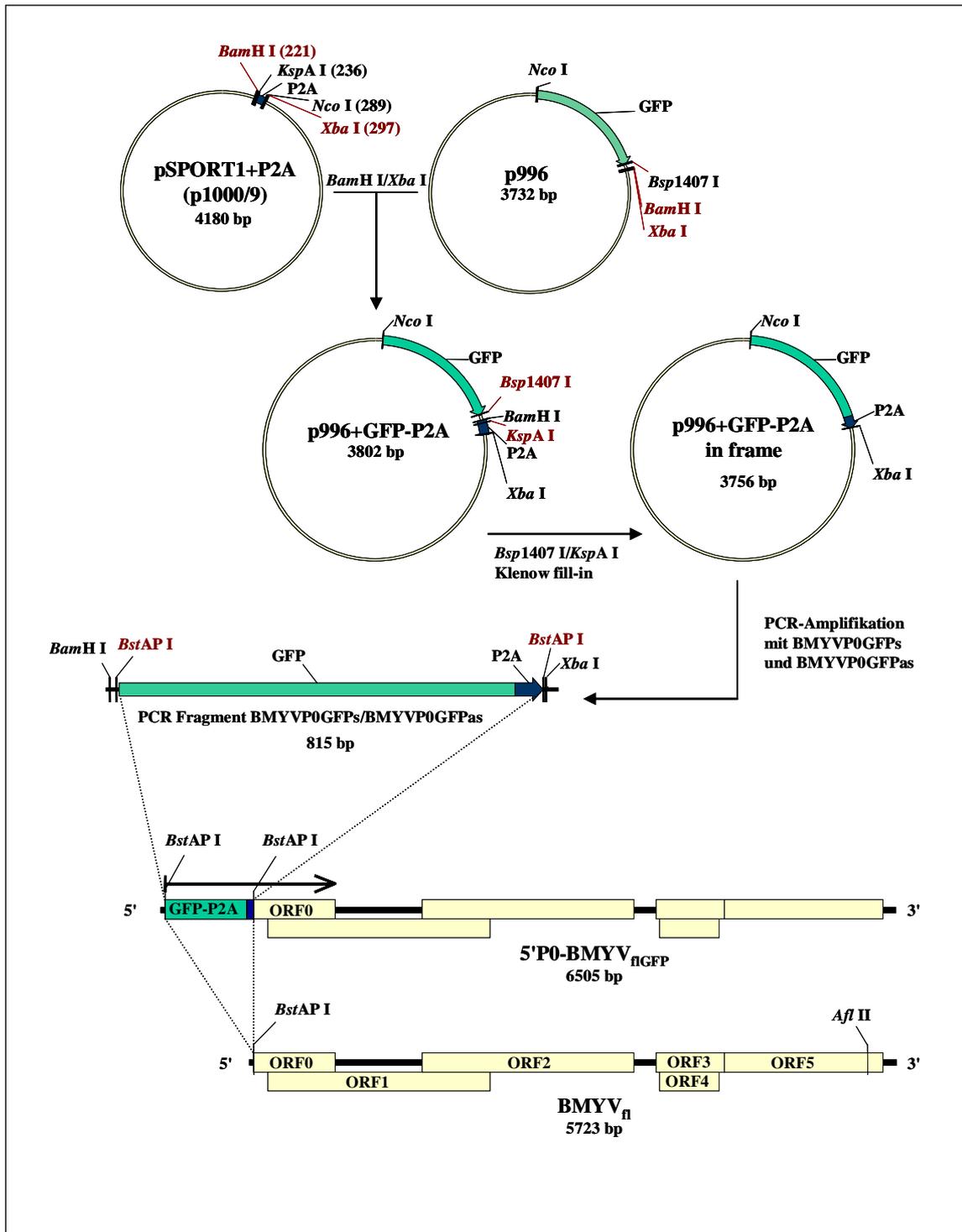


Abbildung 9.12: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der 5'P0-BMYV_{fl}GFP durch Integration einer GFP-P2A Sequenz an das 5'-Ende des BMYV_{fl} ORF0. Die Herstellung des Vektors p1000/9 ist in Abbildung 9.11 beschrieben.

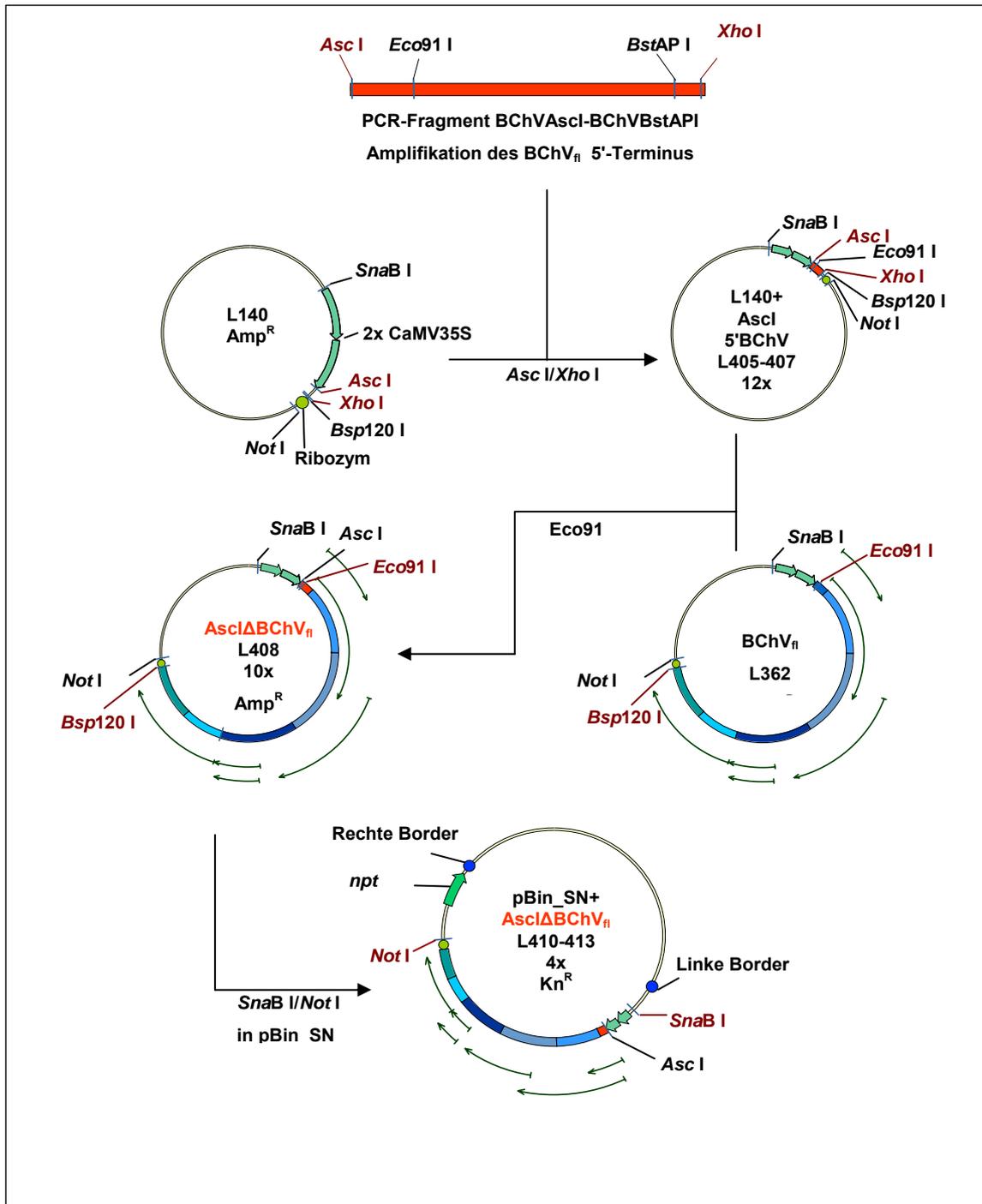


Abbildung 9.14: Klonierungsstrategie zur Herstellung des $Ascl\Delta BChV_{fi}$ durch Integration des mit den Oligonukleotiden $BChV_{Ascl}$ und $BChV_{BstAPI}$ amplifizierten PCR-Fragmentes in den $BChV_{fi}$. Die Lysate L407 und L408 sind Populationen aus jeweils 10 Einzellysaten.

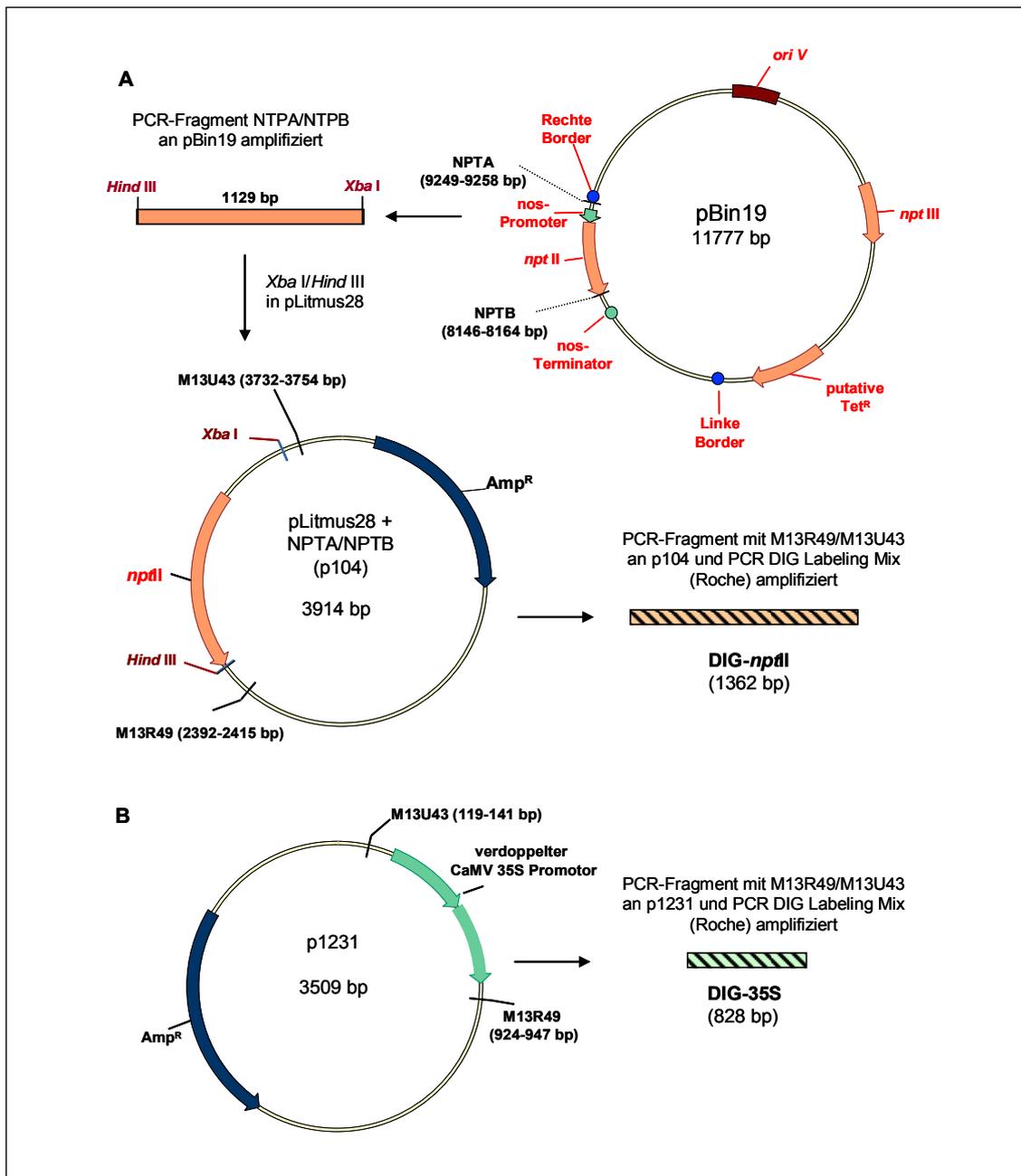


Abbildung 9.15: Herstellung der (A) DIG-*nptII* und (B) DIG-35S Sonden zur Transgendetektion in *BMVYV-Amplicon* transgenen *N. benthamiana*. (A) Das für die Herstellung der *nptII*-Sonde amplifizierte PCR-Fragment umfasst die gesamte *nptII*-Sequenz in pBIN19 (Abbildung 9.6) mit dem Bereich bis zur rechten Bordersequenz. Das PCR-Fragment wurde nach *Hind III*/*Xba I* in den Plasmidvektor pLitmus28 überführt und ergab p104. (B) In p1231 (Ursprungsvektor pT7T3_18U) liegt eine verdoppelte CaMV 35S-Promotorsequenz (Töpfer *et al.*, 1987) vor. An p104 und p1231 wurden mit den universellen Oligonukleotiden M13U43 und M13R49 unter Verwendung des PCR DIG Labeling Kit (Roche) die beiden DIG-markierten Sonden amplifiziert.

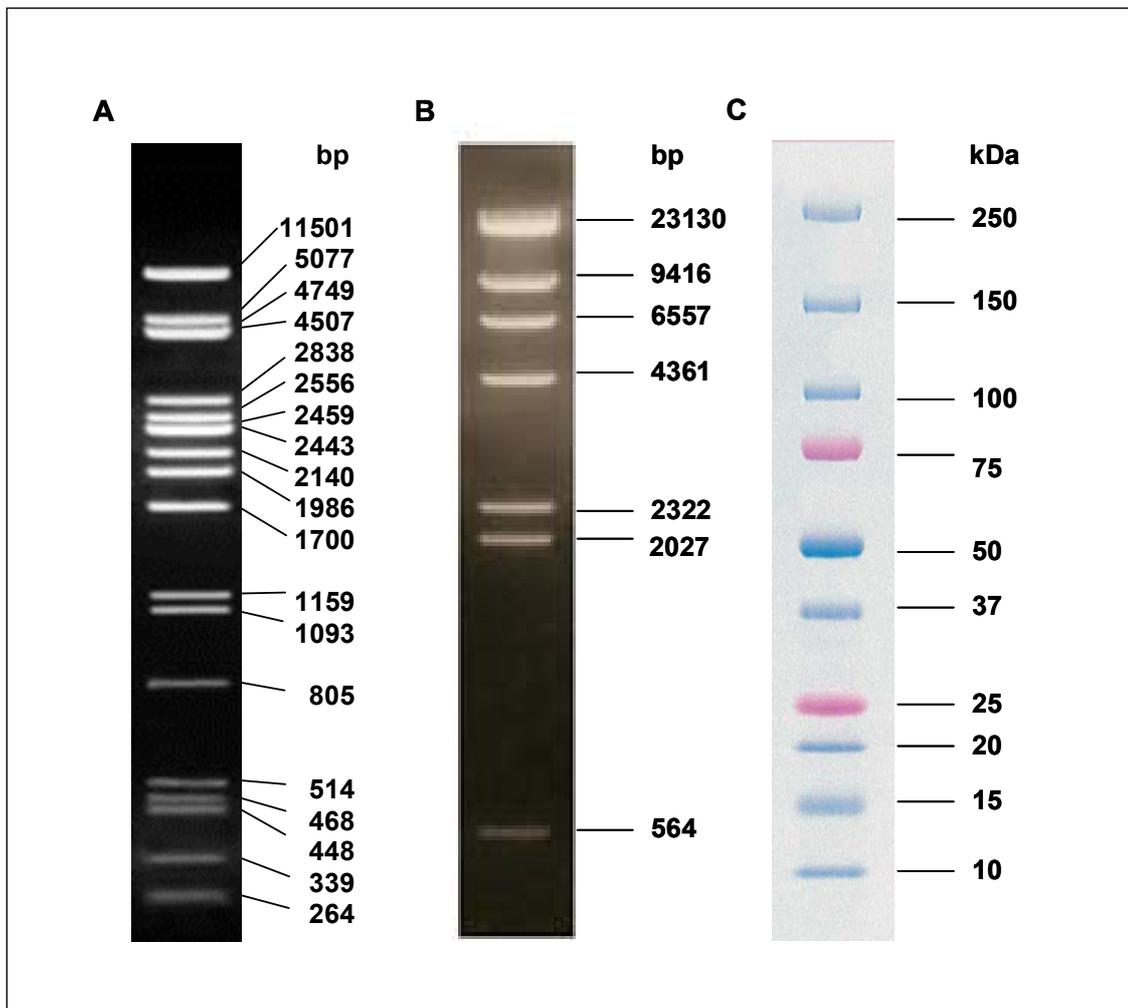


Abbildung 9.16: Übersicht über verwendete Größenstandards mit Längenangabe (bp) oder Molekulargewicht (kDa) der aufgetrennten Fragmente: (A) λ -Pst I-Größenstandard in einem 1%igen Agarosegel (Fragmente kleiner als 264 bp sind nicht dargestellt). (B) DNA-Größenstandard II (Roche) in einem 1%igen Agarosegel, eingesetzt als DIG-markierter Standard. (C) *Prestained Protein-Größenstandard (Precision Plus Protein Standard[®], Bio-Rad 161-0374, dual color)*.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Edgar Maiß für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und die große Unterstützung bei der Entwicklung und Umsetzung eigener Ideen. Ganz besonders bedanke ich mich für sein großes Vertrauen in meine Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft (24/7).

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Günter Adam für die bereitwillige Übernahme des Ko-Referats.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Poehling bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.

Ich danke Herrn Dr. Dietrich Lesemann und seinem Laborteam für die hervorragenden elektronenoptischen Aufnahmen von BMVYV-Viruspartikeln. Weiterhin danke ich Dr. Christof Dietrich für die exzellenten Aufnahmen am CLSM. Für den intensiven Informationsaustausch und die Bereitstellung des Antiserums MAFF24 bedanke ich mich bei Dr. Mark Stevens (Broom's Barn, Rothamsted Research). Bei Dr. Lina Katul bedanke ich mich für die Bereitstellung des Antiserums 5G4 und die Tipps und Tricks für die Durchführung des TPIA. Dein 5G4 war eine große Hilfe bei dem Nachweis von BMVYV-Infektionen.

Der PLANTA, Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH (Einbeck) danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Reinhard Nehls, Herrn Dr. Josef Kraus und Herrn Werner Beyer für die informativen Gespräche bei den Statustreffen.

Allen derzeitigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Maiß und des Instituts sei für die Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima gedankt. Mein besonderer Dank gilt Ilona, Jutta, Jill, Jürgen, Mark, Reinhard und Wulf für ihre Hilfe *in vitro* und *in vivo* und den Gärtnern Herrn Seelbinder und Herrn Arndt, deren Hilfe nicht nur auf die Pflege der Pflanzen im Gewächshaus beschränkt blieb.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, deren Hilfe und Unterstützung ich immer gewiss sein konnte. Für seinen Drang nach Bewegung danke ich Marc, der mir bei dem Verfassen dieser Arbeit sportliche Abwechslung bescherte.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Dirk Stephan
Geburtsdatum: 23.12.1971
Geburtsort: Karlsruhe
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1978-1980 Gundschule Karlsruhe-Forchheim
1980-1982 Grundschule Wennigsen/Deister
1982-1984 Orientierungsstufe im Schulzentrum Wennigsen/Deister
1984-1991 Ganztagsgymnasium Barsinghausen mit Abitur abgeschlossen

Ersatzdienst:

10/1991-11/1992 Zivildienst im Bereich der individuellen Schwerstbehindertenbetreuung in Hannover-Wettbergen

Studium:

10/1993-12/1999 Universität Hannover, Fachbereich Gartenbau Diplomarbeit am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz: 'Untersuchungen zur Agroinfektion von *Nicotiana benthamiana* durch *Potato leafroll virus* (PLRV) und *Beet western yellows virus* (BWYV)', Abschluss als Diplom-Agraringenieur
01/2000-07/2000 wissenschaftliche Hilfskraft, Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

Praktika:

11/1995-06/1996 The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd., Plant Improvement Division, Auckland, Neuseeland

Dissertation:

08/2000-heute Promotion an der Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 'Molekulare Charakterisierung von *Beet mild yellowing virus* (BMV) und *Beet chlorosis virus* (BChV) und Selektion BMV *Amplicon*-transgenen *Nicotiana benthamiana*'

Berufliche Tätigkeit:

04/2003-heute wissenschaftl. Angestellter an der Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Bearbeitung eines DFG-finanzierten Projekts, 'Molekulare Charakterisierung der Vektor- und Wirtsspezifität blattlaus- und milbenübertragbarer Gräserviren'

Sprachkenntnisse: Englisch

Hannover, im November 2004

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass ich den Doktorgrad nicht besitze und mich auch früher nicht um den Doktorgrad beworben habe.

Hannover, im November 2004

Dirk Stephan