

**Untersuchung DI-DNA vermittelter Resistenz gegen das  
Beet Curly Top Geminivirus (BCTV) in Zuckerrübe  
und Suche nach neuen Virusvarianten  
im Anbaugebiet Idaho, USA**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von Dipl.-Biol. (t.o.) Susanne Lauster aus Ludwigsburg

Hauptberichter: Priv. Doz. Dr. Thomas Frischmuth  
Mitberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid  
Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 2000

Biologisches Institut der Universität Stuttgart



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	3
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	7
<b>Zusammenfassung</b>	9
<b>I. Einleitung</b>	11
1. <u>Geminiviren</u>	11
1.1. Das Beet Curly Top Virus	12
1.2. Symptome in Zuckerrübe nach BCTV-Infektion	16
1.3. Strategien zur Erzeugung resistenter Pflanzen gegen BCTV	17
1.3.1 konventionelle Züchtungsprogramme	17
1.3.2 Pathogen-vermittelte Resistenz gegen Geminiviren	17
2. <u>Ziel der Arbeit</u>	25
<b>II. Material und Methoden</b>	26
1. <u>Bakterien und Plasmide</u>	26
2. <u>Virusisolate aus den USA</u>	26
3. <u>Pflanzenmaterial</u>	27
4. <u>Klonierung</u>	30
4.1. Anzuchtmedien für Bakterien	30
4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> JM83 Zellen	30
4.1.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> JM83 Zellen	31
5. <u>DNA-Präparation</u>	32
5.1. Lösungen zur DNA-Extraktion aus Bakterien	32
5.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> JM83 im kleinen Maßstab (Minipräp)	32
5.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> JM83 im großen Maßstab (Maxipräp) mittels Cäsiumchloriddichtegradientenzentrifugation	33
5.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> JM83 im großen Maßstab (Maxipräp) über Nucleobond AX500 Säulen	35

5.2. Lösungen zur DNA Extraktion aus Pflanzenmaterial	36
5.2.1 DNA-Extraktion aus Blättern und Blattscheiben	36
5.2.2 DNA-Extraktion aus Protoplasten	37
5.3. DNA-Konzentrationsbestimmung	38
6. <u>Nachweis von Nukleinsäuren</u>	39
6.1. Agarosegelelektrophorese	39
6.2. Southern Blot	40
6.3. DIG-Hybridisierung mit dem Boehringer-Kit	41
6.3.1 Herstellung von markierten Proben, BCTV genomische Sonde	41
6.3.2 Hybridisierung	42
6.4. Chemolumineszenznachweis	43
7. <u>Polymerasekettenreaktion (PCR)</u>	44
7.1. Temperaturprofile der einzelnen PCR-Programme	46
7.2. Detektion des Transgens, 60°C	46
7.3. Detektion von replikativer DI-DNA, 60°C	47
7.4. Amplifikation von gesamt-genomischer Virus-DNA, 65°C	47
8. <u>Analyse und Modifizierung von DNA</u>	48
8.1. DNA-Fällung	48
8.2. Präparation von DNA aus Agarosegelen	48
8.3. Restriktionsverdauung von DNA	49
8.4. Dephosphorylierung von DNA	50
8.5. Ligation von DNA	50
9. <u>Infektionen von Pflanzenmaterial</u>	51
9.1. Agroinfektion von Zuckerrübensetzlingen	51
9.2. Blattscheiben-Test	54
9.2.1 Anzuchtmedien für pflanzliche Gewebekultur	54
9.2.2 Herstellung von Blattscheiben	55
9.2.3 Transfektion von Blattscheiben über Agroinfektion	56
9.2.4 Transfektion von Blattscheiben durch Partikelbeschuss	57
9.3. Herstellung von Protoplasten aus Zuckerrübenblättern	59
9.3.1 Elektroporation von Protoplasten	60
9.3.2 PEG-vermittelter Transfer von DNA in Protoplasten	61

10. <u>Sequenzieren</u>	62
10.1. Sequenzierreaktion	62
10.2. Sequenzieren	64
11. <u>Statistische Analyse</u>	65
<b>III. Ergebnisse</b>	66
1. <u>Infektionsexperimente an F<sub>1</sub>-Linien</u>	66
1.1. Pflanzeninfektionen der F <sub>1</sub> -Generationen	70
1.1.1 Ergebnisse der Linien, die keine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und der Symptomstärke aufwiesen	70
1.1.2 Ergebnisse der Linien, die eine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und der Symptomstärke aufwiesen	73
Linie 71034 T	75
Linie 76032 J	75
Linie 84111 K	76
Linie 84107 K	76
Linie 84118 T	77
Linie 84124 T	77
1.1.3 Weitere Linien	79
2. <u>Infektionen von doppelhaploiden Pflanzen</u>	80
3. <u>Blattscheibentest</u>	87
4. <u>Bestimmung von BCTV-Varianten in Idaho, USA</u>	92
4.1 BCTV105	98
4.2 BCTV59	104
4.3. Weitere Isolate aus den USA	105
5. <u>Zusammenfassung der Ergebnisse</u>	105
5.1. Infektionsanalysen der F <sub>1</sub> -Generationen	106
5.2. Infektionsanalyse der Doppelhaploiden	108
5.3. Blattscheibentests	109
5.4. Bestimmung von BCTV-Varianten in Idaho, USA	109

<b>IV. Diskussion</b>	111
1. <u>Untersuchung der DI-DNA vermittelten Resistenz</u>	111
2. <u>Etablierung eines Schnelltests zur Identifikation von resistenten Zuckerrüben</u>	116
3. <u>Untersuchung der Variabilität der BCTV Population in Idaho</u>	117
<b>V. Anhang</b>	121
5.1. <u>Plasmide und Konstrukte</u>	121
5.2. <u>Ausführliche Pflanzendaten</u>	123
5.3. <u>Sequenzdaten</u>	128
5.3.1 Sequenz von BCTV105	128
5.3.2 Sequenz von BCTV59	130
5.3.3 andere Isolate aus den USA	131
5.4. <u>Tabellenwerte für den <math>\chi^2</math>-Test</u>	134
5.5. <u>Größen und Einheiten</u>	135
5.6. <u>Chemikalienliste</u>	136
5.7. <u>Geräteliste</u>	138
5.8. <u>Tabellenverzeichnis</u>	139
5.9. <u>Abbildungsverzeichnis</u>	141
5.10. <u>Literaturverzeichnis</u>	142

## **Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$	Signifikanzniveau
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
ACMV	African Cassava Mosaic Virus (Afrika Cassava Mosaik Virus)
<i>B. vulgaris</i>	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>altissima</i> (Zuckerrübe)
BCTV	Beet Curly Top Virus (Zuckerrüben Kräuselschopf Virus)
BCTV-Cal	BCTV Kalifornischer Stamm
BCTV-CFH	BCTV CFH-Stamm
BCTV-Wor	BCTV Worland Stamm
bp / bps	Basenpaar / Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
$\chi^2$ -Wert	Chi-Quadrat-Wert
CabLCV	Cabbage Leaf Curl Virus (Kohl Blattroll Virus)
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus (Blumenkohl Mosaik Virus)
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Kälbermagen)
CP	Coat protein (Hüllprotein)
CSPD	[3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'- (5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]dekan})-4-yl) phenylphosphat, Dinatriumsalz
DI-DNA	defective interfering DNA (defekte eingreifende DNA)
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfonat
dpi	days post inoculation (Tage nach Inokulation)
ds	Doppelstrang
$\Delta$	Delta, Differenz
EACMV	East African Cassava Mosaic Virus (Ostafrika Cassava Mosaik Virus)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f.	Folgeseite
Fa.	Firma
ff.	Folgeseiten
FG	Freiheitsgrad
HCl	Hydrochlorid
HrCTV	Horseradish Curly Top Virus (Meerrettich Kräuselschopf Virus)

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	left border (linke Grenze)
$\lambda$ -DNA	Lambda-Phagen DNA
max.	maximal
min	Minute
MP	Movement protein (Transportprotein)
N-terminal	Amino-terminal
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NSP	Nuclear Shuttle Protein (Kern Transport Protein)
nt / nts	Nukleotid / Nukleotide
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
ori	origin of replication (Replikationsursprung)
p.a.	per analysi (zur Analyse)
Rb	Retinoblastom
RB	right border (rechte Grenze)
REn	Replication enhancer protein (Replikations Verstärker Protein)
Rep	Replication associated protein (Replikationsprotein)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelstrang
Tab.	Tabelle
T-DNA	Transfer-DNA
TGMV	Tomato Golden Mosaic Virus (Tomaten Goldmosaik Virus)
Ti-Plasmid	Tumor induzierendes Plasmid
TMoV	Tomato Mottle Virus (Tomaten Flecken Virus)
TPCTV	Tomato Pseudo Curly Top Virus (Tomaten Pseudo-Kräuselschopf Virus)
TrAP	Transcriptional activator protein (Transkriptions Aktivator Protein)
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TYLCV	Tomato Yellow Leaf Curl Virus (Tomaten Gilb Kräusel Virus)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
<i>vir</i> -Region	Virulenzregion
v/v	volume per volume (Volumenprozent)
w/v	weight per volume (Gewichtsprozent)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid



z.B.

zum Beispiel

## **Zusammenfassung**

Das Beet Curly Top Geminivirus (BCTV) verursacht in Zuckerrüben die Kräuselschopfkrankheit. Typische Symptome sind: das Rollen der Blattspreite nach oben, starke Wuchsminderung der Gesamtpflanze und Anschwellen der Blattadern. Nicht resistente Pflanzen sterben ca. zwei bis vier Wochen nach Infektion ab. Die Eindämmung der Krankheitsausbreitung kann entweder durch die Bekämpfung des Übertragers, der Zikade *Circulifer tenellus* oder durch die Züchtung resistenter Pflanzen erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DI-DNA (defective interfering DNA) vermittelte Resistenz von Zuckerrüben gegen BCTV untersucht. Neben Resistenztestungen verschiedener transgener F<sub>1</sub>-Zuckerrübenlinien und doppelhaploiden Linien sollte ein Testsystem zur schnellen Bestimmung von resistenten Zuckerrüben etabliert werden. Bei Resistenzuntersuchungen ist es außerdem wichtig die Diversität des Pathogens zu kennen. Zu diesem Zweck wurden BCTV-infizierte Pflanzen aus dem Anbaugebiet Idaho untersucht.

Frischmuth und Stanley veröffentlichten 1994 Ergebnisse, die zeigten, dass *N. benthamiana* Pflanzen, die mit einer DI-DNA von BCTV transformiert wurden, nach Infektion mit BCTV verspätete und schwächere Symptome entwickelten, als nicht-transgene Kontrollpflanzen. Diese Schutzwirkung vor einer BCTV Infektion stand in enger Korrelation zur Mobilisierung der transgenen DI-DNA aus dem Wirtsgenom durch das infizierende Virus und Amplifikation der DI-DNA auf Kosten des Elternvirus. Diese Art des Schutzes sollte auf Zuckerrübe übertragen werden.

Für die Resistenztests standen verschiedene transgene F<sub>1</sub>-Zuckerrübenlinien und doppelhaploide Pflanzen zur Verfügung. Nach Infektion und dem Auftreten der ersten Symptome wurde der Krankheitsverlauf jeder Pflanze wöchentlich protokolliert. Von allen inokulierten Pflanzen wurden Blattproben genommen und DNA extrahiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Southern Blot (zur Verifizierung, ob eine Infektion vorlag) und mittels PCR. Die PCR diente zum Nachweis der Transgenität der Pflanzen sowie zur Überprüfung der Replikation der DI-DNA. Mit den so gewonnenen Daten wurde untersucht, ob die Mobilisierung und

Replikation der transgenen DI-DNA zu einer Abmilderung der Symptome führte.

Die Analyse von 21 F<sub>1</sub>-Linien (800 Pflanzen) und 7 doppelhaploiden Linien (200 Pflanzen) ergab, dass in der Linie 84124 T eine ähnliche Resistenz gegen BCTV zu finden war, die durch die Replikation der transgenen DI-DNA hervorgerufen wurde. Transgene, DI-DNA replizierende Pflanzen dieser Linie waren zum überwiegenden Teil symptomfrei oder wiesen nur milde Symptome auf. Nur Pflanzen dieser Linie zeigten einen „Erholungseffekt“ von der BCTV Infektion. Pflanzen, die ca. drei Wochen nach Inokulation deutliche BCTV Symptome aufwiesen, wuchsen innerhalb kürzester Zeit auf die Größe der nicht-infizierten Kontrollpflanze heran und das Blattrollen wurde schwächer. Die DI-DNA vermittelte Resistenz gegen BCTV konnte in dieser Linie erreicht werden.

Das Testsystem zur Schnellbestimmung resistenter Pflanzen konnte nur ansatzweise etabliert werden. Es gelang mit Hilfe von Blattscheibentests der Nachweis, dass in der sensitiven Anbausorte 4F0007 BCTV schon einen Tag nach Inokulation nachweisbar war und im Laufe der nächsten 12 Tage zu einem ca. 30% höheren Anteil vorhanden war, als in der resistenten Anbausorte 3H9727. In der resistenten Sorte konnte BCTV außerdem erst drei Tage nach Infektion nachgewiesen werden. Der Versuch der Evaluierung dieses Testsystems mit transgenen F<sub>1</sub>-Linien scheiterte dann jedoch an der Schwankung der Werte einzelner Pflanzenproben einer Linie, welche bei den Testungen der Anbausorten nicht auftraten.

Die Untersuchung der Feldisolate aus Idaho führte zur Klonierung und vollständigen Sequenzierung zweier Proben. BCTV105 und BCTV59 zeigten die größte Homologie zu BCTV-CFH, weisen aber beide einen Bereich auf, der mit BCTV-Cal näher verwandt ist. Diese Isolate scheinen durch Rekombination der Viren BCTV-CFH und BCTV-Cal entstanden zu sein.

## **I. Einleitung**

### **1. Geminiviren**

Geminiviren sind Phytopathogene, die vorallem in Tropen und Subtropen vorkommen. Mit Ausbreitung ihrer Überträgerorganismen in gemäßigte Klimate treten sie dort jedoch zunehmend ebenfalls in Erscheinung. Ihren Namen gab ihnen ihre Partikelstruktur - zwei unvollständige Ikosaeder bilden ein zusammengesetztes „Zwillings“partikel [Harrison, 1985].

Geminiviren werden in drei Genera aufgeteilt. Tabelle 1 erläutert die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen [Palmer und Rybicki, 1997].

Tab.1: Einteilung der Geminiviren

<b>Genus</b>	<b>Genom-organisation</b>	<b>Wirtspflanze</b>	<b>Überträgerinsekt</b>
<i>Mastrevirus</i>	monopartit	meist Monokotyle	Zikaden
<i>Curtovirus</i>	monopartit	Dikotyle	Zikaden
<i>Begomovirus</i>	meist bipartit	Dikotyle	Weißer Fliege

Begomoviren besitzen meist ein zweigeteiltes Genom, als DNA A und B bezeichnet, welche jeweils einzeln in ein Viruspartikel verpackt werden. Die DNA A enthält u.a. die Gene zur Replikation und kann sich selbst replizieren. DNA B bestimmt die Symptomentwicklung, vermittelt die Ausbreitung in der Pflanze, ist zur Replikation allerdings auf die DNA A angewiesen. Zur erfolgreichen Infektion muß eine Zelle von mindestens zwei Viruspartikeln infiziert werden, die DNA A und DNA B enthalten.

Mastreviren besitzen nur 4 ORFs, ein zweiteiliges Rep Protein, das Transportprotein und das Hüllprotein. Die monopartiten Mastreviren besitzen im Gegensatz zu den zwei anderen Genera zwei intergene Regionen, während die beiden anderen nur eine intergene Region enthalten. In diesen intergenen Regionen liegen Sequenzen, die für die virale Replikation und Genexpression nötig sind [Lazarowitz, 1992; Timmermans *et al.*, 1994].

Curtoviren stellen eine Mischung der beiden erstgenannten Untergruppen dar; zu diesem Genus gehört auch das hier untersuchte Beet Curly Top Virus (BCTV).

### 1.1. Das Beet Curly Top Virus

Das Beet Curly Top Virus ist der charakteristische Vertreter der Curtoviren [Stanley *et al.*, 1986]. Sein Hauptverbreitungsgebiet ist die USA, es gibt jedoch auch Berichte über BCTV im Mittelmeerraum und dem Iran. BCTV besitzt ein zirkuläres Genom aus einzelsträngiger DNA von ca. 3000 bp Größe. Es wurden bisher drei verschiedene BCTV-Stämme isoliert, die sich in Infektionsstärke und Symptomatik voneinander unterscheiden. Es handelt sich dabei um den Kalifornischen/Logan Stamm (BCTV-Cal/Log), den CFH Stamm (BCTV-CFH), und den Worland Stamm (BCTV-Wor). Weitere Viren, die zum Genus der Curtoviren gezählt werden, sind das Horseradish Curly Top Virus (HrCTV [Klute *et al.*, 1996]) und das Tomato Pseudo Curly Top Virus (TPCTV [Briddon *et al.*, 1996]).

Durch Mutagenese und Sequenzvergleich konnte der **Leserahmen C1** als **Rep** Protein (Replication associated protein) identifiziert werden. Das Rep Protein ist für die Replikation von Geminiviren essentiell [Briddon *et al.*, 1989]. Bei Begomoviren vermittelt es die virus-spezifische Erkennung des eigenen Replikationsursprungs und initiiert durch eine Einzelstrangspaltung am Origin die Replikation, die nach dem Prinzip des „rolling-circle“ abläuft [Fontes *et al.*, 1992; Lazarowitz *et al.*, 1992; Heyraud *et al.*, 1993; Fontes *et al.*, 1994 a,b; Orozco und Hanley-Bowdoin, 1996 Suárez-López und Gutiérrez, 1997; Sanz-Burgos und Gutiérrez, 1998]. Ferner wirkt Rep als Transkriptions-Repressor auf seine eigene Produktion, indem es die wirts-vermittelte Aktivierung des Promotors blockiert [Eagle *et al.*, 1994; Hong und Stanley, 1995]. Das Rep Protein besitzt Restriktions- und Ligationsfunktionen, die durch überlappende Proteindomänen im Aminoterminus erzeugt werden, außerdem auch ATPase-Funktion [Laufs *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 1995; Desbiez *et al.*, 1995; Hoogstraten *et al.*, 1996; Orozco *et al.*, 1997].

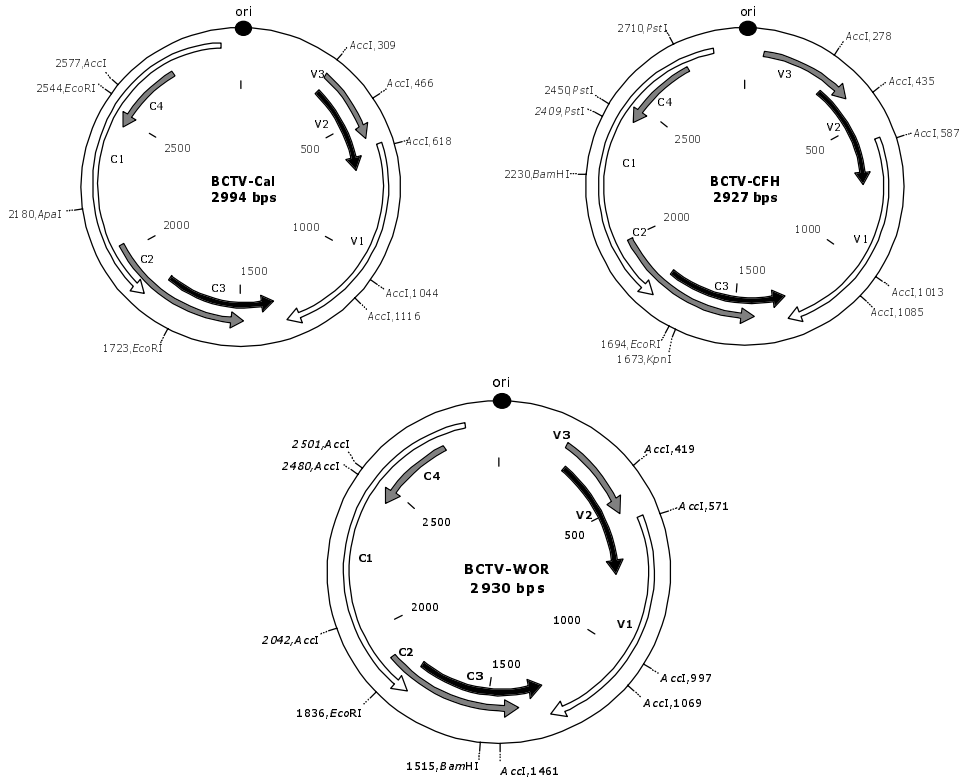


Abb.1: Genomorganisation der BCTV-Stämme

Pfeile: Offene Leserahmen  
 V: Virusstrang-Orientierung  
 C: Komplementärstrang-Orientierung  
 ori: Replikationsursprung

Die Erkennung des viralen Replikationsursprungs wird durch Oligomere des Rep Proteins erreicht. Im Gegensatz dazu wirken Homodimere des Rep Proteins als Transkriptions-Repressor der eigenen Synthese. Die Interaktion von Rep und REn beschleunigt die virale Replikation [Settlage *et al.*, 1996; Orozco *et al.*, 1997]. Rep interagiert mit Rb-ähnlichen Pflanzenproteinen und induziert die Expression von Wirts-DNA Synthesepoteinen in ausdifferenzierten Zellen [Xie *et al.*, 1995; Nagar *et al.*, 1995; Ach *et al.*, 1997].

**Leserahmen C2** codiert das **TrAP** Protein (Transcriptional activator protein). Dieses wird in Begomoviren zur Expression des Hüllproteins CP und des Nuclear Shuttle Proteins NSP benötigt [Sunter *et al.*, 1990; Sunter und Bisaro, 1991; Sunter und Bisaro, 1992; Haley *et al.*, 1992]. TrAP regelt die Expression des Hüllproteins auf zwei Wegen: in Mesophyllzellen wird die Expression aktiviert; im Phloemgewebe wird der Promotor dereprimiert [Sunter und Bisaro, 1997]. Das TrAP Protein ist ein

Zink-bindendes Phosphoprotein mit einer Transkriptionsaktivierungs-Domäne. Es zeigt unspezifische DNA-Bindungsaffinität, wobei ssDNA gegenüber dsDNA bevorzugt wird [Sung und Coutts, 1996; Noris *et al.*, 1996].

TrAP-Mutanten sind nicht zur systemischen Ausbreitung des Virus fähig, produzieren kein Hüllprotein und weisen eine geringe Akkumulation von ssDNA auf [Hanley-Bowdoin *et al.*, 1989; Hayes und Buck, 1989; Sunter *et al.*, 1990; Eteessami *et al.*, 1991]. BCTV C2 Deletionsmutanten verursachten sowohl in *N. benthamiana* wie auch in *Beta vulgaris* typische Wildtyp-Symptome. Dies ließ darauf schließen, dass der intakte Leserahmen C2 nicht zur systemischen Infektion und zur Symptomentwicklung beiträgt [Stanley *et al.*, 1992].

**Leserahmen C3** codiert das **REn** Protein (Replication enhancer protein). Die Interaktion von REn und Rep verstärkt die Replikationstätigkeit. REn moduliert die Funktion von Rep; schaltet also vom Replikationsmodus auf Repressionsmodus [Settlage *et al.*, 1996].

REn-Virusmutanten verursachen in infizierten Pflanzen nur milde Symptome und weisen eine Reduktion des Gehalts viraler DNA auf [Sunter *et al.*, 1990; Eteessami *et al.*, 1991; Morris *et al.*, 1991; Stanley *et al.*, 1992; Hormuzdi und Bisaro, 1995]. Mutanten produzierten in *N. benthamiana* Wildtypsymptome, während die Infektionsraten in *Beta vulgaris* geringer waren (nur 7/30 Pflanzen infiziert) und die Symptome milder [Stanley *et al.*, 1992]. Doppelmutanten in denen die Offenen Leserahmen C2 und C3 mutiert wurden, konnten *N. benthamiana* und *Beta vulgaris* nicht mehr systemisch infizieren [Stanley *et al.*, 1992].

Der Leserahmen C3 fehlt bei HrCTV.

Die Funktion des **Leserahmens C4** ist bisher unklar. Bei Curtoviren wurde eine Beteiligung an der Symptomentwicklung nachgewiesen. Die Expression von C4 in transgenen Pflanzen leitete die Zellteilung im Pflanzengewebe ein [Stanley und Latham, 1992; Latham *et al.*, 1997].

**Leserahmen V1** codiert für das **Hüllprotein (CP)**, das für die Ausbreitung von Curto- und Mastreviren innerhalb der Pflanze essentiell ist [Briddon *et al.*, 1989; Boulton *et al.*, 1989; Woolston *et al.*, 1989; Lazarowitz *et al.*, 1989]. Das Hüllprotein schützt die virale DNA während der Übertragung und bestimmt die Vektorspezifität [Briddon *et al.*, 1990; Azzam *et al.*, 1994; Höfer *et al.*, 1997].

**Leserahmen V2** spielt eine Rolle bei der Virus-Replikation [Stanley *et al.*, 1992]. Eine V2 Mutante verursachte eine symptomlose Infektion in *N. benthamiana*, einhergehend mit besonders geringem Gehalt an ss-Virus-DNA. Da die Mutante in Blattscheiben replizieren konnte und große Mengen an ds-Virus-DNA nachgewiesen wurden, nimmt man an, dass die Zerstörung des V2 Leserahmens entweder die Synthese oder Akkumulation einzelsträngiger Virus-DNA beeinflusst. Dies wiederum beeinträchtigt die Mutante in ihrer Ausbreitung in der Pflanze.

**Leserahmen V3** codiert für das **Transportprotein (MP)**, das ebenfalls eine Rolle bei der Ausbreitung von BCTV zu spielen scheint [Frischmuth *et al.*, 1993] - in TPCTV ist es allerdings nicht vorhanden.



## 1.2. Symptome in Zuckerrübe nach BCTV-Infektion

Die typischen BCTV-Stämme besitzen ein breites Wirtsspektrum und verursachen in der Zuckerrübe eine schwere Krankheit; die sog. Kräuselschopfkrankheit. Typische Symptome dieser Krankheit sind: starkes Kräuseln der Blätter bis hin zur Blattdeformation, starke Wachsminderung des Pflanzenkörpers, Anschwellen der Blattadern. Nicht resistente Pflanzen sterben zum Großteil nach einer BCTV-Infektion innerhalb von zwei bis vier Wochen ab.

Die phänotypische Charakterisierung der unterschiedlichen BCTV-Stämme [Stenger *et al.*, 1990] ergab folgendes Bild: Der BCTV-CFH Stamm verursacht in infizierten Pflanzen die stärksten Symptome und besitzt das breiteste Wirtsspektrum. Er infizierte nicht nur verschiedene *Beta vulgaris* Arten (SL 742 und SS2), sondern auch *Capsella bursa-pastoris* (Hirtentäschelkraut), *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* (Tabak), *Spinacia oleracea* (Spinat) und *Phaseolus vulgaris* (Bohne).

Ähnlich starke Symptome verursacht der BCTV-Cal/Log Stamm, in Tabak ist die Infektion allerdings symptomlos.

Der BCTV-Wor Stamm verursacht in Tabak und *Beta vulgaris* SL 742 nur milde Symptome, die Infektion von *Beta vulgaris* SS2 verlief symptomfrei.

Das HRCTV weist den eingeschränktesten Wirtsbereich auf: neben der Infektion von Meerrettich wurden starke Symptome nur im Hirtentäschelkraut erzeugt, milde Symptome in *Nicotiana benthamiana* und die Infektion in Spinat blieb symptomfrei. Alle weiteren getesteten Pflanzen stellen keinen Wirt für dieses Virus dar.

Das TPCTV wurde erstmals 1950 aus Tomaten in Florida isoliert [Stoner und Hogan, 1950]. Es befällt außerdem *Solanum nigrum* L. (schwarzer Nachtschatten) und *Datura stramonium* (Stechapfel). Aufgrund der BCTV ähnlichen Infektionssymptome wurde zunächst angenommen, dass es sich um einen neuen BCTV-Stamm handelte. Da TPCTV jedoch über die Zikade *Micrutalis malleifera* übertragen wird [Simons und Coe, 1958], wurde es als eigenes Virus innerhalb der Curtoviren eingeordnet [McDaniel und Tsai, 1990].

### 1.3. Strategien zur Erzeugung resistenter Pflanzen gegen BCTV

Es wurden verschiedene Ansätze zur Resistenzvermittlung gegen Geminivirusinfektionen diskutiert [Frischmuth und Stanley, 1993; Lomonossoff, 1995]:

#### 1.3.1 konventionelle Züchtungsprogramme

Konventionelle Züchtungsprogramme sind oft zeitintensiv und führen nicht immer zu den gewünschten Ergebnissen. Es ist noch wenig bekannt über die Pflanzengene, die in der natürlichen Resistenz gegen BCTV eine Rolle spielen. Oft ist der resistente Genotyp polygen, wird also durch mehrere, meist rezessive Gene bestimmt, was die Züchtung wesentlich erschwert. Im Rahmen dieser Züchtungen sind Kreuzungen zwischen Kultursorten nötig, was die Qualität und den Ertrag der Pflanzen beeinträchtigen kann. Der wirtschaftliche Wert solcher Pflanzen sinkt dann, wenn durch Virusmutationen die natürliche Resistenz gebrochen wird und Ertragseinbußen folgen.

#### 1.3.2 Pathogen-vermittelte Resistenz gegen Geminiviren

Die pathogen-vermittelte Resistenz gegen Pflanzenviren umfasst ein breites Spektrum verschiedenster Ansätze. Sanford und Johnson postulierten 1985, dass eine anfällige Pflanze durch Einbringen von Genen, die vom Pathogen selbst stammten, gegen eben dieses Pathogen resistent gemacht werden könnte. Diese Form der Resistenz sollte entweder durch Expression des viralen Gens zur falschen Zeit, in falschen Mengen oder in falscher Form den Infektionszyklus unterbinden.

Zur pathogen-vermittelten Resistenz gegen Geminiviren werden folgende Ansätze verfolgt:

1. DI-DNA vermittelte Resistenz,
2. Expression von Antisense-Sequenzen und
3. Expression verschiedener Virusproteine

##### 1.) Defective interfering (DI-)DNA Resistenz

Viele Tier- und Pflanzenviren besitzen neben ihrem Genom noch subgenomische Elemente, die vom „Elternvirus“ stammen und auf dieses zur Vermehrung angewiesen sind. Wenn diese replikationsdefekten Komponenten die Virusvermehrung beeinflussen (sowohl behindern, als auch verstärken), spricht man von „defective interfering molecules“, also

von „defekten, eingreifenden“ Molekülen [Holland, 1990; Hull und Davies, 1992].

Zunächst wurde am Begomovirus African Cassava Mosaik Virus (ACMV) untersucht, welchen Effekt eine subgenomische ACMV DNA verursachte. Stanley und Townsend koinokulierten 1985 *N. benthamiana* mit ACMV DNA und verschiedenen Mengen subgenomischer ACMV DNA. Die Autoren beobachteten, dass die Infektionsrate sank. Ab einer bestimmten Menge subgenomischer DNA konnte keine Infektion mehr erreicht werden.

Diesen offensichtlichen Schutz vor einer ACMV Infektion wollte man in transgenen Pflanzen erhalten. Grundlegend für diese Überlegung wurde die Arbeit der Gruppe Elmer *et al.*, 1988 (Abb.2; linker Teil).

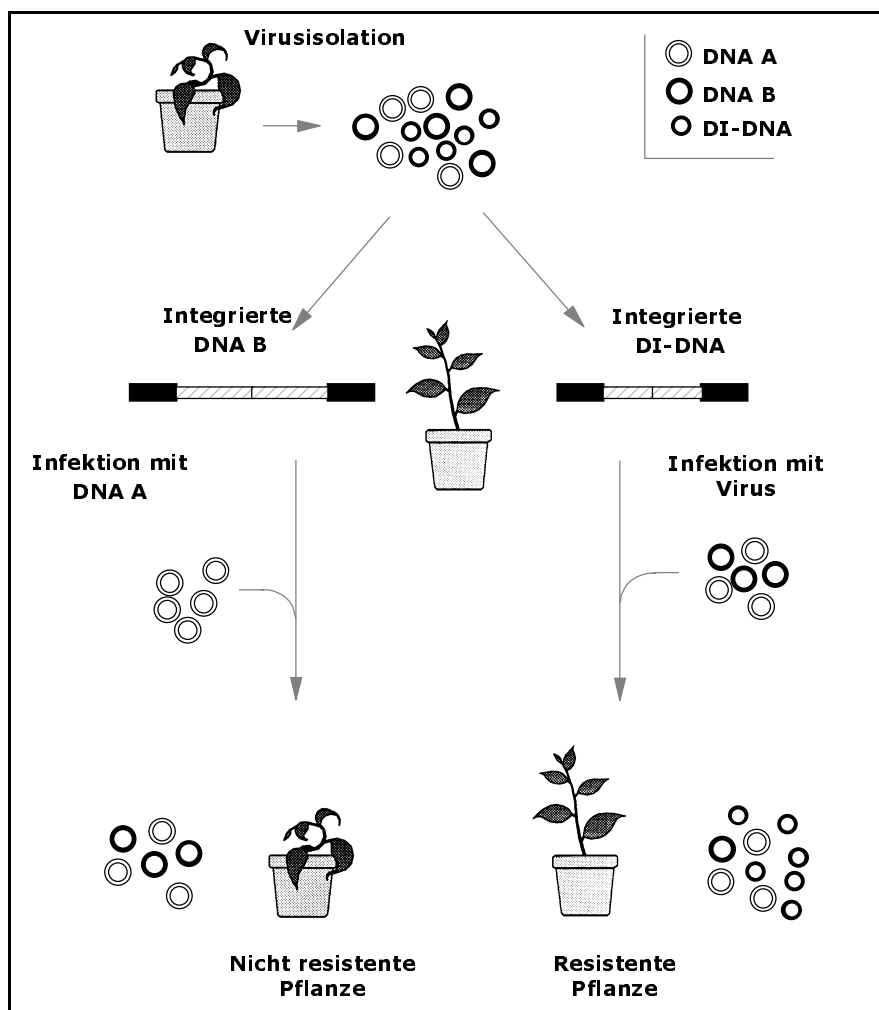


Abb.2: Schema der Experimente an transgenen Pflanzen  
links: Mobilisierung eines DNA B Dimers durch DNA A [Elmer *et al.*, 1988]  
rechts: Mobilisierung eines DI-DNA Dimers durch das infizierende Virus [Stanley *et al.*, 1990]  
weitere Erläuterungen im Text.

Elmer *et al.* wiesen nach, dass die DNA A (die sich selbständig replizieren kann, aber nicht ausbreitungsfähig ist) des Tomato Golden Mosaik Virus (TGMV) ein Dimer der TGMV DNA B (welche zur Replikation auf DNA A angewiesen ist, sich aber in der Pflanze ausbreiten kann) aus transgenen Pflanzen mobilisieren konnte. Mit DNA A inokulierte transgene Pflanzen wurden somit systemisch infiziert.

Stanley *et al.* untersuchten daraufhin 1990, ob auch ein Dimer einer DI-DNA durch Infektion der Pflanzen mit Virus mobilisiert werden könnte. Die Gruppe untersuchte *N. benthamiana* Pflanzen, die mit einem Dimer der DI-DNA von ACMV transformiert wurden (Abb.2; rechter Teil). Nach Infektion mit ACMV entwickelten die transgenen Pflanzen schwächere Symptome; der Gehalt an viraler DNA wurde reduziert. Die subgenomische DNA von ACMV verhielt sich als DI-DNA, wurde aus dem Pflanzengenom mobilisiert und reduzierte die Menge an Virus-DNA, wobei die DNA B zu einem weit größeren Anteil reduziert wurde, als DNA A [Stanley *et al.*, 1990]. Diese disproportionale Reduktion von DNA A und B scheint auf der geringeren Neuinfektion von Zellen zu beruhen: normalerweise wird die virale DNA zu einem so hohen Anteil repliziert, daß sichergestellt ist, daß infizierte Zellen beide DNA Komponenten erhalten. Im frühen Infektionsstadium in transgenen Pflanzen reduziert die DI-DNA beide Komponenten gleich stark, so daß die Wahrscheinlichkeit wächst, daß infizierte Zellen nur noch eine DNA Komponente erhalten. DNA A kann in diesen Zellen noch weiter replizieren, DNA B jedoch nicht. Somit wird die DNA A zur vorherrschenden Form. Da DNA B für die Symptomausprägung verantwortlich ist, verursacht die drastische Reduzierung an DNA B wohl die schwächeren Symptome [Frischmuth und Stanley, 1991].

Die Resistenzwirkung der DI-DNA bei Geminiviren beruht auf folgendem Mechanismus:

Transgene Pflanzen, die ein Dimer- bzw. Bitmer-Konstrukt einer DI-DNA in ihrem Genom inseriert haben, können diese DI-DNA nach Infektion mit dem entsprechenden Elternvirus mobilisieren. Das Rep Protein des Elternvirus repliziert die transgene DI-DNA *in trans* über den rolling-circle Mechanismus [Stenger *et al.*, 1991]. Es entstehen zirkuläre DI-DNAs, deren Replikation auf Kosten der viralen Replikation verläuft, was die Virusvermehrung in der Pflanze hemmt. Da die DI-DNA Moleküle kleiner als das Elternvirus sind, werden sie schneller repliziert. Der Gehalt an viraler DNA sinkt, die Infektion verläuft schwächer und manifestiert sich später, als in nichttransgenen Kontrollpflanzen.

Der Schutz durch DI-DNA ist auf eng verwandte Viren beschränkt, die kompatible *trans*-replizierende Proteine exprimieren. Eine DI-DNA von ACMV-Kenia schützt vor dem Kenianischen und Nigerianischen Isolat (welche Pseudorekombinanten bilden können), aber nicht gegen TGMV und BCTV [Stanley *et al.*, 1990]. Das Rep Protein bindet an die intergene Region, und diese Interaktion ist hochspezifisch für das jeweilige Virus [Stenger, 1998; Fontes *et al.*, 1992; Lazarowitz *et al.*, 1992]. Da die Interaktion des Rep-Protein mit der intergenen Region sequenzspezifisch ist, sind verwandtschaftlich entfernte Viren nicht in der Lage, die transgene DI-DNA des ACMV aus dem Pflanzengenom zu mobilisieren. Diese Untersuchungen wurden auch auf die monopartiten Geminiviren ausgeweitet.

BCTV infizierte Pflanzen weisen eine ganze Reihe von subgenomischen DNAs von ca. 800 bp bis 1800 bp Länge auf [Frischmuth und Stanley, 1992; Stenger, 1995; Stenger *et al.*, 1992]. In transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, die mit einer dieser subgenomischen DNAs transformiert wurden, konnten nach Infektion mit BCTV schwächere Symptome und eine langsamere Symptomentstehung beobachtet werden [Frischmuth und Stanley, 1994; Stenger, 1994]. Damit verhält sich die subgenomische DNA des BCTV als DI-DNA. Entscheidend für die Funktionalität des Transgens ist die Anwesenheit zweier Replikationsursprünge. Nur solche DI-DNA-Konstrukte können mobilisiert werden. Die Länge der dabei eingesetzten subgenomischen DNA scheint eine entscheidende Rolle für die Resistenzvermittlung zu spielen [Frischmuth *et al.*, 1997]. Am geeignetsten haben sich DI-DNAs erwiesen, die etwa die halbe Genomlänge des Elternvirus umfassen.

## 2.) Expression von Antisense-Sequenzen

Regulatorische Antisense-Sequenzen treten in Prokaryonten auf. Die molekularbiologische Technik benutzt diese Sequenzen, um die Expression bestimmter eukaryontischer Gene in Pflanzen und Tieren zu unterdrücken [van der Krol *et al.*, 1988; Mol *et al.*, 1990].

Der zugrundeliegende Mechanismus beruht auf der Transkription einer Antisense-Sequenz, was zur Bildung von Antisense-RNA führt. Diese Antisense-RNA kann mit komplementärer mRNA Hybride bilden, was zur Ausschaltung der jeweiligen RNA führt. Als Folge fällt ein Genprodukt aus. Ist diese Antisense-Sequenz z.B. gegen ein virales Gen gerichtet, kann die Virusvermehrung unterbunden werden.

Antisense Strategien wurden am Begmomo-virus Tomato Golden Mosaik Virus (TGMV) untersucht [Day *et al.*, 1991]. Zielprotein war das Rep Protein, welches für die Virusreplikation essentiell ist und eine geringe Expressionsrate aufweist. Tabak wurde mit Konstrukten transformiert, die das Rep Gen, das TrAP Gen und das REn Gen hinter einem CaMV 35S Promotor in Sense- und Antisense-Orientierung enthielten. Nach Agroinokulation mit TGMV zeigten die meisten Antisense-Linien eine Reduktion symptomtragender Pflanzen, verglichen mit nicht-transformierten und Sense-Linien. Die Symptome waren in der Regel schwächer. Die Zahl asymptomatischer Pflanzen korrelierte mit dem Gehalt an Antisense-RNA, die in der jeweiligen Pflanze gebildet wurde. Viele symptomlose Pflanzen (Transgene und Kontrollen) hatten einen hohen Gehalt an viraler DNA, was vermuten läßt, daß entweder ein Schwellenwert an Virus erreicht werden muß, um Symptome zu verursachen, oder daß der Zeitpunkt der Virusakkumulation während der Gewebeentwicklung wichtig ist [Day *et al.*, 1991].

Die molekulare Ebene, auf der die Resistenz beruht, ist die Virusreplikation. Das Rep Protein leitet die virale DNA-Replikation ein; wird es nicht exprimiert, kann so die Virusvermehrung verhindert werden [Elmer *et al.*, 1988; Briddon *et al.*, 1989; Etesami *et al.*, 1991; Sung und Coutts, 1995; Liu *et al.*, 1998].

Die Spezifität des Schutzes vor Infektion wurde an Blattscheibentests untersucht. Transgene Blätter, die ein TGMV Antisense-Konstrukt trugen, wurden mit ACMV DNA A und BCTV inokuliert. Der BCTV Gehalt wurde verringert, während die ACMV Replikation nicht beeinflusst wurde. Ursache dafür scheint in der Verteilung homologer Sequenzbereiche zu liegen. Die Sequenzhomologie von TGMV mit ACMV bzw. TGMV mit BCTV ist zwar ähnlich (63%), doch zwischen TGMV und BCTV bestehen hohe Homologien in einem sonst eher variablen DNA Bereich, während sich die Homologie zwischen TGMV und ACMV über den gesamten Genombereich erstreckt. Dies erlaubt die Vermutung, daß ein kleiner, hoch homologer Sequenzbereich zur effektiven Suppression des Zielgens erforderlich ist.

### 3.) Expression verschiedener Virusproteine

Für Geminiviren wurden bisher die folgenden Strategien verfolgt: Expression des Rep Proteins und Expression des Transportproteins.

Hong und Stanley exprimierten 1996 das ACMV Rep Protein bzw. N-terminale Bereiche des Rep Proteins in Protoplasten aus *N. tabacum*. Sie beobachteten eine deutliche Reduktion der Virus-Replikation. *N. benthamiana* Pflanzen, die mit der codierenden AC1 Sequenz von ACMV transformiert wurden, wiesen einen gewissen Grad an Resistenz gegen ACMV auf. Der Großteil der Pflanzen blieb symptomfrei oder entwickelte verspätete und mildere Symptome und wies geringere Mengen an viraler DNA auf. Keine der transformierten Linien war gegen eine Infektion mit TGMV oder BCTV geschützt.

Zwei mögliche Resistenzmechanismen werden aufgrund der Multifunktionalität des Rep Proteins diskutiert: Rep ist nicht nur essentiell zur Virus-Replikation, sondern kontrolliert auch die Genexpression der Komplementärstrang-Gene [Fontes *et al.*, 1992; 1994a; 1994b].

Bei konstitutiver Expression von Rep Protein könnte die Bindung an den Replikationsursprung nicht mehr geregelt werden. Die Synthese von viraler DNA über den rolling-circle Mechanismus wäre unterbrochen bzw. die virale Genexpression wäre durch Konkurrenz um Bindestellen an zellulären Transkriptionsfaktoren behindert.

Auf der anderen Seite könnte die konstitutive Expression von Rep Protein in der viralen DNA vermehrt zu Einzelstrangbrüchen führen, die das Protein an möglichen Sequenzmotiven setzt. Die Stabilität der viralen DNA wäre so nicht mehr gewährleistet.

Die Arbeitsgruppe Brunetti *et al.* transformierte 1997 Tomaten mit einem Fragment des Rep Protein des Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV). Transgene Pflanzen entwickelten zwar einen „gekräuselten“ Phänotyp, waren aber resistent gegenüber TYLCV. Die Autoren bewiesen, dass die Expression des Rep Protein Fragments essentiell zum Schutz vor der Infektion war. Die Rep-Fragment-exprimierenden Pflanzen waren jedoch anfällig gegenüber der Infektion mit Tomato Leaf Curl Virus (ToLCV-Au). Brunetti *et al.* diskutieren ebenfalls zwei mögliche Resistenzmechanismen: entweder konkurriert das Rep Fragment mit dem Wildtyp Rep Protein um die Bindestellen an der viralen DNA und beeinträchtigt so deren Replikation. Da das Rep Protein als Oligomer arbeitet [Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995] könnte das Fragment mit dem Wildtyp Protein aber auch ein nicht-funktionales Heteromer bilden. Zusätzlich könnte das Rep Fragment auch die Transkription des viralen C1 durch Bindung an die

Erkennungssequenzen des Promotors unterbinden [Fontes *et al.*, 1992; Sunter *et al.*, 1993; Eagle *et al.*, 1994; Hong und Stanley, 1995].

Auch die Expression von BC1 führte in transgenen Pflanzen zur Resistenz gegen Geminiviren. Duan *et al.* transformierten 1997 Tabak mit diesem Gen des Tomato Mottle Virus (TMoV).

Nur einige transgene Pflanzen, die ein spontan mutiertes BC1 Protein exprimierten, zeigten einen resistenten Phänotyp nach TMoV Infektion. Sie waren entweder symptomfrei, oder erholten sich nach dem Ausbruch milder Symptome zusehends. Die Menge an TMoV DNA in den Pflanzen war reduziert. Eine TMoV hoch-resistente Tabaklinie wurde auch mit Cabbage Leaf Curl Virus (CabLCV) infiziert. Viele der Testpflanzen zeigten keine Symptome, bzw. verspätete, schwache Symptome. In inokulierten Blättern konnte virale replikative DNA nachgewiesen werden, während jüngere symptomlose Blätter virusfrei waren. Die Autoren vermuteten, dass die Resistenz durch das mutierte BC1 Protein durch Unterdrückung der systemischen Ausbreitung der Viren in der Pflanze erreicht wird.

#### 4.) Beurteilung der molekularbiologischen Ansätze

- DI-DNA Strategie:

Vorteilhaft ist, daß keine Genexpression in den transgenen Pflanzen nötig ist. In gesundem Gewebe bleibt das Transgen „stumm“ - erst in infizierten Zellen erfolgt die Mobilisierung des Transgens. Passagiert man das Virus von einer transgenen Pflanze zur nächsten, so wird der Virustiter „herunter getriggert“, was die Infektivität von Mal zu Mal verschlechtert

Da DI-DNAs in der Natur überall auftreten, liegt die Annahme nahe, daß sie als Regulatoren der Virusvermehrung dienen, die den Krankheitsverlauf im natürlichen Kreislauf so drosseln, daß eine effiziente Übertragung von Pflanze auf Pflanze durch das Überträgerinsekt möglich bleibt. Dadurch entfällt der Selektionsdruck auf das Virus - es bleibt eine natürlich vorkommende Population des Virus bestehen, kein Virusstamm wird vorherrschend.

Ein Nachteil besteht in den hochspezifischen Wechselwirkungen während der Virusreplikation. Die DI-DNA wird so nur gegen eng verwandte Virusstämme schützen können.



- Antisense-Strategie:

Vorteilhaft ist, daß die Anwendungsmöglichkeit auf ein breites Spektrum von Geminiviren angelegt ist und in allen Subgruppen generell möglich ist.

Da jedoch der Grad an Schutz mit der Höhe der Expression verknüpft scheint, müssen hohe Expressionslevel in den betreffenden Geweben sichergestellt werden.

- Expression von Virusproteinen:

Auch hier liegt der Vorteil der Methode darin, dass sie prinzipiell für jedes Geminivirus anwendbar ist. Schon Teile der Proteine lassen sich zur Resistenzvermittlung einsetzen.

Wie sich zeigte, hing der Resistenzgrad jedoch ebenfalls mit der Höhe des Expressionslevels der Proteine zusammen. Somit müssen in den betreffenden Geweben einerseits so hohe Proteinmengen produziert werden um den Schutz zu gewährleisten, andererseits dürfen keine für die Pflanze toxischen Mengen erreicht werden.

Die Expression des Rep Proteins erlaubt nur eine spezifische Wirkung gegen eng verwandte Viren. Ein breiteres Wirkungsspektrum scheint hingegen die Expression des Transportproteins zu vermitteln.

## **2. Ziel der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung der Anwendbarkeit der DI-DNA vermittelten Resistenz gegen das Beet Curly Top Virus BCTV in der Zuckerrübe.

Durch konventionelle Züchtungsprogramme konnten BCTV-resistente Zuckerrüben erhalten werden. In den letzten Jahren traten jedoch wieder vermehrt Infektionen mit BCTV in verschiedenen Anbaugebieten der USA auf. Dies bedeutet, dass resistenzbrechende Stämme des BCTV aufgetreten sind. Eine Alternative zur Züchtung neuer resistenter Linien stellt die pathogenvermittelte Resistenz in transgenen Pflanzen dar.

An *Nicotiana benthamiana* Pflanzen konnte gezeigt werden, daß Pflanzen, die mit einer subgenomischen DNA von BCTV-Cal transformiert wurden, nach Infektion schwächere Symptome entwickelten, zudem erfolgte die Symptomentwicklung verzögert [Frischmuth und Stanley, 1994].

Das Konstrukt, das zur Resistenz in *N. benthamiana* führte, wurde zur Transformation von Zuckerrüben verwendet. Die Transformationen erfolgten bei der Fa. Planta, Einbeck, die dieses Projekt in Kooperation mit der Abt. Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Uni Stuttgart bearbeitet. Erhaltene transgene Linien sollen für Resistenztests eingesetzt werden.

Das zweite Ziel der Arbeit sind Untersuchungen zur Diversität des BCTV in Anbaugebieten im US-Bundesstaat Idaho. Dazu wurden Blattproben verschiedener Standorte gesammelt. Diese sollten auf Infektion mit BCTV untersucht werden und durch Klonierung und Sequenzierung die Diversität festgestellt werden.

## **II. Material und Methoden**

Wenn nicht anders angegeben, so wurden alle Chemikalien in „p.a.“ Qualität eingesetzt. Das verwendete Wasser wurde in einer Nanopore Wasseraufbereitungsanlage (Barnstead) demineralisiert und bei 121°C und 1 bar für 20 Minuten autoklaviert. Alle Lösungen wurden ebenfalls sterilisiert. Eine ausführliche Liste aller Chemikalien und Geräte befindet sich im Anhang (V.5.6 und V.5.7).

### **1. Bakterien und Plasmide**

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

*Escherichia coli* K12 JM83 ( $\lambda^-$ , ara $\Delta$ (pro-lac) rpsL thi phi 80 d  
lacZ $\Delta$ M15 $\lambda^-$  strA)

*Agrobacterium tumefaciens* PGV

*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (GV3101, Plasmid pMP90RK)

Diese Plasmide wurden eingesetzt:

pBluescript KS+ (2961 bp, f1(+)<sub>origin</sub>, ColE1, LacZ, MCS, Amp<sup>R</sup>)

pBin19 (10 kb, Neo<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, lacZ $\alpha^+$ )

BCTV1.2 pBin (pBin19 mit BCTV-Cal Bitmer Konstrukt)

Plasmide und Konstrukte finden sich im Anhang (V.5.1).

### **2. Virusisolate aus den USA**

Es standen 114 - vermutlich mit BCTV-infizierte Pflanzenproben aus den USA zur Verfügung, die mir freundlicherweise von J.R. Stander, Fa. Betaseed Inc., Kimberley, Idaho überlassen wurden. Diese stammten aus verschiedenen Zuckerrübenanbaugebieten in Idaho. Aus dem Blattmaterial wurde Gesamt-DNA extrahiert (II.5.2/5.2.1), auf BCTV-Gehalt hin untersucht (II.6.2/7.4) und zur gesamt-genomischen Virus-Klonierung (II.4.) verwendet.

### 3. Pflanzenmaterial

Für die Experimente wurde die Pflanze *Beta vulgaris* var. *altissima* (Zuckerrübe) verwendet. Es wurden sowohl konventionelle Zuchtlinien

3H 9727 (resistente Anbausorte)

4F 0007 (sensitive Anbausorte)

2R 7629 (sensitive Anbausorte)

als auch transgene DI-DNA-tragende Linien verwendet (Tab.2)

Zu Beginn meiner Arbeit standen bereits Kreuzungslinien aus der F<sub>0</sub>-Generation zur Verfügung. Es wurden insgesamt 8 Transformanten erzeugt. Die Bezeichnung dieser F<sub>0</sub>-Transformanten lautet: VC3-3, VC3-6, VC3-7, VC3-8, VC12-1, VC14-1, VC14-2, VC14-3. Alle für meine Untersuchungen verwendeten Linien stammen von diesen Ausgangstransformanten ab.

Tab.2: Untersuchte F<sub>1</sub>-Linien

Name <sup>1</sup>	Art der Erzeugung <sup>2</sup>	Abstammung <sup>3</sup>
61061 T	Selbstungslinie	VC3-8
66061 J	Hybridlinie	2R 7629 x VC3-8
71031 T	Selbstungslinie	<b>VE-2423T6</b> _VC3-3
71032 T	Selbstungslinie	<b>VE-2424T6</b> _VC3-6
71033 T	Selbstungslinie	<b>VE-2425T6</b> _VC3-7
71034 T	Selbstungslinie	<b>VE-2376T6</b> _VC3-8
71036 K	Selbstungslinie	VE-VC14-1
71037 K	Selbstungslinie	VE-VC14-2
71038 K	Selbstungslinie	VE-VC14-3
76031 J	Hybridlinie	<b>(C98*C89) # (2423T6</b> _VC3-3)
76032 J	Hybridlinie	<b>(C98*C89) # (2424T6</b> _VC3-6)
76033 J	Hybridlinie	<b>(C98*C89) # (2425T6</b> _VC3-7)
76034 J	Hybridlinie	<b>(C98*C89) # (2376T6</b> _VC3-8)
76036 J	Hybridlinie	<b>(C98*C89) #</b> VE-VC14-1
76037 J	Hybridlinie	<b>(C98*C89) #</b> VE-VC14-2
76038 J	Hybridlinie	<b>(C98*C89) #</b> VE-VC14-3
84107 K	Hybridlinie	<b>S1-(D106) *</b> (VC3-6)
84111 K	Hybridlinie	<b>S1-(D106) *</b> (VC3-6)
84101 T	Hybridlinie	<b>S1-(R13) *</b> (VC3-3)
84104 T	Hybridlinie	<b>S1-(R13) *</b> (VC3-6)
84116 T	Hybridlinie	<b>S1-(R12) *</b> (VC3-8)
84118 T	Hybridlinie	<b>S1-(R12) *</b> (VC3-8)
84124 T	Hybridlinie	<b>S1-(R13) *</b> (VC3-8)

Name <sup>1</sup>	Art der Erzeugung <sup>2</sup>	Abstammung <sup>3</sup>
84137 T	Hybridlinie	<b>S1-(R20)</b> * (VC14-1)
84142 T	Hybridlinie	<b>S1-(R13)</b> * (VC14-2)
84147 T	Hybridlinie	<b>S1-(R13)</b> * (VC14-2)
84151 T	Hybridlinie	<b>S1-(R20)</b> * (VC14-2)
84164 T	Hybridlinie	<b>S1-(R13)</b> * (VC14-3)

<sup>1</sup>: interne Bezeichnung der Fa. Planta

<sup>2</sup>: beschreibt die Art der Erzeugung der Linien

<sup>3</sup>: Beschreibung der beiden Kreuzungspartner, wobei die **fett** gekennzeichnete Nummer eine interne Bezeichnung der Linien der Fa. Planta ist.

Neben diesen Kreuzungslinien wurden auch doppelhaploide Pflanzen von der Firma erzeugt (Tab.3):

Tab.3: Doppelhaploide Pflanzen zur Resistenzbestimmung

Name <sup>1</sup>	Abstammung <sup>2</sup>
GCT 207 OV1	<b>(D106)</b> * (VC3-6)
GCT 218 OV4	<b>(R20)</b> * (VC3-6)
GCT 406 OV1	<b>(R12)</b> * (VC3-8)
GCT 612 OV9	<b>(R13)</b> * (VC14-2)
GCT 616 OV5	<b>(R20)</b> * (VC14-2)
GCT 619 OV8	<b>(R20)</b> * (VC14-2)
GCT 704 OV5	<b>(R20)</b> * (VC14-3)
GCT 201 OV3	<b>(C89)</b> * (VC3-6)
GCT 212 OV1	<b>(D106)</b> * (VC3-6)
GCT 214 OV3	<b>(R13)</b> * (VC3-6)
GCT 217 OV1	<b>(R13)</b> * (VC3-6)
GCT 218 OV1	<b>(R20)</b> * (VC3-6)
GCT 219 OV5	<b>(R20)</b> * (VC3-6)
GCT 222 OV1	<b>(R20)</b> * (VC3-6)
GCT 302 OV3	<b>(R20)</b> * (VC3-7)
GCT 302 OV5	<b>(R20)</b> * (VC3-7)
GCT 302 OV6	<b>(R20)</b> * (VC3-7)
GCT 403 OV13	<b>(R12)</b> * (VC3-8)
GCT 406 OV15	<b>(R12)</b> * (VC3-8)
GCT 408 OV17	<b>(R13)</b> * (VC3-8)
GCT 417 OV2	<b>(R20)</b> * (VC3-8)
GCT 419 OV4	<b>(R20)</b> * (VC3-8)
GCT 421 OV1	<b>(R20)</b> * (VC3-8)
GCT 421 OV2	<b>(R20)</b> * (VC3-8)

Name <sup>1</sup>	Abstammung <sup>2</sup>
GCT 423 OV1	<b>(R20)</b> * (VC3-8)
GCT 502 OV5	<b>(R20)</b> * (VC14-1)
GCT 503 OV5	<b>(R20)</b> * (VC14-1)
GCT 602 OV6	<b>(R13)</b> * (VC14-2)
GCT 603 OV17	<b>(R13)</b> * (VC14-2)
GCT 607 OV5	<b>(R13)</b> * (VC14-2)
GCT 608 OV2	<b>(R13)</b> * (VC14-2)
GCT 613 OV1	<b>(R13)</b> * (VC14-2)
GCT 620 OV1	<b>(R20)</b> * (VC14-2)
GCT 622 OV8	<b>(R20)</b> * (VC14-2)
GCT 701 OV11	<b>(D106)</b> * (VC14-3)
GCT 703 OV5	<b>(R13)</b> * (VC14-3)
GCT 703 OV17	<b>(R13)</b> * (VC14-3)
GCT 704 OV3	<b>(R20)</b> * (VC14-3)
GCT 704 OV20	<b>(R20)</b> * (VC14-3)
MUF 7S2894	keine Angaben
MUF 7S2905	keine Angaben
MUF 7S3061	keine Angaben
MUF 7S3067	keine Angaben
MUF 7B6111	keine Angaben

<sup>1</sup>: interne Bezeichnung der Fa. Planta

<sup>2</sup>: Beschreibung der beiden Kreuzungspartner, wobei die **fett** gekennzeichnete Nummer eine interne Bezeichnung der Linien der Fa. Planta ist.

## **4. Klonierung**

### **4.1. Anzuchtmedien für Bakterien**

Lauria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium):

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefe Extrakt  
10 g Natriumchlorid     ad 1 Liter, pH 7,0

Lauria-Bertani-Agarplatten:

Zugabe von 15 g Agar pro 1 Liter Medium.

Antibiotikazugabe:

Ampicillin 200 µg/ml  
Kanamycin 50 µg/ml  
Kanamycin + Rifampicin je 50 µg/ml  
Rifampicin 50 µg/ml

Die Antibiotika wurden erst nach Abkühlen der Medien auf ca. 55°C zugegeben.

Blue/White-Medium:

Auf eine LB-Agarplatte wurden 40 µl 2% X-Gal Lösung in DMF und 10 µl 2% IPTG pipettiert und mit einem sterilen Drygalskyspatel auf der Platte verteilt.

#### **4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* JM83 Zellen**

0,1 M Calciumchloridlösung

50 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* JM83 beimpft und im Schüttelwasserbad bei 37°C und 170 Upm für 16 Stunden inkubiert. 500 µl der Übernachtskultur wurden in 50 ml frisches LB-Medium überimpft. Nach 2,5 Stunden Wachstum bei 37°C und 170 Upm wurden die Zellen geerntet. Die Kultur wurde in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt und für 5 Minuten bei 3000 Upm (2100 g) und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen. Das Zellsediment wurde in 10 ml 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation (s.o.) sedimentiert und in 5 ml 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert. Die so vorbereiteten Zellen konnten dann für maximal fünf Tage zur Transformation verwendet werden.

#### 4.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* JM83 Zellen

Zur Transformation wurden 10 µl Ligationsansatz (II.8.5) mit 300 µl chemisch kompetenten Zellen (II.4.1.1) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß versetzt und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Nach Inkubation der Zellen auf Eis für 45-50 Minuten erfolgte die Hitzeschockaktivierung durch Inkubation bei 42°C für 2 Minuten im Schüttelwasserbad. Die Zellen wurden anschließend sofort auf Eis überführt, dort mit 1 ml LB-Medium vermischt und zur Regeneration bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13000 Upm (13700 g) für 1 Minute wurde der Überstand mit der Pipette bis auf 100 µl abgenommen, die Zellen wurden in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit dem betreffenden Anitibiotikum plattiert und bis zum nächsten Tag im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bewachsene Platten konnten im Kühlschrank bei ca. 7°C über mehrere Wochen aufbewahrt werden.



## **5. DNA-Präparation**

### 5.1. Lösungen zur DNA-Extraktion aus Bakterien

MixI:                    0,9 ml 20% Glucose, sterilfiltriert  
                           2 ml 100 mM EDTA pH 7,5  
                           0,5 ml 1 M Tris HCl pH 7,5  
                           16,6 ml Wasser  
                           2-10 mg Lysozym (frisch vor Gebrauch dazu)

MixII:                1 ml 2 M Natronlauge  
                           1 ml 10% SDS  
                           8 ml Wasser

MixIII:                3 M Natriumacetat pH 4,8

Phenol-Chloroform-Lösung (1:1, v/v)  
                           250 ml Trispuffer-gesättigtes Phenol  
                           250 ml Chloroform p.a  
                           wurden gemischt und über Nacht stehen gelassen, bis  
                           sich zwei Phasen gebildet hatten.

2-Propanol

Cäsiumchlorid

Ethidiumbromidlösung (10g/l)

Cäsiumchlorid-gesättigtes 2-Propanol

100% Ethanol

70% Ethanol

10x TE-Puffer:      100 mM Tris HCl  
                           10 mM EDTA pH 8,0

RNAse A-Lösung (1µg/µl)

#### 5.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* JM83 im kleinen Maßstab (Minipräp)

Die Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly, 1979.

Eine 5 ml Reagenzglaskultur der zu untersuchenden Kolonie wurde in LB-Medium (II.4.1) mit dem entsprechenden Antibiotikum beimpft und für 16 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde auf dem Laborschüttler kurz durchmischt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 13000 Upm (13700 g) für 1 Minute wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment mit 100 µl MixI versetzt. Nach gründlicher Resuspension wurden die Zellen 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl MixII und Inkubation bei 4°C für 5 Minuten erfolgte die Auflösung der Zellmembranen durch SDS und die alkalische Denaturierung zellulärer Bestandteile (Proteine, Zellmembranen, usw.). Die Zelltrümmer wurden schließlich durch Zugabe von 150 µl MixIII und Inkubation bei 4°C für weitere 5 Minuten gefällt. Nach Zentrifugation bei 14000 Upm (20800 g) für 10 Minuten wurde der klare Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit 200 µl Phenol-Chloroform versetzt. Nach kräftigem Mischen wurde der Ansatz bei 14000 Upm (20800 g) für 2 Minuten zentrifugiert. Dabei entmischte sich die Suspension, die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, die organische Phase in den Phenol-Chloroform Abfall entsorgt. Durch Zugabe von 800 µl 100% Ethanol und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DNA gefällt. Nach Zentrifugation bei 14000 Upm (20800 g) für 10 Minuten wurde ein weißer Niederschlag erhalten, der in 200 µl 70% Ethanol gewaschen wurde. Nach Abziehen des Überstandes mit der Pipette wurde die DNA in einer Vakuum-Tischzentrifuge getrocknet und in 30 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen. Die ebenfalls mitpräparierte RNA wurde durch Zugabe von 1 µl RNase A (Konzentration: 1 µg/µl) und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Die DNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

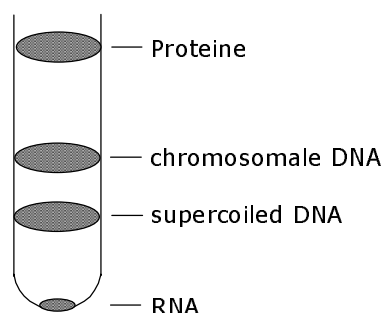
#### 5.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* JM83 im großen Maßstab (Maxipräp) mittels Cäsiumchloriddichtegradientenzentrifugation

Die Präparation erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift in Sambrook *et al.*, 1989.

Eine 500 ml LB-Flüssigkultur mit entsprechendem Antibiotikum wurde beimpft und bei 37°C für 16 Stunden im Schüttler inkubiert. Zur Zellernte

wurde die Übernachtskultur für 10 Minuten bei 5000 Upm (4225 g) im GS3 Rotor (Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zentrifugenbecher wurden zum vollständigen Entleeren über Kopf auf Papier gestellt. Das Zellsediment wurde mit der Pipette in 6 ml MixI gelöst, in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt und für 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 12 ml MixII wurden dazugegeben, das Gefäß zum Mischen vorsichtig mehrmals invertiert und für 5 - 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Inkubationszeit mußte strikt eingehalten werden, da bei längerer Inkubation SDS ausgefallen wäre. Nach Zugabe von 16 ml MixIII und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 15 Minuten auf Eis gehalten. Die Abtrennung der DNA von den Zelltrümmern erfolgte durch 30 minütige Zentrifugation bei 4000 Upm (3800 g) und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt, welches zur Fällung der Plasmid-DNA mit 2-Propanol aufgefüllt und über Nacht bei -20°C gehalten wurde.

Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation bei 4000 Upm (3800 g) und 4°C für 10 Minuten sedimentiert und in 10 ml 1 x TE-Puffer gelöst. Für die Ultrazentrifugation wurde die Lösung genau ausgewogen und die exakt gleiche Menge an Cäsiumchlorid hinzugegeben, was einer genau 50% (w/w) Lösung entspricht. Nachdem das Salz vollständig gelöst war, konnten 150 µl Ethidiumbromidlösung (Konzentration: 10 g/l) zupipettiert werden. Diese Lösung wurde dann in ein verschweißbares



Ultrazentrifugationsröhrchen mittels Pasteurpipette überführt. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 50000 Upm und 18°C für 16 - 18 Stunden

(Rotor VTI 65.1).

Nach der Ultrazentrifugation entstand folgendes Bandenmuster:

Die Isolation der supercoiled-DNA erfolgte durch vorsichtiges Abziehen mit einer Spritze. Sie wurde in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt und mit Cäsiumchlorid-gesättigtem 2-Propanol ausgeschüttelt. Dabei ging Ethidiumbromid aus der wässrigen Phase in die organische Phase über. Die Extraktion wurde solange wiederholt, bis die wässrige DNA-Phase keine Rotfärbung mehr aufwies. Zur DNA-Phase wurde dann das dreifache Volumen Wasser gegeben und gemischt. Die Zugabe des doppelten Volumens 100% Ethanol diente zur Fällung der DNA bei -20°C über Nacht.

Die gefällte Plasmid-DNA wurde bei 4000 Upm (3800 g) und 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert, dann zweimal in je 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde dann in 500 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt (II.5.3). Die DNA konnte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

### 5.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* JM83 im großen Maßstab (Maxipräp) über Nucleobond AX500 Säulen

Alle verwendeten Lösungen wurden im Nucleobond AX500-Kit (Macherey und Nagel) mitgeliefert. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Eine 500 ml LB-Flüssigkultur mit entsprechendem Antibiotikum wurde beimpft und bei 37°C für 16 Stunden im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 Upm (4225 g) und 4°C für 15 Minuten (GS3 Rotor) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien wurden in 12 ml S1 Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 12 ml S2 Puffer wurde die Suspension vorsichtig durch Invertieren des Röhrchens gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 12 ml S3 Puffer hinzugegeben, vorsichtig gemischt bis eine homogene Suspension entstanden war und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Im SS34 Rotor wurde der Ansatz bei 11000 Upm (12000 g) und 4°C für mindestens 40 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf die vorbereitete Säule gegeben.

Während des letzten Zentrifugationsschritts wurde die Säule äquilibriert. Dazu wurden 5 ml N2 Puffer aufgetragen und durchtropfen lassen. Sobald der Puffer durchgelaufen war, wurde der Überstand aus der Zentrifugation auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dann mit zweimal 12 ml N3 Puffer

gewaschen, die Elution der Plasmid DNA erfolgte mit 6 ml N5 Puffer. Das Eluat wurde in einem 30 ml Corex Röhrchen aufgefangen, mit 4,2 ml 2-Propanol versetzt und mit Parafilm verschlossen. Die DNA wurde bei 4°C über Nacht gefällt.

Der Ansatz wurde im SS34 Rotor bei 9000 Upm (9600 g) und 4°C für 25 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die gefällte DNA wurde in 70% Ethanol gewaschen, kurz in der Vakuum-Tischzentrifuge getrocknet und in 300 µl 1x TE-Puffer aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 260 nm (II.5.3.). Die DNA konnte bei -20°C gelagert werden.

## 5.2. Lösungen zur DNA Extraktion aus Pflanzenmaterial

Extraktionspuffer:

100 mM Tris HCl pH 7,0  
100 mM Natriumchlorid  
10 mM EDTA pH 7,0  
1% SDS

Phenol-Chloroform-Lösung (1:1,v/v)

250 ml Chloroform p.a.  
250 ml Trispuffer-gesättigtes Phenol  
wurden gemischt und über Nacht stehen gelassen, bis sich zwei Phasen gebildet hatten.

Chloroform p.a.

3 M Natriumacetat pH 4,8

vorgekühltes 2-Propanol

70% Ethanol

10x TE-Puffer: 100 mM Tris HCl  
10 mM EDTA pH 8,0

### 5.2.1 DNA-Extraktion aus Blättern und Blattscheiben

In einem sterilen Mörser wurde ca. 1 g Pflanzenmaterial in 1 ml Extraktionspuffer zermörsert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde die Suspension bei 14000 Upm (20800 g) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit 500 µl Phenol-Chloroform-Lösung versetzt und auf einem Eppendorfschüttler für 30 Minuten bei voller Geschwindigkeit gemischt. Die DNA reichte sich in der wässrigen Phase an. Um die Phasentrennung zu erreichen wurde eine Zentrifugation bei 14000 Upm (20800 g) für 5 Minuten angeschlossen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die organische dem Phenol-Chloroform Abfall zugeführt. Um Phenolreste aus der wässrigen Phase zu extrahieren wurden anschließend 500 µl Chloroform zugegeben und das Eppendorfgefäß kurz von Hand geschüttelt. Wiederum wurde eine Zentrifugation bei 14000 Upm (20800 g) für 2 Minuten angeschlossen um die Phasen zu trennen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit 100 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt. Das Eppendorfgefäß wurde dann mit vorgekühltem 2-Propanol aufgefüllt und für mehrere Stunden bei -20°C gehalten um die DNA-Fällung zu beschleunigen.

Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 Upm (20800 g) für 10 Minuten erfolgte die Pelletierung der DNA. Das Sediment wurde in 500 µl 70% Ethanol gewaschen, kurz anzentrifugiert, und nach Verwerfen des Überstandes in einer Vakuum-Tischzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl 1x TE-Puffer im Brutschrank bei 37°C für mindestens 30 Minuten gelöst. Danach wurde die Konzentration der Probe photometrisch bestimmt (II.5.3.).

### 5.2.2 DNA-Extraktion aus Protoplasten

Es wurden die gleichen Lösungen wie zur DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial verwendet (II.5.2). Die gesamte Protoplastenkultur wurde in ein 15 ml Schraubdeckelgefäß überführt und bei 4000 Upm (3800 g) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Protoplasten in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde mit 500 µl Phenol-Chloroform-Lösung versetzt, kurz von Hand geschüttelt und für 10 Minuten bei 14000 Upm (20800 g) zentrifugiert um die Phasentrennung zu erreichen. Die obere, wässrige Phase wurde in einem frischen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 500 µl Chloroform versetzt, von Hand geschüttelt und

2 Minuten bei 14000 Upm (20800 g) zentrifugiert. Nach Überführen der wässrigen Phase in ein frisches Eppendorfgefäß wurde die Chloroformbehandlung ein weiteres Mal durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 80 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt. Das Gefäß wurde mit vorgekühltem 2-Propanol versetzt und bei -20°C über Nacht eingefroren.

Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 Upm (20800 g) für 10 Minuten erfolgte die Pelletierung der DNA. Das Sediment wurde in 500 µl 70% Ethanol gewaschen, kurz anzentrifugiert, und nach Verwerfen des Überstandes in einer Vakuum-Tischzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in 30 µl 1x TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der Probe wurde nicht bestimmt. Die Probe wurde komplett zum Southern Blot (II.6.2) eingesetzt.

### 5.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Dazu wurden 1:100 Verdünnungen der DNA-Proben hergestellt und deren Optische Dichte im Gene Quant II Photometer der Firma Pharmacia ermittelt. Als Referenzwert wurde die Optische Dichte von Wasser gemessen.

Es gilt die Annahme: **1 OD<sub>260nm</sub> = 50 µg/ml DNA.**

Aus dieser Gleichung konnte dann die DNA-Konzentration der Proben berechnet werden:

$$\begin{aligned} c_{\text{DNA}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) &= \Delta\text{OD}_{260\text{nm}} \cdot 50 \mu\text{g}/\text{ml} \cdot 100 / 1000\mu\text{l}/\text{ml} \\ &= \Delta\text{OD}_{260\text{nm}} \cdot 5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

## **6. Nachweis von Nukleinsäuren**

### **6.1. Agarosegelelektrophorese**

Agarose

10x TBE-Puffer:            89 mM Tris HCl  
                                  89 mM Borsäure  
                                  500 mM EDTA pH 8,0

Ethidiumbromidlösung (10 g/l)

DNA-Größenstandard:  $\lambda$ -DNA, *EcoRI* / *HindIII* verdaut

Zur Auftrennung von DNA nach ihrer Größe und Konformation wurde die Agarosegelelektrophorese herangezogen. Es wurden im Regelfall 1%ige Agarosegele in 0,5x TBE-Puffer hergestellt. Dazu wurde die gewünschte Menge Agarose in dem entsprechenden Volumen 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Einem Analysegel wurde nach dem Aufköchen noch Ethidiumbromid zum Anfärben der DNA zugefügt. Pro 100 ml Gellösung wurden 3  $\mu$ l Ethidiumbromid Stammlösung hinzugegeben. Gele für Southern Blots (II.6.2.) wurden ohne Ethidiumbromid hergestellt.

Die Gellösung wurde unter fließendem Wasser abgekühlt und dann in Apparaturen der Firma MWG gegossen. Nach Aushärten der Gele wurde der Laufpuffer in die Kammer gegossen, sodass ca. 3 mm Puffer das Gel bedeckten. Dann konnten die Proben und der DNA-Größenstandard aufgetragen und der Gellauf gestartet werden.

Nach dem Lauf wurde das Gel unter der UV-Lampe ausgewertet. Zur Dokumentation wurden Gelphotos über eine Video-Print-Einrichtung (Fa. Mitsubishi) erstellt. Gele für den Southern Blot (II.6.2.) wurden gesondert behandelt.



## 6.2. Southern Blot

0,25 N Salzsäure

Denaturierungspuffer: 0,5 N Natronlauge  
1,5 M Natriumchlorid

Neutralisierungspuffer: 1 M Tris HCl pH 7,5  
1,5 M Natriumchlorid

20x SSC: 175,32 g Natriumchlorid  
88,2 g Natriumcitrat  
ad 1 Liter, pH 7,0

Für den Southern Blot [E.M. Southern, 1975; Vorschrift nach Sambrook *et al.*, 1989] wurden 1% Agarosegele in 0,5x TBE-Puffer ohne Zusatz von Ethidiumbromid verwendet (II.6.1). Nach dem Gellauf wurden die Geltaschen mit einem Skalpell entfernt, das Gel vermessen und die Orientierung markiert. Das Gel wurde in einer Melaninschale zunächst für 10 Minuten in 0,25 N Salzsäure auf einem Kippschüttler geschwenkt. Anschließend wurde das Gel 30 Minuten lang in Denaturierungspuffer geschwenkt. Als letzter Schritt erfolgte das Schwenken in Neutralisationspuffer für weitere 30 Minuten. Während dieser Inkubationsschritte wurden die Nylonmembran (Hybond N, Firma Amersham) und 3 Whatman 3MM Papiere auf die Gelgröße zurecht geschnitten. Ein weiteres Whatman Papier diente als Pufferbrücke zum Blotten. Sowohl Nylonmembran als auch Whatman Papiere wurden nur mit Handschuhen berührt, da sie DNA, RNA und Proteine unspezifisch binden.

Die Membran wurde kurz in sterilem Wasser angefeuchtet, dann in 10x SSC äquilibriert. Dann wurde der Southern Blot aufgebaut.

Auf eine Schale mit 10x SSC wurde eine Glasplatte gelegt, die Whatman Brücke wurde im Transferpuffer angefeuchtet und luftblasenfrei auf die Platte gebreitet, wobei ihre Enden in die Schale reichen mußten. Auf die Whatman Brücke wurde das Gel mit seiner Rückseite nach oben gelegt, die Brücke wurde um das Gel herum mit Filmstreifen oder Plastikfolie abgedeckt. Dann konnte die Membran auf die Gelfläche gelegt werden, sie wurde mit einem in 10x SSC angefeuchteten Whatman Papier bedeckt, auf dieses wurden 2 trockene Whatman Papiere gelegt. Um eine ausreichend hohe Saugkraft zu erreichen, wurden 50 - 100 Lagen saugfähiges Haushaltspapier daraufgestapelt, mit einer Glasplatte

abgeschlossen und mit Gewichten beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt, auf Whatman Papier überführt und im UV-Crosslinker fixiert. Die Membran konnte trocken aufbewahrt oder aber gleich zur Hybridisierung (II.6.3) verwendet werden.

### 6.3. DIG-Hybridisierung mit dem Boehringer-Kit

#### 6.3.1 Herstellung von markierten Proben, BCTV genomische Sonde

DIG-DNA-Labeling Kit (Fa. Boehringer, Mannheim)

0,2 M EDTA pH 8,0

4 M Lithiumchlorid

100% vorgekühltes Ethanol

Die Markierung der DNA mit Digoxigenin erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 11 µg Plasmid BCTV1.2 pBin wurden mit dem Restriktionsenzym *Sa*/I (Gibco, BRL) in Reaktionspuffer 10 für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (II.8.3). Die DNA wurde auf einem präparativen 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (II.6.1). Es entstanden 2 Banden, die ca. 12 kb Bande des pBin19 Vektors und die ca. 3 kb Bande von BCTV. Die BCTV-DNA wurde aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem Bio-Rad Kit eluiert (II.8.2).

5 µl DNA wurden mit 10 µl Wasser versetzt und im 1,5 ml Eppendorfgefäß für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Gefäß auf Eis gestellt und nacheinander 2 µl Hexanucleotidmix, 2 µl dNTP Labelingmix und 1 µl Klenow-Enzym aus dem Boehringer Kit hinzupipettiert. Die Reaktion wurde für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA pH 8 wurde die Reaktion gestoppt. Die DNA wurde durch Zugabe von 2,5 µl 4 M Lithiumchlorid und 75 µl 100% vorgekühltem Ethanol für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 14000 Upm (20800 g) für 10 Minuten wurde die DNA pelletiert, der Überstand verworfen und die DNA in 50 µl 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in der Vakuum-Tischzentrifuge getrocknet und in 50 µl 1x TE-Puffer (II.5.1) gelöst. Die hergestellte DNA-Sonde konnte bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

### 6.3.2 Hybridisierung

Hybridisierungslösung: 5x SSC  
2% Blockreagenz  
0,1% N-Lauroylsarkosin  
0,02% SDS

DIG-markierte Sonde

Waschpuffer 1: 2x SSC mit 0,1% SDS  
Waschpuffer 2: 0,1x SSC mit 0,1% SDS

Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungsröhren der Firma Biometra. Die Membranen wurden einzeln in die Röhren gegeben, sodass die Seite der Membran, an die die DNA gebunden hatte, nach innen zeigte. Zur Prähybridisierung wurden pro Röhre 25 ml Hybridisierungslösung hinzugegeben und im Hybridisierungsofen für 1 bis 2 Stunden bei 65°C inkubiert.

Vor der Hybridisierung wurde die markierte Sonde durch Hitzebehandlung denaturiert. Sie wurde für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und danach sofort auf Eis überführt. Dann wurde die Prähybridisierungslösung gegen die Lösung mit der markierten Sonde ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht für mindestens 16 Stunden.

Um die Membran gut von Sondenresten zu befreien wurden die Röhren zunächst einmal kurz mit Waschpuffer 1 gespült, dann zweimal 5 Minuten in Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur auf einem TaumelRollenmischer gewaschen. Um einen stringenten Waschvorgang zu erreichen, schloß sich daran noch ein Waschschrift in Waschpuffer 2 bei 65°C für 15 Minuten im Hybridisierungsofen an.

Die Membran wurde gleich im Anschluß dem Chemolumineszenznachweis unterzogen (II.6.4.).

#### 6.4. Chemolumineszenznachweis

- Puffer 1:           0,1 M Maleinsäure  
                      3 M Natriumchlorid  
                      pH 8,0
- Waschpuffer:       Puffer 1 mit 0,3% Tween-20
- Blockreagenz:     10% (w/v) Blockreagenz (Fa. Boehringer, Mannheim) in  
                      0,1 M Maleinsäure  
                      0,15 M Natriumchlorid  
                      pH 7,5
- Puffer 2:           Blockreagenz in Waschpuffer, Verdünnung 1 : 20
- Anti-DIG-AP-Konjugat (Fa. Boehringer, Mannheim)
- Puffer 3:           0,1 M Tris HCl pH 9,5  
                      0,1 M Natriumchlorid  
                      50 mM Magnesiumchlorid
- CSPD-Lösung:     CSPD-Substrat (Fa. Boehringer, Mannheim) in Puffer 3,  
                      Verdünnung 1 : 100

Alle nachfolgend aufgeführten Schritte wurden bei Raumtemperatur auf dem Taumel-Rollenmischer durchgeführt.

Zunächst wurde die Membran 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen, danach 1 Stunde in 40 ml Puffer 2 inkubiert. Kurz vor Verwendung wurden 0,7 µl Anti-DIG-AP-Konjugat in 10 ml Puffer 2 verdünnt (Verdünnungsfaktor 1 : 15000) und die Membran darin für weitere 30 Minuten inkubiert. Um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dann viermal 10 Minuten mit Waschpuffer versetzt. Nach Äquilibrierung in Puffer 3 für 5 Minuten erfolgte die Inkubation in 10 ml CSPD-Substratlösung für 5 Minuten. Die Membran wurde dann aus der Röhre mit Hilfe einer Pinzette entnommen, auf Whatmanpapier 3MM leicht getrocknet und in Plastikfolie eingeschweißt. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgte die Exposition auf Röntgenfilm für 1 bis 18 Stunden.

## **7. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion [Mullis *et al.*, 1986] ermöglicht es, *in-vitro* DNA zu vervielfältigen. Dazu werden kurze Oligonucleotide (sog. Primer) benötigt, die sequenzhomolog zur gewünschten DNA sind. Nach Denaturierung der DNA in Einzelstrang-DNA erfolgt die Anlagerung (Annealing) der Primer an die homologen Sequenzen. In der Verlängerungsphase (Elongationsphase) der Reaktion wird die DNA durch das Enzym *Taq* DNA Polymerase synthetisiert. Die Wiederholung dieser Schritte in mehreren Zyklen erlaubt die Vervielfältigung (Amplifikation) der DNA.

Die PCR-Methode wurde in dieser Arbeit während der unterschiedlichsten Arbeitsschritte verwendet. Zur Detektion des Transgens (II.7.2) und replikativer transgener DI-DNA (II.7.3) in Zuckerrübenlinien wurde sie ebenso eingesetzt, als auch zur Amplifikation von gesamt-genomischer Virus-DNA (II.7.4) aus infizierten Pflanzen, bzw. Teilsequenzen aus Klonen.

Tab.4: verwendete *Taq* DNA Polymerasen

<b>Firma</b>	<b>Eurobio</b>	<b>Eurogentec</b>	<b>Gibco, BRL</b>	<b>Qiagen</b>
<b><i>Taq</i>-DNA Polymerase</b>	Eurobiotaq 5 U/μl	Goldstar <i>Taq</i> 5 U/μl	rekombinant 5 U/μl	Taq 5 U/μl
<b>Reaktionspuffer</b>	10x	10x	10x	10x
<b>Magnesiumchlorid</b>	50 mM	25 mM	50 mM	50mM

Der dNTP Master Mix der Fa. Eurogentec wurde eingesetzt. Pro Nucleotid ergab sich eine Konzentration von 5 μM.

Tab.5: verwendete Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	homolog zu	Zweck	Programm (s. II.7.1)
M13 universal	GTA AAA CGA CGG CCA GT	pBluescript nt 603 - 619	Detektion des Transgens	60°C
M13 reverse	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	pBluescript nt 826 - 808 kompl.		
BCTV3	AGC AAG CTT AAT AAT ACC GGA TGG CCC	homolog zur IR von BCTV	gesamt- genomische Klonierung	48°C
BCTV5	AGC AAG CTT TAT TA (AT) (AT) (AG) C GGA TGG CCC	degenerierter Primer, homolog zur IR		
BCTV6	TTA TCT TCA GTA TTC TAC TGC	BCTV-Cal nt 336 - 356	Detektion von repli- kativer DI-DNA	60°C
BCTV7	GCA AGT TTC CTG TGG GGC ACA C	BCTV-Cal nt 236 - 215 kompl.		
BCTV14	AGC <b>GGA TCC</b> AAC CCA AAA TAA GAA TCG G	BCTV-CFH nt 2230 - 2254	<b>BamHI</b> primer, lang	65°C
BCTV15	AGC <b>GGA TCC</b> CGC TGC GCG GCC TTT TAG	BCTV-CFH nt 2235 - 2213 kompl.		

kompl. = Komplementärstrang-Orientierung

Alle Primer wurden in einer Konzentration von 20 pmol/µl eingesetzt

### 7.1. Temperaturprofile der einzelnen PCR-Programme

#### **PCR 48°C**

Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
95°C / 5'	48°C / 1'	72°C / 1'30"	1x
95°C / 1'	48°C / 1'	72°C / 1'30"	30x
95°C / 1'	48°C / 1'	72°C / 10'	1x

#### **PCR 60°C**

Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
95°C / 5'	60°C / 1'20"	72°C / 1'30"	1x
95°C / 1'	60°C / 1'20"	72°C / 1'30"	30x
95°C / 1'	60°C / 1'	72°C / 5'	1x

#### **PCR 65°C**

Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
95°C / 5'	65°C / 1'	72°C / 1'30"	1x
95°C / 1'	65°C / 1'	72°C / 1'30"	30x
95°C / 1'	65°C / 1'	72°C / 5'	1x

Die PCR-Reaktionen wurden im Touch Down Thermocycler der Firma Hybaid in 200 µl Eppendorfgefäßen durchgeführt.

Immer wiederkehrende PCR-Ansätze sind im folgenden als Pipettierschemata aufgeführt. Ein grundlegendes, allgemeines PCR Schema wird ebenfalls angegeben. Hatten sich für spezielle PCR Ansätze Änderungen der Zusammensetzung ergeben, so sind diese im Ergebnisteil vermerkt.

### 7.2. Detektion des Transgens, 60°C

- 2 µl Pflanzen DNA
- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 2,5 µl Magnesiumchlorid, 50 mM
- 2 µl dNTPs
- 2 µl M13 reverse Primer
- 2 µl M13 universal Primer
- 0,5 µl *Taq* Polymerase
- 34 µl Wasser

### 7.3. Detektion von replikativer DI-DNA, 60°C

2 µl Pflanzen DNA  
5 µl 10x Reaktionspuffer  
4 µl Magnesiumchlorid, 50 mM  
2 µl dNTPs  
1 µl BCTV 6 Primer  
1 µl BCTV 7 Primer  
0,25 µl *Taq* Polymerase  
34,75 µl Wasser

### 7.4. Amplifikation von gesamt-genomischer Virus-DNA, 65°C

1 µl Pflanzen DNA  
5 µl 10x Reaktionspuffer  
2 µl Magnesiumchlorid, 50 mM  
2 µl dNTPs  
1 µl BCTV 14 Primer  
1 µl BCTV 15 Primer  
0,5 µl *Taq* Polymerase  
38,5 µl Wasser

Die erhaltenen PCR Produkte wurden dann mittels Restriktionsverdauung (II.8.3.) bzw. Analyse auf Agarosegelen (II.6.1.) weiter untersucht. Sie wurden ohne Zusatz von Stoppuffer (II.8.) bei -20°C gelagert und für weiterführende Klonierungsversuche eingesetzt.



## **8. Analyse und Modifizierung von DNA**

10x TE-Puffer:            100 mM Tris HCl  
                                 10 mM EDTA pH 8,0

10x TBE-Puffer:         89 mM Tris HCl  
                                 89 mM Borsäure  
                                 500 mM EDTA pH 8,0

10x Stoppuffer für DNA:  
                                 200 µl 50% (w/v) Ficoll  
                                 200 µl 0,25% (w/v) Bromphenolblau  
                                 100 µl 10% (w/v) SDS  
                                 50 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0  
                                 50 µl 10x TBE

### **8.1. DNA-Fällung**

3 M Natriumacetat pH 4,8

100% Ethanol

70% Ethanol

Um DNA aufzukonzentrieren wurde zu einem gegebenen Lösungsvolumen ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und das doppelte Volumen 100% Ethanol gegeben. Die Fällung der DNA erfolgte über Nacht bei -20°C. Die DNA wurde mittels Zentrifugation bei 14000 Upm für 10 Minuten sedimentiert und in 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 Upm (20800 g) für 2 Minuten wurde der Überstand verworfen und die DNA in der Vakuum-Tischzentrifuge getrocknet. Sie konnte dann im gewünschten Volumen 1x TE-Puffer aufgenommen werden.

### **8.2. Präparation von DNA aus Agarosegelen**

Zur DNA Präparation wurden die fertigen Lösungen des Prep-A-Gene Kits der Firma Bio-Rad verwendet.

Die gewünschte Bande, bzw. der gewünschte Gelbereich wurde unter der UV-Lampe ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Agarose wurde nach Zugabe von 500 µl Bindepuffer bei 55°C für 5 -

10 Minuten vollständig aufgeschmolzen. Die Glasmilch wurde auf dem Laborschüttler gründlich resuspendiert und 5 µl davon in das Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Durchmischung auf dem Laborschüttler wurde der Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 450 µl Waschpuffer wurde die Glasmilch gewaschen, für 20 Sekunden an zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, beim letzten Mal wurde der Überstand quantitativ mit der Pipette abgenommen. Die DNA wurde mit 20 - 30 µl sterilem Wasser von der Glasmilch eluiert. Dazu wurde die Glasmilch im Wassertropfen mit der Pipette resuspendiert und für 5 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für ca. 20 Sekunden wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Dabei war darauf zu achten, daß keine Glasmilch verschleppt wurde.

### 8.3. Restriktionsverdauung von DNA

Wenn nicht anders angegeben, wurden nur Restriktionsenzyme der Firma Gibco/BRL mit den zugehörigen 10x Reaktionspuffern eingesetzt.

Die Reaktionen wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bereitet und im Brutschrank bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 20µl.

#### Einzelverdauung

x µl DNA  
 2 µl 10x Reaktionspuffer  
 1 µl Enzym  
 y µl Wasser

#### Doppelverdauung

x µl DNA  
 2 µl 10x Reaktionspuffer  
 1 µl Enzym 1  
 1 µl Enzym 2  
 y µl Wasser

Die Reaktionen wurden mit 2,2 µl 10x Stopppuffer (II.8.) gestoppt.

#### 8.4. Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation von Vektor-DNA in Ligationsansätzen zu verhindern, wurden einfach verdaute Vektoren dephosphoryliert. Es wurde die Alkalische Phosphatase aus Kälbermagen (CIAP = calf intestine alkaline phosphatase) von Gibco, BRL verwendet.

Die Reaktion erfolgte nach folgendem Schema im 1,5 ml Eppendorfgefäß:

- 20 µl Restriktionsverdauung (II.8.3)
- 3 µl 10x Dephosphorylierungspuffer
- 1 µl CIAP
- 6 µl Wasser

Die Ansätze wurden im Brutschrank bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und mit 3,3 µl 10x Stoppuffer (II.8.) gestoppt.

#### 8.5. Ligation von DNA

Zur Ligation kleiner DNA-Fragmente in Vektor-DNA wurde die T4 DNA Ligase von Gibco, BRL eingesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, so erfolgte die Reaktion nach folgendem Schema:

- x µl Vektor-DNA, verdaut, (dephosphoryliert)
- y µl DNA-Fragment, verdaut
- 4 µl 5x Ligasepuffer
- 1 µl T4 DNA Ligase
- z µl Wasser

Die Ansätze wurden auf Eis bereitet und über Nacht bei 15°C im Kühlwasserbad inkubiert. Sie wurden am nächsten Tag zur Transformation von *E. coli* JM83 (II.4.1.2) eingesetzt.

## 9. Infektionen von Pflanzenmaterial

### 9.1. Agroinfektion von Zuckerrübensetzlingen

#### Theoretischer Hintergrund:

Agrobakterien besitzen die einzigartige Möglichkeit, Gene zwischen Bakterien und Pflanzen auszutauschen [Koukolikova-Nicola *et al.*, 1987; Zambryski, 1992; Zupa und Zambryski, 1997]. Mit ihrer Hilfe erreicht man die gezielte molekulargenetische Veränderung der Pflanzenzelle auf natürlichem Wege.

*Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobiaceae*) induziert in einer Pflanze nach Verwundung Tumoren [Hooykaas und Schilperport, 1984] und programmiert die Pflanzenzelle so um, dass diese Opine produziert. Diese Opine dienen dem Bakterium als Nährstoffe.

Die Tumorinduktion wird durch das Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* vermittelt (s. Abb.3).

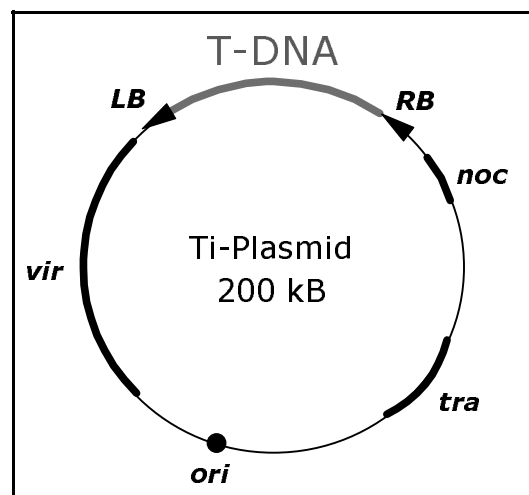


Abb.3: Schematische Darstellung des Ti-Plasmids vom Nopalintyp [nach Westhoff *et al.*, 1996]

T-DNA: Transfer- DNA, LB/RB: left/right border, *vir*: Virulenzregion, *ori*: Replikationsursprung, *tra*: konjugativer Transfer, *noc*: Nopalinkatabolisierung

Ti-Plasmide enthalten zwei wichtige Bereiche:

- die T-DNA, welche in die Pflanzenzellen übertragen werden kann und in die Zellkern-DNA integriert wird
- die *vir*-Region, die die Gene für diese Übertragung codiert.

Die T-DNA wird durch die sog. rechte und linke Grenze begrenzt, die aus einer 25 Bp langen Wiederholungssequenz besteht, welche als Erkennungssequenz für das Herausschneiden der T-DNA dient. Auf der T-DNA liegen u.a. die Gene zur Opinsynthese und zur Tumorinduktion.

Der Gentransfer von Agrobakterien in die Pflanze verläuft folgendermaßen: Verwundete Pflanzen scheiden Flavonoide aus, die von den Agrobakterien als Signal zur Aktivierung der *vir*-Gene erkannt werden. Genprodukte der Vir-Region schneiden die T-DNA aus dem Plasmid und schleusen diese in den pflanzlichen Zellkern. Die Integration der T-DNA erfolgt nach dem Schema der illegitimen Rekombination, die von Wirtsproteinen vermittelt wird. Der Integrationsort wird relativ unspezifisch festgelegt, transkriptionsaktive Bereiche der Wirts-DNA werden allerdings bevorzugt. Die bakteriellen Gene werden aber von ihren eigenen, mitgelieferten Promotoren aktiviert.

Der Pflanzenmolekularbiologe kann sich dieses System nun zu Nutzen machen, um Fremdgene in Pflanzen einzubringen [Hooykaas und Mozo, 1994; Walkerpeach und Velten, 1994].

Dazu müssen die tumorinduzierenden Gene entfernt werden. Zwischen der rechten und linken Grenze der T-DNA können dann beliebige Fremdgene integriert werden. Antibiotikaresistenzmarker erleichtern in der Selektion das Auffinden transformierter Zellen.

Das Agrobakteriensystem eignet sich vor allem für die Transformation von dikotylen Pflanzen, während die stabile Transformation monokotyler Pflanzen noch Probleme bereitet.

Das Agrobakteriensystem dient nicht nur zur Herstellung transgener Pflanzen, sondern ermöglicht auch die Infektion von Pflanzen mit Viren ohne den natürlichen Überträgerorganismus [Mathis und Hinchee, 1994]. Durch mechanische Inokulation kann z.B. mit BCTV-DNA keine Infektion in Pflanzen hervorgerufen werden. Zur Infektion werden sog. Bitmer-Klone eingesetzt, die zwischen rechter und linker Grenze die virale Bitmer-DNA beinhalten. Die Agrobakteriensuspension wird auf die Blattachsel der Zielpflanze pipettiert. Durch den Tropfen hindurch wird die Pflanze mittels einer Nadel gezielt verletzt, was die Übertragung der T-DNA einleitet. So wird die Bitmer-DNA auf dem natürlichen Wege in die Pflanze eingeschleust. Dort kann sie durch homologe Rekombination ihrer doppelten Enden zirkularisieren und liegt somit als komplette Virus-DNA vor. Der Infektionszyklus kann dann beginnen.

### Praktische Durchführung:

*Agrobacterium tumefaciens* PGV mit BCTVpBin1.2

LB-Flüssigmedium und LB-Agarplatten (II.4.1.)

Pflanzensetzlinge

Zur Infektion von Zuckerrüben mit BCTV wurde die Agroinfektionsmethode eingesetzt. Zur Verfügung stand ein *Agrobacterium tumefaciens* Bitmer-Klon des Kalifornischen BCTV Stammes in pBin19, BCTVpBin1.2 PGV genannt. Zuckerrübensetzlinge wurden infiziert, sobald die Spitzen der ersten Folgeblätter zu erkennen waren.

Die Agrobakterien wurden aus einer Gefrierdauerkultur mit einem sterilen Zahnstocher auf LB-Agarplatten mit Rifampicin- und Kanamycinzusatz ausgestrichen und 2 Tage bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Mit 500 - 750 µl sterilem Wasser wurden die Bakterien dann von der Platte geschwemmt und die Suspension in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Von dieser Suspension wurden jeweils 10 µl in die Blattachsel der Setzlinge pipettiert. Mit einer Insektenpräparationsnadel wurde der Setzling durch den Agrobakterientropfen mehrfach angestochen, um eine Verwundung hervorzurufen. Die Suspension wurde 5 - 15 Minuten auf der Pflanze gelassen, dann durch vorsichtiges Gießen der Setzlinge heruntergespült. Die Symptome der infizierten Pflanzen wurden im Anschluß wöchentlich protokolliert und nach ca. 21 Tagen die ersten Blattproben zur Analyse genommen.

## 9.2. Blattscheiben-Test

### 9.2.1 Anzuchtmedien für pflanzliche Gewebekultur

Es sind die Rezepturen für 250 ml Medium angegeben [Murashige und Skoog, 1962; Freytag *et al.*, 1988]. Zur Herstellung von Flüssigmedium wurde auf Agarzusatz verzichtet. Alle Medien wurden vor Sterilisation mit 0,25 N Natronlauge auf den pH-Wert von 5,8 eingestellt. Alle Zusätze mit \* wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

B5-Medium: 0,775 g Gamborg's B5 Basal Salt Mixture  
(G-5768, Sigma)  
150 µl Gamborg's Vitamin Powder 1000x SL  
(G-2519, Sigma)\*  
25 mg Inosit  
250 µl Nicotinsäure SL (1 g/l)\*  
250 µl Pyridoxin HCl SL (1 g/l)\*  
2,5 ml Thiamin HCl SL (1 g/l)\*  
25 µl Indol-3-buttersäure SL (1 g/l)\*  
100 µl N6-Benzyladenin SL (1 g/l)\*  
6,25 g Sucrose  
1,625 g Agar

MS1-Medium: 1,1 g Murashige and Skoog Basal Medium with  
Gamborg's Vitamins (M-0404, Sigma)  
25 µl Indol-3-buttersäure SL (1 g/l)\*  
100 µl N6-Benzyladenin SL (1 g/l)\*  
6,25 g Sucrose  
1,625 g Agar

MS2-Medium: 1,1 g Murashige and Skoog Basal Medium  
(M-5519, Sigma)  
25 µl Indol-3-buttersäure SL (1 g/l)\*  
100 µl N6-Benzyladenin SL (1 g/l)\*  
6,25 g Sucrose  
1,625 g Agar

MS3-Medium: 1,1 g Murashige and Skoog Basal Medium  
(M-5519, Sigma)  
62,5 µl N6-Benzyladenin SL (1 g/l)\*  
6,25 g Sucrose  
1,625 g Agar

<u>RV-Medium:</u>	1.075 g Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (M-5524, Sigma)
	2,5 ml L-Tryptophan SL (4 g/l)*
	1,875 ml Folsäure SL (2 mg/l)*
	1,5 ml L-Glutamin SL (10 g/l)*
	1 ml L-Asparagin SL (10 g/l)*
	1 ml L-Arginin SL (10 g/l)*
	750 µl Riboflavin SL (5 mg/l)*
	500 µl L-Phenylalanin SL (10 g/l)*
	500 µl L-Glycin SL (10 g/l)*
	125 µl Thiamin HCl SL (1 g/l)*
	125 µl Pyridoxin HCl SL (1 g/l)*
	125 µl Nicotinsäure SL (1 g/l)*
	100 µl N <sup>6</sup> -Benzyladenin SL (1 g/l)*
	100 µl <i>p</i> -Aminobenzoesäure SL (0,5 g/l)*
	25 µl Indol-3-buttersäure SL (1 g/l)*
	10 µl Panthothensäure SL (10 g/l)*
	10 µl Ascorbinsäure SL (10 g/l)*
	5 µl Cholinchlorid SL (10 g/l)*
	0,25 µl Biotin SL (0,25 g/l)*
	6,25 g Sucrose
	1,625 g Agar

### 9.2.2 Herstellung von Blattscheiben

10% Klorix mit 0,01% SDS

70% Ethanol

MS1-Agarplatten mit Carbenicillin (II.9.2.1)

Für die Blattscheiben-Tests wurde das Pflanzenmaterial jeweils frisch geerntet. Die Blätter oder Blattstiele wurden für 15 Minuten in einer 10% Klorixlösung mit 0,01% SDS in Petrischalen sterilisiert. Das Pflanzenmaterial wurde dann kurz in 70% Ethanol und in sterilem Wasser gespült, bevor es zur kurzzeitigen Lagerung in frisches steriles Wasser überführt wurde. Mit einem sterilen Korkbohrer der Größe 4 wurden aus den Blättern Blattscheiben ausgestochen, bzw. wurden die Blattstiele in ca. 1 cm lange Stücke mit einem sterilen Skalpell geschnitten. Diese Explantate wurden dann auf MS1-Agarplatten mit Carbenicillin überführt, wobei bei den Blattscheiben darauf zu achten war, daß die Blattunterseite auf dem Agar zu liegen kam. Pro Platte wurden 20 Blattscheiben bzw. 10



Blattstiele ausgelegt und mit Parafilm verschlossen um eine Austrocknung zu verhindern. Die Platten wurden im Lichtschrank bei 25°C inkubiert.

### 9.2.3 Transfektion von Blattscheiben über Agroinfektion

*Agrobacterium tumefaciens* mit BCTVpBin1.2 LBA4404

LB-Agarplatten mit Rifampicin und Kanamycin (II.4.1)

„Precallusing“Platten: MS1-Agarplatten (II.9.2.1)

„Selektivplatten“:MS1-Agarplatten mit Carbenicillin (II.9.2.1)

Zur Verfügung stand ein *Agrobacterium tumefaciens* Bitmer-Klon des Kalifornischen BCTV Stammes in pBin19, BCTVpBin1.2 LBA4404 genannt. Am ersten Tag mußten die Agrobakterien auf LB-Agarplatten mit Rifampicin und Kanamycin ausgestrichen und für 2 Tage bei 28°C inkubiert werden. Am zweiten Tag wurden die Blattscheiben hergestellt (II.9.2.2). Diese wurden auf sogenannten „Precallusing“ Platten ausgelegt. Am dritten Tag wurden die Agrobakterien mit sterilem Wasser von der Anzuchtplatte geschwemmt und in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt. Dort wurde die Suspension mit Wasser auf 25 ml verdünnt. Mit einer sterilen Pinzette wurden nun die Blattscheiben in diese Bakterien-suspension getaucht und auf eine neue Precallusing Platte umgesetzt. Dabei war darauf zu achten, daß an der Oberseite der Blattscheiben möglichst wenig Bakterien-suspension hängen blieb, da sich die Bakterien auf der „Precallusing“ Platte stark vermehren konnten. Nach weiteren 2 Tagen wurden die infizierten Blattscheiben auf Selektivplatten umgesetzt. Hier wurde das weitere Wachstum der Agrobakterien unterbunden. Alle Platten wurden mit Parafilm umwickelt und bei 25°C im Lichtschrank inkubiert.

#### 9.2.4 Transfektion von Blattscheiben durch Partikelbeschuss

##### A) Vorbereitung der Gold-Microcarrier

Gold, 1µm Durchmesser (Fa. Bio-Rad)

70% Ethanol

100% Glycerin, steril

60 mg Goldkügelchen wurden in ein 2 ml Safe-Lock Eppendorfgefäß auf der Analysenwaage abgewogen. Zur Desinfektion wurde das Gold mit 1 ml 70% Ethanol versetzt und für 10 Minuten auf einem Laborschüttler kräftig suspendiert. Nach Zentrifugation bei 20800 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für maximal 20 Sekunden wurde das Gold dreimal in sterilem Wasser gewaschen und schließlich in 500 µl sterilem Wasser und 500 µl sterilem Glycerin aufgenommen. Bis zum Gebrauch konnte diese Goldsuspension bei -20°C gelagert werden.

##### B) Vorbereitung der Macrocarrier

Goldsuspension

DNA-Lösung (Konzentration: 1µg/µl)

0,1 M Spermidinlösung

2,5 M Calciumchloridlösung

70% Ethanol

98% Ethanol

Macrocarrier (Fa. Bio-Rad)

Die Goldsuspension wurde auf einem Laborschüttler gründlich resuspendiert und auf einen Eppendorfschüttler gestellt. 50 µl des Goldes wurden in ein 2 ml Safe-Lock Eppendorfgefäß pipettiert, welches dann ebenfalls auf den Schüttler gestellt wurde. 10 µl DNA-Lösung (aus II.5.1.2

bzw. II.5.1.3) wurden zugegeben, für 4 Minuten auf dem Laborschüttler durchmischt und dann auf Eis gestellt. Auf den Rand des liegenden Eppendorfgefäßes wurden 10 µl 0,1 M Spermidin und 50 µl 2,5 M Calciumchloridlösung pipettiert. Die Lösungen sollten sich nicht durchmischen. Der Ansatz wurde sofort auf dem Laborschüttler 3 Minuten lang durchmischt und für 8 - 10 Sekunden anzenrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, das Gold zweimal in 50 µl 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 72 µl 98% Ethanol aufgenommen. Vor dem Auftragen des Goldes auf die Macrocarrier wurde die Suspension kräftig auf dem Laborschüttler durchmischt, rasch 6 µl Suspension entnommen und diese dann kreisförmig auf einen Macrocarrier aufgetragen. Die Macrocarrier wurden auf der Laborbank getrocknet. Mit diesem Ansatz konnten 10 Macrocarrier bestückt werden.

### C) Beschuss von Blattscheiben

Der Beschuss wurde mit dem Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System der Firma Bio-Rad durchgeführt. Der Beschuss erfolgte nach den Angaben des Herstellers, allerdings wurde darauf verzichtet, die Gerätekomponenten zu sterilisieren. Im Regelfall wurden Berstscheiben von 900 psi verwendet.

Pro Schuss wurden 4 Blattscheiben verwendet. Diese wurden zentral auf einen mit sterilem Wasser angefeuchteten Filter in einer Petrischale ausgelegt. Der Beschuss erfolgte immer auf die Oberseite der Blattscheiben. Nach Beschuss wurden die Blattscheiben auf frische MS1-Agarplatten mit Carbenicillin (II.9.2.1) ausgelegt und im Lichtschrank bei 25°C inkubiert.

### 9.3. Herstellung von Protoplasten aus Zuckerrübenblättern

Vorschrift nach S. Lenzner, 1994

10% Klorixlösung mit 0,01% SDS

70% Ethanol

10x CPW Lösung:        272 mg Kaliumdihydrogenphosphat  
                               1,01 g Kaliumnitrat  
                               14,8 g Calciumchlorid Dihydrat  
                               2,47 g Magnesiumsulfat Heptahydrat  
                               1,6 mg Kaliumiodid  
                               0,25 mg Kupfersulfat Pentahydrat

Präplasmolyselösung: 1x CPW  
                               9% (w/v) Sorbit  
                               3,8% (w/v) Calciumchlorid  
                               0,1 mM *n*-Propylgallat pH 5,8

Enzymlösung:            1% (w/v) Cellulase „Onozuka R-10“  
                               1,5% (w/v) Macerozym „Onozuka R-10“  
                               1x CPW  
                               9% (w/v) Sorbit  
                               0,1 mM *n*-Propylgallat pH 5,8

Floatinglösung:        1x CPW  
                               9% (w/v) Sorbit  
                               0,1 mM *n*-Propylgallat pH 5,8

Waschlösung:            110 mM Calciumchlorid  
                               130 mM Natriumchlorid  
                               9 mM Kaliumchlorid  
                               5 mM Glucose  
                               0,1 mM *n*-Propylgallat pH 5,8

10 bis 12 junge Blätter wurden in 10% Klorixlösung mit 0,01 M SDS für 10 Minuten sterilisiert. Nach Spülen in 70% Ethanol und sterilem Wasser wurden sie in frisches steriles Wasser überführt. In einer Petrischale wurden die Blätter in feine, maximal 1 mm breite Streifen zerschnitten, wobei die großen Blattadern entfernt wurden. Die Blattstreifen wurden für 5 Stunden in 30 ml Präplasmolyselösung bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die Lösung wurde dann gegen 30 ml Enzymlösung ausgetauscht, die Inkubation erfolgte über Nacht bei 25°C im Dunkeln.

Die Petrischalen wurden auf einem Horizontalschüttler bei maximal 30 Upm sanft geschüttelt um die Protoplasten aus dem Pflanzengewebe zu lösen. Die Zelltrümmer wurden über sterile Gaze von der Protoplastenlösung getrennt. Je 6 ml Filtrat wurden vorsichtig in einem Rundbodenröhrchen aufgefangen. Das Filtrat wurde mit 6 ml Waschlösung gemischt und bei 700 Upm (115 g) und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml Floatinglösung aufgenommen und mit 2 ml Waschlösung überschichtet. Nach Zentrifugation bei 700 Upm (115 g) bei Raumtemperatur für 10 Minuten sollten sich die intakten Protoplasten in der Interphase zwischen den Lösungen sammeln, während die geplatzen an den Röhrchenboden sanken. Diese Grenzschicht wurde vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette abgesaugt, wobei Spitzen mit abgeschnittener Spitze verwendet wurden um die Scherkräfte möglichst gering zu halten. Die Bestimmung der intakten Protoplastenzahl in dieser Lösung erfolgte in einer Neubauer- Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Konzentration der Lösung wurde auf 1 Million Zellen pro Milliliter mit Waschlösung eingestellt. Die Protoplasten wurden für 20 Minuten in den Kühlraum bei 8°C gestellt.

### 9.3.1 Elektroporation von Protoplasten

DNA-Lösung

Heringssperma DNA

MS1-Flüssigmedium (II.9.2.1)

300 µl Protoplastenlösung (II.9.3.) wurden in einer vorgekühlten 0,2 cm Küvette mit 10 µg DNA (aus II.5.1.2 bzw. II.5.1.3) und 15 µg Heringssperma DNA versetzt. Die Küvette wurde mit dem Deckel verschlossen und in den vorgekühlten Elektroporationsschlitten gestellt. Die Elektroporation erfolgte im Gene Pulser®II mit Pulse Controller Plus der Firma Bio-Rad mit folgenden Geräteeinstellungen:

Spannung = 0,16 kV  
elektrische Feldstärke = 0,8 kV/cm  
elektrische Kapazität = 125 µF  
Widerstandseinstellung = none.

Nach der Elektroporation wurden die Protoplasten in kleine Petrischalen mit 10 ml MS1-Medium überführt und für 2 bis 7 Tage im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte nach II.5.2.2.

### 9.3.2 PEG-vermittelter Transfer von DNA in Protoplasten

Nachdem sich die Elektroporationsmethode als ungeeignet zur Protoplastentransfektion herausgestellt hatte, wurde die PEG-Methode eingesetzt [nach Gelvin und Schilperport (Ed.), Plant Molecular Biology Manual, 1997]:

MMM:        15 mM MgCl<sub>2</sub>  
               0,1% (w/v) MES  
               0,5 mM Mannitol  
               pH 5,8 einstellen und autoklavieren.

PEG:         40% (w/v) PEG4000  
               in 0,4 M Mannitol  
               0,1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
               pH 8-9 mit KOH einstellen, autoklavieren.

PEG wurde in der Lösung aus Mannitol und Calciumnitrat ÜN gelöst. Der pH-Wert der Lösung fiel nach dem Autoklavieren auf pH 5-6 ab.

Plasmid-DNA (1µg/µl)

Waschlösung (II.9.3)

MS1-Medium (II.9.2.1)

Die Protoplasten (II.9.3.) wurden in Rundbodenröhrchen bei 700 Upm (150 g) für 5 Minuten zentrifugiert und in MMM-Lösung aufgenommen, sodass eine Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Protoplasten/ml erreicht wurde. Die Suspension wurde auf 250µl Aliquots aufgeteilt und in Rundbodenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 20µl Plasmid-DNA wurden die Röhrchen sanft geschüttelt, ebenfalls nach Zugabe von 250µl PEG-Lösung. Die Protoplasten wurden 5 Minuten inkubiert und mehrmals sanft geschüttelt, dann wurden 10 ml Waschlösung langsam dazugegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 700 Upm (150 g) wurden die sedimentierten Protoplasten in 10 ml MS1-Medium in Petrischalen überführt und dort für 2 bis 7 Tage im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte nach II.5.2.2.



## 10. Sequenzieren

### 10.1. Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-(Kettenabbruch-)methode nach Sanger *et al.*, 1977. Dazu wurde der „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit“ der Firma Amersham, Life Sciences eingesetzt.

In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden die folgenden Reaktionsansätze bereitet und bei 4°C auf Eis gelagert:

<u>Minipräp DNA</u>	<u>Maxipräp DNA</u>
1 µl Primer (2 pmol/µl)	1 µl Primer (2 pmol/µl)
6 µl DNA	0,7 µl DNA (1µg/µl)
17 µl Wasser	22,3 µl Wasser
1 µl DMSO	1 µl DMSO

Nach dem Mischen der Ansätze wurden diese kurz anzentrifugiert und wieder auf Eis überführt. Pro Ansatz wurden 4 verschiedenfarbige 0,2 ml Eppendorfgefäße mit Probennummer und Base beschriftet und ebenfalls auf Eis gestellt. Je 2 µl der Reaktionsmische aus dem Amersham-Kit wurden hinein pipettiert und mit je 6 µl der Reaktionsansätze gemischt. Die Eppendorfgefäße wurden für 1 Minute bei 14000 Upm (20800 g) zentrifugiert.

Tab.6: verwendete 5'-IR-markierte Primer zur Sequenzierung

<b>Name</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>homolog zu</b>	<b>Zweck</b>	<b>Programm</b>
Reverse	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	pBluescript nt 848-825 kompl.	Sequenzierung aller pBluescript Klone	60°C
Forward	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	pBluescript nt 580-602		58°C
105A	CAG GTA CGA ACT TTT ATG GGA C	BCTV105 nt 360-381	vollständige Sequenzierung von BCTV105	60°C
105B	GTA ATT CAG	BCTV105 nt		



Name	Sequenz 5' → 3'	homolog zu	Zweck	Programm
	AAC CAG AGT GTT G	1414-1393 kompl.		
BCTVid-2	CCT TCA ATG CCA AAT TAC AAG		Sequenzierung der USA Proben	58°C
BCTVC1- 1	GAA GCC CTT AGG TCC TGG ACA	CFH nt 1883-1863 kompl.	Sequenzierung von BCTV Proben, anhand des C1 Leserahmens	60°C

kompl. = Komplementärstrang-Orientierung

Alle Primer stammten von der Fa. MWG Biotech.

Es wurden zwei Cycle Sequencing Programme verwendet. Für den Reverse Primer und die Primer 105A, 105B und BCTVC1-1 erfolgte die Reaktion bei 60°C Annealing Temperatur:

Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
92°C / 2'	60°C / 15''	70°C / 30''	1x
92°C / 15''	60°C / 15''	70°C / 30''	30x

während für den Forward Primer und BCTVid-2 folgendes Programm eingesetzt wurde:

Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
92°C / 2'	58°C / 15''	70°C / 30''	1x
92°C / 15''	58°C / 15''	70°C / 30''	30x

Nach Ablauf des Programmes wurden die Reaktionen sofort mit 4 µl 10x Loadingpuffer (Sequi Therm Cycle Sequencing Kit LC, Epicentre) gestoppt und bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Kurz vor Beladung des Sequenzgels (II.10.2) wurden die Proben im Thermocycler für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis gebracht und kurz anzentrifugiert. Auf das Sequenzgel wurden je 1,5 µl Probe aufgetragen.

## 10.2. Sequenzieren

Es wurde der Li-Cor DNA-Sequencer 4000L eingesetzt. Aus 32 ml Sequagel XR, 8 ml Pufferreagenz (beides Fa. national diagnostics) und 150 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat wurde die Gellösung hergestellt. Diese ergab ein Gel der Maße 41 cm x 25 cm x 0,5 cm. Während der Polymerisation wurde ein Abstandshalter für den Probenkamm eingesetzt. Eine Polymerisationszeit von 1,5 Stunden wurde eingehalten. Anschließend wurde der 48-zählige Haifisch-Probenkamm eingesetzt und der Gelvorlauf für mindestens 1 Stunde gestartet. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer (II.8.). Nach erfolgtem Abgleich wurden die Proben aufgetragen. Die Detektion der IR-markierten DNA Fragmente erfolgte bei einer Wellenlänge von 785 nm. Die Laufbedingungen waren:

Spannung:	1500 V
Stromstärke:	35 mA
Leistung:	35,5 W
Temperatur:	50°C

Die Auswertung des Gellaufs erfolgte am nächsten Tag mit der mitgelieferten Software BaseImagIR®, Version 2,0. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem DNASIS Programm der Firma Hitachi.

## 11. Statistische Analyse

Die Analyse der Pflanzeninfektionsexperimente erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test. Bei diesem Test wird überprüft, ob beobachtete Daten mit Erwartungswerten übereinstimmen [nach: Biostatistik, Köhler, Schachtel und Voleske, Springer-Lehrbuch].

Die Pflanzendaten wurden in folgendem Tabellentyp zur statistischen Analyse zusammengefasst:

Pflanzengruppe	Symptome		
	ohne	mild	stark
transgen, DI-DNA pos.			
transgen, DI-DNA neg.			
nicht-transgen			

Die beobachteten Werte  $B_{ij}$  (aus den Versuchen experimentell ermittelt) dienten zur Berechnung der erwarteten Werte  $E_{ij}$ . Es galt die Annahme, dass die erwartete Symptomverteilung der Symptomverteilung innerhalb der nicht-transgenen Gruppe entsprechen sollte. Die Erwartungswerte für die beiden transgenen Gruppen wurden anhand der nicht-transgenen Gruppe errechnet.

$$\chi^2 = \sum \frac{(B_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} = \left( \sum \frac{B_{ij}^2}{E_{ij}} \right) - N$$

$B_{ij}$  = beobachtete Häufigkeit

$E_{ij} = Z_i \cdot S_j \cdot \frac{1}{N}$  = erwartete Häufigkeit

$Z_i, S_j$  = Zeilen-/Spaltensumme

$N$  = Stichprobenumfang

Somit wurde mit dem  $\chi^2$ -Test die Abweichung der Beobachtungswerte der transgenen Gruppen von den jeweiligen Erwartungswerten ermittelt.

Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 5\%$  angenommen, der Freiheitsgrad betrug bei den  $F_1$ -Setzlingen **FG = 2**, bei den Doppelhaploiden **FG = 1**.  $\chi^2$ -Werte, die  $\leq \chi^2_{(Tab.)}$  waren, deuteten auf keine signifikante Abweichung der beobachteten Werte hin, während  $\chi^2$ -Werte, die  $> \chi^2_{(Tab.)}$  waren, eine signifikante Abweichung bedeuteten (Tabellenwerte im Anhang V.5.4).

Die Berechnung der  $\chi^2$ -Werte erfolgte mit dem Programm Lotus 1-2-3.

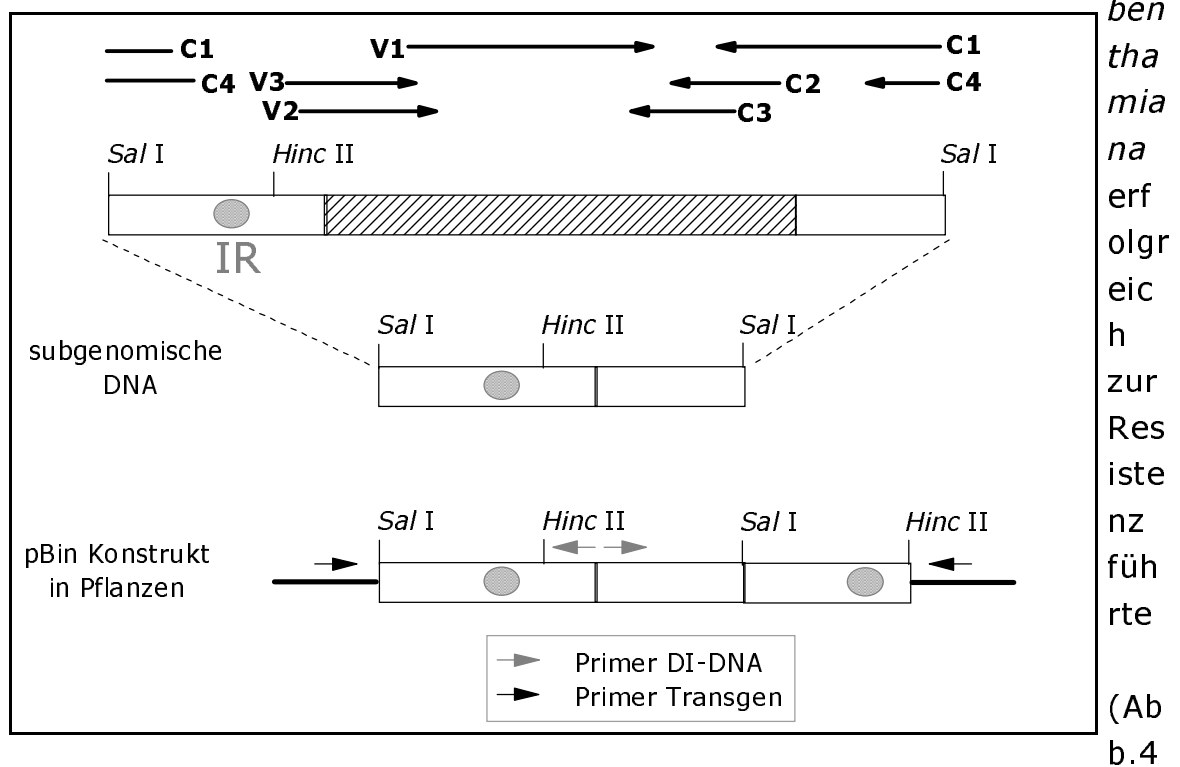
### **III. Ergebnisse**

#### **1. Infektionsexperimente an F<sub>1</sub>-Linien**

Zur Infektion von Zuckerrüben mit BCTV lagen zwei Agrobakterium-Klone vor: BCTVpBin1.2 LBA 4404 zur Agroinfektion von Blattscheiben und BCTVpBin1.2 PGV zur Agroinfektion ganzer Pflanzen. Beide Klone enthielten ein Bitmer-Konstrukt des Kalifornischen Stammes von BCTV [Briddon *et al.*, 1989; Karte siehe Anhang V.5.1].

Die Infektionstests sollten klären, ob die DI-DNA vermittelte Resistenz aus dem System *Nicotiana benthamiana* [Frischmuth und Stanley, 1994] auf Zuckerrübe übertragen werden kann.

Zur Transformation wurde eine DI-DNA eingesetzt, die bereits in *Nicotiana*



):

Abb.4: Schema der Herstellung des DI-DNA Transgens aus BCTV-Cal [verändert nach Frischmuth und Stanley, 1994]

Oben: BCTV-Cal mit ORFs (schwarze Pfeile). Der schraffierte Bereich ist in der DI-DNA deletiert. IR: Intergene Region

Mitte: DI-DNA, die zur Bitmer-Klonierung eingesetzt wurde.

Unten: Bitmer-Konstrukt der DI-DNA, das zur Transformation von Zuckerrüben eingesetzt wurde. Graue und schwarze Pfeile markieren die Primerpaare zur PCR-Analyse der Pflanzen.

Zu Beginn meiner Infektionstests standen F<sub>1</sub>-Pflanzen zur Verfügung (Tab.2). Die Infektionen der Pflanzen erfolgten im Setzlingsstadium, wie im Material und Methoden Teil beschrieben (II.9.1).

Es war in der Regel nicht möglich ein Infektionsexperiment zu wiederholen, da für viele Linien nur begrenzt Saatgut vorhanden war. Trotzdem lassen sich die Ergebnisse gut miteinander vergleichen, da die Infektionsraten der einzelnen Experimente im Regelfall > 90% waren. Die Infektionsrate ergab sich aufgrund der Southern Blot Analyse (II.6.2) und aus dem Vergleich der Infektionen von nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Inokulierte Pflanzen wurden wöchentlich auf Symptome hin untersucht. Die ersten Infektionssymptome waren durchschnittlich 21 Tage nach Inokulation zu beobachten (Abb.5).

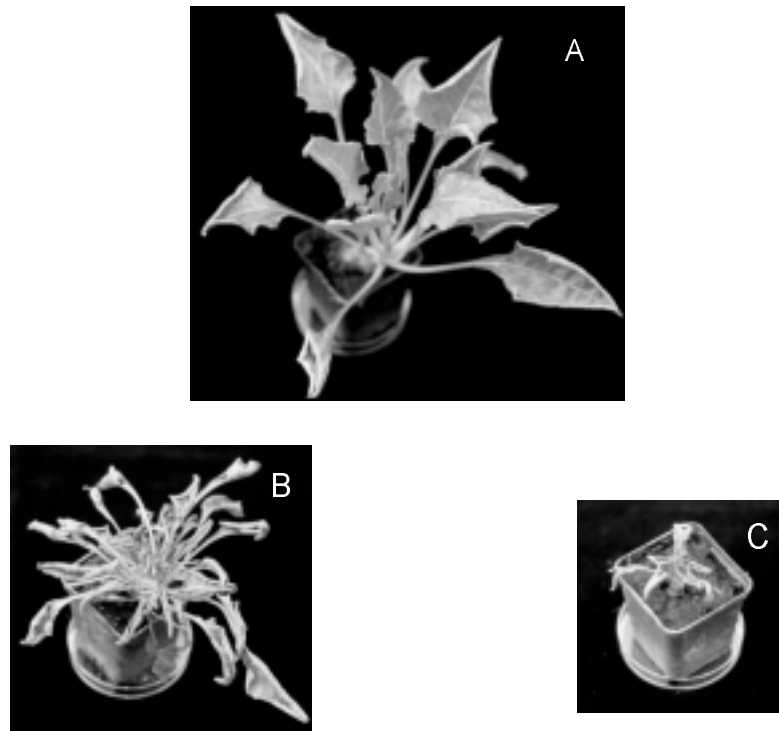
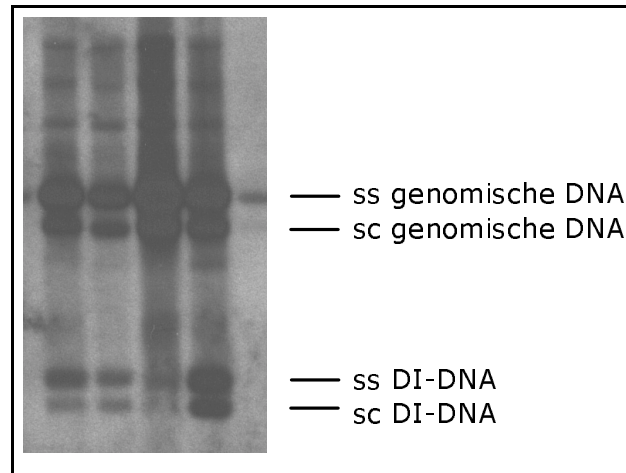


Abb.5: Symptome BCTV-infizierter

Zuckerrüben, 50 dpi

- A: Pflanze zeigt leichtes Blattrollen bei normalem Wuchs
- B: Pflanze zeigt starkes Blattrollen mit Wuchsminderung
- C: Pflanze zeigt starkes Blattrollen und starke Wuchsminderung

Drei bis vier Wochen nach Inokulation wurden die zwei jüngsten Blätter als Probe genommen. Die Gesamt-DNA wurde aus den Proben isoliert (II.5.2.1) und mittels Southern Blot (II.6.2) auf Virus-DNA-Gehalt, Replikation von Virus und DI-DNA-Gehalt untersucht. Abb.6 zeigt ein Beispiel eines solchen Southern Blots.



Zunächst hoffte man, dass die Southern Blot Analyse schon Aufschluss über eine Resistenzwirkung durch das Transgen erkennen ließe. Während man in *N. benthamiana* Pflanzen mit milden Symptomen eine deutliche Reduktion an viraler DNA fand, konnte dieses Phänomen in Zuckerrüben nicht mit der gewünschten Deutlichkeit gefunden werden. So zeigten z.B. viele stark infizierte Rüben einen hohen DI-DNA-Gehalt, bzw. Zuckerrüben mit milden Symptomen einen hohen Virustiter.

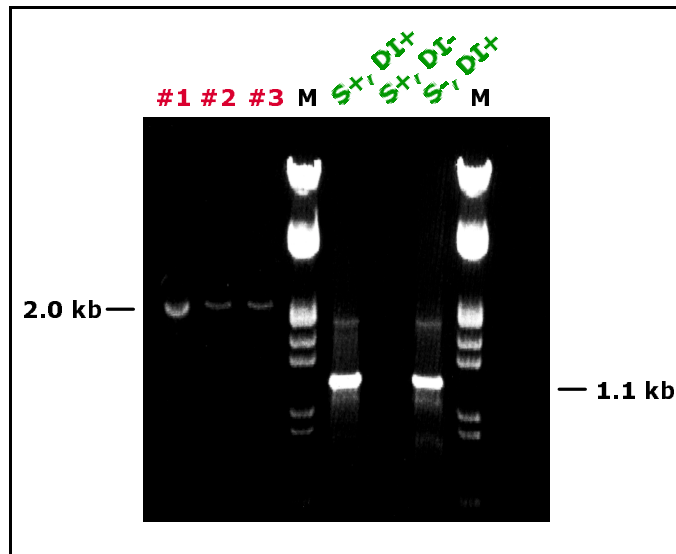


Abb.7: Agarosegelelektrophorese der PCR auf Transgen und replikative DI-DNA.

Auftrag 5µl PCR Ansatz. Es wurden Proben verschiedener Pflanzen aufgetragen (Spuren 1-3 und 4-6).

S: Southern Blot DI-DNA Detektion, DI: PCR DI-DNA Detektion  
M: Längenstandard, Lambda-DNA, *EcoRI/HindIII* verdaut

Anhand der Southern Blot Analyse infizierter Pflanzen konnte nicht entschieden werden, ob die DI-DNA aufgrund der Mobilisierung aus dem Transgen replikativ entstanden war, oder ob es sich um DI-DNA handelte, die durch Infektion mit dem Virus spontan neu gebildet wurde. Solche Fälle konnte man anhand der PCR (II.7.3.) mit dem Primerpaar BCTV 6 und BCTV 7 unterscheiden (Abb.4). Die Primer sind so angeordnet, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die neu-replizierte - und somit zirkuläre DI-DNA amplifiziert werden kann.

In Abb.7 sind beispielhaft verschiedene Situationen gezeigt: a) Pflanze zeigte im Southern DI-DNA; PCR Analyse bestätigt, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um replikative DI-DNA vom Transgen handelt (Spur S+, DI+); b) Pflanze zeigte im Southern DI-DNA; PCR Analyse beweist, dass es keine vom Transgen stammende replikative DI-DNA ist (Spur S+, DI-), und c) Pflanze zeigte im Southern keine DI-DNA; die sensitivere PCR Analyse zeigt, dass replikative DI-DNA vom Transgen vorhanden ist (Spur S-, DI+).

Mit diesen Methoden wurden alle Pflanzen untersucht.



## 1.1. Pflanzeninfektionen der F<sub>1</sub>-Generationen

### 1.1.1 Ergebnisse der Linien, die keine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und der Symptomstärke aufwiesen

Die Pflanzen der folgenden Linien wurden wie im Material und Methoden Teil angegeben mit BCTV inokuliert (II.9.1). Je eine Pflanze wurde nicht inokuliert und über die gesamte Versuchsdauer mitgeführt. Sie diente als Negativ-Kontrolle.

Infizierte Pflanzen entwickelten 21 Tage nach Inokulation (21 dpi = days post inoculation) typische BCTV Symptome. Zur Unterscheidung der Symptome wurden folgende Bezeichnungen eingeführt:

Milde Symptome: starkes Blattrollen nach oben, vermindertes Wachstum auf ca. die Hälfte der Kontrollpflanze.

Starke Symptome: sehr starkes Blattrollen mit Blattdeformationen, starke Stauchung der Pflanze. Die Blätter waren so sehr verkümmert, dass die Pflanzen kaum durch sie ernährt werden konnten. Wie es anhand der starken Erkrankung zu erwarten war, verstarben viele dieser stark infizierten Pflanzen.

Auffällig war, dass Pflanzen, die einmal als „mild“ bzw. „stark“ klassifiziert wurden, im längeren Verlauf des Experiments diesen Symptomgrad beibehielten. Bis auf wenige Ausnahmen verschlechterten sich die Symptome nicht, eine Erholung von der Infektion wurde nie beobachtet.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Linien zeigt Tabelle 7.

Die Symptomauswertungen der nicht-infizierten Pflanzen wurden zur besseren Übersicht in dieser Tabelle nicht aufgeführt. Im Anhang (V.5.2) sind jedoch die ausführlichen Ergebnisse jeder einzelnen Pflanze aufgelistet.

**Tab.7: Übersicht der Linien, die keine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und Symptomstärke aufweisen**

Linie	inokulierte Pflanzen	Infektionsrate	Transgen	replikative DI-DNA	Symptome			$\chi^2$ -Wert
					ohne	mild	stark	
66061 J	34	97%	pos. 12	pos. 7		4	3	1,89
				neg. 5		2	3	
			neg. 21		7	14		
61061 T	24	100%	pos. 15	pos. 3		2	1	0,75
				neg. 12		8	4	
			neg. 9		5	4		
71031 T	29	90%	pos. 4	pos. 2	1		1	0,58
				neg. 2			2	
			neg. 22		10	12		
71032 T	18	84%	pos. 5	pos. 5	1	2	2	1,67
				neg. 0				
			neg. 10		4	6		
71033 T	36	86%	pos. 7	pos. 2			2	2,6
				neg. 5		3	2	
			neg. 24		8	16		
71036 K	3	100%	pos. 0	pos. 0				-
				neg. 0				
			neg. 3		3			
71037 K	18	100%	pos. 1	pos. 0				-
				neg. 1			1	
			neg. 17		4	13		

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tab.7:

71038 K	19	95%	pos. 2	pos.0				-
				neg. 2	1	1		
			neg. 16		5	9	2	
76031 J	7	100%	pos. 5	pos.0				-
				neg. 5		2	3	
			neg. 2				2	
76033 J	43	86%	pos. 10	pos. 0				3,91
				neg. 10		9	1	
			neg. 27			16	11	
76034 J	47	89%	pos. 33	pos. 10	1	2	7	3,02
				neg. 23	3	5	15	
			neg. 9			1	8	
76036 J	2	100%	pos. 2	pos. 0				-
				neg. 2			2	
			neg. 0					
76037 J	24	96%	pos. 15	pos.3			3	-3,64
				neg. 12	1	2	9	
			neg. 8				8	
76038 J	33	79%	pos. 9	pos.1		1		2,65
				neg. 8		3	5	
			neg. 17			5	12	
84116 T	42	100%	pos. 29	pos. 25	4	7	14	2,90
				neg. 4		1	3	
			neg. 13		1	4	8	

Der in der Tabelle angegebene Signifikanz-Wert  $\chi^2$  liegt in allen gezeigten Fällen unter dem Tabellenwert  $\chi^2$ (Tab 2/5%) von 5,99, welcher für die Analyse angenommen wurde (II.11. und V.5.4). Somit weichen die transgenen, DI-DNA replizierenden Pflanzen in ihrer Symptomausprägung nicht von den nicht-transgenen Pflanzen der jeweiligen Linie ab. Diese Auswertung deckt sich mit der Stärke der Symptome, die innerhalb dieser Pflanzen beobachtet werden konnte.

#### 1.1.2 Ergebnisse der Linien, die eine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und der Symptomstärke aufwiesen

Im nachfolgenden sind die Linien zusammengefasst, deren statistische Analyse eine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und der jeweiligen Symptomstärke ergab.

Infizierte Pflanzen entwickelten 21 Tage nach Inokulation die typischen BCTV Symptome. Die Symptomklassifizierung entspricht der unter 1.1.1 beschriebenen. Pflanzen dieser Linien behielten ihren Symptomgrad bis auf eine Ausnahme bei. Pflanzen der Linie 84124 T zeigten jedoch eine Erholung von der Infektion.

Tabelle 8 zeigt die Zusammenfassung dieser Linien, die im Anschluss an die Tabelle im einzelnen ausgewertet werden. Auch in dieser Tabelle wurden die nicht-infizierten Pflanzen nicht berücksichtigt; ihre Analyse findet sich jedoch ebenfalls im Anhang (V.5.2.).

**Tab.8: Übersicht der Linien, die eine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und Symptomstärke aufweisen**

Linie	inokulierte Pflanzen	Infektionsrate	Transgen	replikative DI-DNA	Symptome			$\chi^2$ -Wert
					ohne	mild	stark	
71034 T	50	88%	pos. 34 neg. 10	pos. 32	9	10	13	46,81
				neg. 2		1	1	
76032 J	36	95%	pos. 21 neg. 13	pos. 2	1		1	6,02
				neg. 19		13	6	
84111 K	115	100%	pos. 49 neg. 66	pos. 38	20	16	2	73,68
				neg. 11		7	4	
84107 K	59	100%	pos. 36 neg. 23	pos. 24	8	14	2	6,65
				neg. 12		1	10	
84118 T	35	100%	pos. 22 neg. 13	pos. 18		9	9	16,85
				neg. 4		1	3	
84124 T	76	100%	pos. 65 neg. 11	pos. 51	38	10	3	18,19
				neg. 14		5	6	

Für alle in Tabelle 8 gezeigten Zuckerrübenlinien ergab sich ein  $\chi^2$ -Wert größer als der Tabellenwert von 5,99. Somit kann man davon ausgehen, dass in allen sechs Fällen eine signifikante Unterscheidung der Symptomatik zwischen transgenen, DI-DNA replizierenden Pflanzen und nicht-transgenen Pflanzen möglich ist. Es ist jedoch nicht zulässig, nur die erhaltenen  $\chi^2$ -Werte miteinander zu vergleichen und die Linie mit dem größten Wert als die am besten mit der Theorie übereinstimmende zu definieren. Dies wäre deshalb falsch, da die Anzahl der untersuchten Pflanzen unterschiedlich ist, und der Signifikanztest in der beschriebenen Form nur die Aussage erlaubt, ob sich die DI-DNA replizierenden Pflanzen von den jeweiligen nicht-transgenen Pflanzen derselben Linie unterscheiden. Der Signifikanztest kann auch nicht auf Unterschiede in der Symptomstärke einzelner Linien eingehen. Aus diesen Gründen erfolgt die ausführliche Beschreibung dieser 6 Linien gesondert.

### **Linie 71034 T**

Die Linie 71034 T wurde aus der Linie VC3-8 durch Selbstung erhalten. 77% dieser Pflanzen waren transgen, 94% davon replizierten DI-DNA nach der BCTV Infektion. 9 Pflanzen waren symptomfrei, 10 zeigten milde und 13 starke Symptome (Tab.8). Die nicht-transgenen bzw. transgenen, nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen zeigten vorwiegend starke Symptome.

In dieser Linie ließ sich eindeutig ein positiver Effekt durch die Replikation von DI-DNA erkennen. Innerhalb der transgenen, DI-DNA replizierenden Gruppe erfolgte eine Verschiebung der Symptome hin zu milderem im Vergleich zu den nicht-transgenen Pflanzen. Die Schutzwirkung durch DI-DNA war allerdings nicht so ausgeprägt, wie sie bei *N. benthamiana* in den Versuchen von Frischmuth und Stanley, 1994 auftrat.

### **Linie 76032 J**

Die Linie 76032 J wurde aus der Kreuzung der Linie C68\*C89 mit VC3-6 erhalten. Diese Hybridlinie umfasste 62% transgene Pflanzen, wovon allerdings nur 10% DI-DNA replizierten. Von diesen zwei Pflanzen blieb eine symptomfrei, die andere entwickelte starke Symptome (Tab.8). Die nicht-transgenen bzw. transgenen, nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen zeigten eine Aufspaltung in milde und starke Symptome.

Die statistische Auswertung ergab einen  $\chi^2$ -Wert für dieses Experiment von 6,02. Dieser Wert liegt nur knapp oberhalb der Grenze der statistischen Zulässigkeit dieses Tests. Eine Resistenzwirkung durch DI-DNA Replikation konnte zwar vermutet werden, diese war jedoch durch die geringe Anzahl transgener, DI-DNA replizierender Pflanzen nicht deutlich erkennbar. Der geringe Prozentsatz an transgenen Pflanzen, die überhaupt zur DI-DNA Replikation in der Lage waren, würde jedoch dafür sprechen, mit anderen Linien weiterzuarbeiten, in denen diese Replikation zu einem höheren Prozentsatz geschieht.

### **Linie 84111 K**

Die Linie 84111 K wurde aus der Kreuzung der Linie S1-(D106) mit VC3-6 erhalten. Sie wies mit nur 43% einen geringen Anteil transgener Pflanzen auf. Allerdings replizierten 78% dieser transgenen Pflanzen nach BCTV Infektion DI-DNA. Von diesen Pflanzen entwickelten 20 keine bzw. 16 milde Symptome; nur 2 wiesen starke Symptome auf (Tab.8).

Transgene Pflanzen ohne replikative DI-DNA verhielten sich ähnlich: 7 trugen keine Symptome, 4 Pflanzen milde. Da diese Pflanzen sich nach Southern Blot Analyse als infiziert herausstellten, scheint diese Linie eine gewisse Disposition aufzuweisen, mit der BCTV Infektion leichter umgehen zu können.

Dieser Annahme widersprechen jedoch die Ergebnisse der nicht transgenen Pflanzen, von denen nur 9 keine Symptome, 44 milde und 13 starke Symptome trugen.

### **Linie 84107 K**

Die Linie 84107 K wurde aus der Kreuzung der Linie S1-(D106) mit VC3-6 erhalten.

61% der Pflanzen waren transgen, 67% davon produzierten replikative DI-DNA nach BCTV Infektion. 8 dieser Pflanzen waren symptomfrei, 14 zeigten milde und 2 starke Symptome (Tab.8).

Die nicht-transgenen bzw. transgenen, nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen zeigten ebenfalls einen hohen Anteil mit milden Symptomen. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Abweichung der DI-DNA replizierenden Pflanzen und ihrer Symptomverteilung gegenüber den nicht-transgenen. Der  $\chi^2$ -Wert für diese Linie betrug 6,65. Dieser Wert

liegt wiederum nur knapp oberhalb der Grenze der statistischen Zulässigkeit dieses Tests. Da infizierte Pflanzen dieser Linie durchweg einen hohen Anteil an milden Symptomen aufwiesen, könnte man bei dieser Linie eher auf einen Schutzeffekt durch andere Faktoren, als die Resistenzvermittlung durch replikative DI-DNA schließen. Es bleibt zu diskutieren, ob bei dieser Linie durch die Kreuzung ein Heterosis-Effekt aufgetreten ist.

### **Linie 84118 T**

Die Linie 84118 T wurde aus der Kreuzung der Linie S1-(R12) mit VC3-8 erhalten. Auch diese Linie stammt von der Zuckerrübenlinie VC3-8 ab, welche mit der Linie 71034 T schon einmal eine geeignete Linie mit Resistenzwirkung hervorbrachte. Linie 84118 T entwickelte ebenfalls die gängigen BCTV Symptome.

63% der Pflanzen dieser Linie waren transgen. In 82% der infizierten Pflanzen wurde DI-DNA nachgewiesen. Diese Pflanzen entwickelten allerdings zu gleichen Teilen milde bzw. starke Symptome (Tab.8).

Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Abweichung der DI-DNA replizierenden Pflanzen und ihrer Symptomverteilung. Diese Linie würde allerdings im Vergleich zu anderen Linien, die sich in der statistischen Analyse ebenfalls als prinzipiell geeignet herausstellten, kaum zur weiteren Zucht geeignet sein, da die Hälfte der transgenen, DI-DNA replizierenden Pflanzen starke Symptome entwickelten.

### **Linie 84124 T**

Die Linie 84124 T wurde aus der Kreuzung der Linie S1-(R13) mit VC3-8 erhalten. Diese Linie stammt auch von der Zuckerrübenlinie VC3-8 ab, welche mit der Linie 71034 T und 84118 T schon einmal eine geeignete Linie mit Resistenzwirkung hervorbrachte.

Linie 84124 T unterschied sich von allen bisher getesteten Linien in ihrer Symptomausprägung (Abb.8): die mit Symptombild „mild“ klassifizierten Pflanzen entwickelten nach einer erfolgten BCTV Infektion zunächst die üblichen Symptome, wie Blattkräuseln und verzögerten Wuchs. Nach kurzer Zeit (3 Wochen nach Infektion) wuchsen die Pflanzen jedoch auf normale Größe heran. Sie waren ab diesem Zeitpunkt nur durch ein schwaches Blattrollen von symptomfreien Pflanzen zu unterscheiden. Die



als „stark“ klassifizierten Pflanzen zeigten die typische Wachsminderung, neben dem üblichen stärkeren Blattrollen. Im Vergleich zu anderen Linien wären diese Pflanzen jedoch eher als „mild“ eingestuft worden.

Diese Linie hatte mit 86% einen hohen Anteil transgener Pflanzen. 78% dieser Pflanzen replizierten DI-DNA nach BCTV Infektion. Davon waren 38 symptomfrei, 10 entwickelten milde Symptome, nur 3 starke (Tab. 8).

Die nicht-transgenen bzw. transgenen, nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen zeigten ebenfalls eine Aufspaltung der Symptome (Tab. 8).

Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Abweichung der DI-DNA replizierenden Pflanzen und ihrer Symptomverteilung gegenüber den nicht-transgenen bzw. transgenen, nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen, sodass von einer Resistenzwirkung durch Replikation transgener DI-DNA ausgegangen werden kann. Auch aufgrund der besonderen Symptomatik und des beschriebenen „Erholungseffekts“ innerhalb dieser Linie sollte an ihr weitere Forschung betrieben werden.

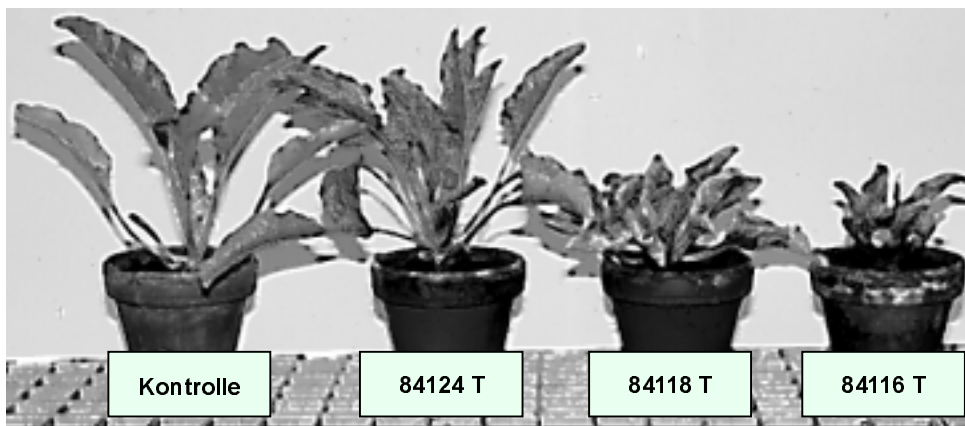


Abb.8:  
Sympt  
omaus

prägung der Linie 84124 T im Vergleich zu  
und 84116 T, 50 dpi

84118 T

Kontrolle: nicht-inokulierte Pflanze. Alle anderen Pflanzen zeigen die typischen **milden** Symptome der einzelnen Linien. Pflanzen der Linie 84124 T wuchsen auf die volle Größe der Kontrollpflanze heran und zeigten nur noch ein schwaches Blattrollen. Pflanzen mit starken Symptomen dieser Linie entsprechen in ihrer Symptomatik den hier gezeigten Pflanzen der Linie 84118 T mit milden Symptomen. Die Pflanzen mit milden Symptomen der Linien 84118 T und 84116 T zeigen eine starke Wachsminderung und starkes Blattrollen. Zum Zeitpunkt 50 dpi waren annähernd alle Pflanzen mit starken Symptomen verstorben.

### 1.1.3 Weitere Linien

Gegen Ende der Arbeit wurden noch weitere Linien inokuliert. 30 Tage nach Inokulation wurden Blattproben genommen und bei -20°C eingefroren. Die Analyse dieser Linien mittels Southern Blot und PCR wurde jedoch aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt. Tabelle 9 zeigt die Symptomanalyse dieser Linien am Tag der Probenahme.

Tab.9: Symptomanalyse weiterer inokulierter Linien

Linie	Kreuzung	inokulierte Pflanzen	Symptome		
			ohne	mild	stark
84101 T	S1-(R13)*(VC3-3)	91 / 92	1	11	80
84164 T	S1-(R13)*(VC14-3)	79 / 80	11	27	42
84104 T	S1-(R12)*(VC3-6)	95 / 96	6	84	6
84151 T	S1-(R20)*(VC14-2)	32 / 33	4	11	18
84147 T	S1-(R13)*(VC14-2)	99 / 100	20	69	11
84142 T	S1-(R13)*(VC14-2)	95 / 96	10	49	37
84137 T	S1-(R20)*(VC14-1)	34 / 35	2	14	19

Die Symptomanalyse zeigt, dass auch in diesen Linien eine Symptom- aufspaltung erfolgte. Anhand der beobachteten Symptome wäre eine Analyse der Linien 84104 T, 84147 T und 84142 T noch von Interesse, da in diesen Linien eine hohe Anzahl von Pflanzen mit milden bzw. ohne Symptome aufgetreten sind. Dennoch lässt sich keine Aussage über die Güte der Linien machen, da diese Angaben ohne die genaue Analyse durch Southern Blot und PCR bloße Mutmaßungen darstellen.

## **2. Infektionen von doppelhaploiden Pflanzen**

Die doppelhaploiden Pflanzen stammten aus der Gewebekultur und wurden über die Kanamycin-Resistenz auf das Vorhandensein des Transgens selektiert. Die Pflanzenlinien sollten somit entweder zu annähernd 100% transgen oder nicht-transgen sein. Ein Spaltungsverhältnis der Transgenität, wie es sich bei den Kreuzungslinien ergab, war so ausgeschlossen.

Die Pflanzen wurden schon als größere Pflanzen (mind. 3 - 4 Folgeblätter, sichtbarer Rübenkörper) von der Fa. Planta angeliefert. Sie wurden zwei Tage im Gewächshaus akklimatisiert und dann nach der üblichen Methode agroinokuliert (II.9.1.). Die ersten 7 Linien wurden noch mit der Insektenpräpariernadel inokuliert, was sich als sehr schwierig herausstellte, da die schon wesentlich größeren Pflanzen die Nadel schnell verbogen und das meristematische Zielgewebe mit dieser kurzen Nadel kaum erreicht werden konnte.

Die weiteren Chargen wurden dann mit einer gebrauchsblichen Stecknadel inokuliert, was sowohl die Arbeit angenehmer gestaltete, als auch die Infektionsrate steigerte.

Die Pflanzen wurden wöchentlich auf ihre Symptome untersucht. Ca. 4 Wochen nach Inokulation wurden die 2 jüngsten Blätter als Probe genommen. Die DNA wurde extrahiert (II.5.2.1), die Analyse auf Transgenität (II.7.2.) und replikative DI-DNA (II.7.3.) mittels PCR angeschlossen. Nur symptomfreie Pflanzen wurden mittels Southern Blot (II.6.2.) analysiert, um die Infektion mit BCTV nachzuweisen.

Die Einteilung der Symptome erfolgte bei Doppelhaploiden nur anhand der Stärke des Blattrollens, da die Pflanzen innerhalb einer Linie schon bei Anlieferung uneinheitlich groß waren. Milde Symptome waren leichtes Blattrollen, als stark wurden Pflanzen mit starkem Blattrollen eingeordnet, deren Blattspreite sich komplett eingerollt hatte. Pflanzen ohne Blattrollen wurden als symptomlos eingestuft.

Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tab.10: Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten doppelhaploiden Pflanzen**

Linie	inokulierte Pflanzen	Infektionsrate	Transgen	replikative DI-DNA	Symptome			$\chi^2$ -Wert
					ohne	mild	stark	
207 OV1	27	100%	pos. 27	pos. 1		1		1,45
				neg. 26	5	11	10	
218 OV4	27	100%	pos. 27	pos. 4	2	2		0,85
				neg. 23	8	11	4	
406 OV1	27	100%	pos. 27	pos. 11	1	6	4	0,59
				neg. 16	2	8	6	
612 OV9	27	100%	pos. 27	pos. 0				-
				neg. 27	11	3	13	
616 OV5	27	100%	pos. 27	pos. 2			2	0,08
				neg. 25			25	
619 OV8	27	100%	pos. 27	pos. 0				-
				neg. 27	12	1	14	
704 OV5	27	54%	pos. 14	pos. 0				-
				neg. 14	12		2	

Für diese Untersuchungen gilt ein anderer  $\chi^2$ -Wert, als bei den Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generationen, da der Freiheitsgrad FG hier nur 1 beträgt. Der  $\chi^2_{(\text{Tab.})}$  beträgt somit 3,84.  $\chi^2$ -Werte, die kleiner als der Tabellenwert sind, weisen darauf hin, dass sich die transgenen Pflanzen, die DI-DNA replizieren nicht von den nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen unterscheiden. Wie aus der Tabelle 10 ersichtlich, ergab sich in keiner der sieben untersuchten Linien ein  $\chi^2$ -Wert, der größer als der Tabellenwert (V.5.4) war. Deshalb kann in keinem Fall von einer Resistenzwirkung durch DI-DNA ausgegangen werden. In drei der sieben Linien konnte kein  $\chi^2$ -Wert berechnet werden, da keine Replikation von DI-DNA beobachtet werden konnte.

Die untersuchten doppelhaploiden Pflanzen entwickelten erst vier Wochen nach Inokulation BCTV Symptome, da sie zum Zeitpunkt der Inokulation schon größer waren, als die Pflanzen der Kreuzungslinien. Nur 18 der 196 untersuchten Pflanzen replizierten DI-DNA. Diese Pflanzen zeigten ein uneinheitliches Symptombild (Tab.10):

Die einzige Pflanze der Charge 207 OV1, die DI-DNA replizierte, zeigte milde Symptome, während die nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen eine Symptomaufspaltung von stark infizierten bis hin zu symptomfreien Pflanzen aufwiesen.

Die Pflanzen der Charge 218 OV4, die DI-DNA replizierten, zeigten eine Symptomaufteilung von je zwei symptomlosen Pflanzen und zwei mit milden Symptomen. Die nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen zeigten eine ähnliche Aufteilung; starke Symptome wurden nur in 4 Fällen erhalten.

DI-DNA replizierende Pflanzen der Charge 406 OV1 zeigten eine Aufspaltung der Symptome von stark infizierten bis zu symptomlosen Pflanzen. Diese Aufspaltung der Symptome zeigte sich so auch bei den nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen.

Zwei Pflanzen der Charge 616 OV5 konnten DI-DNA replizieren. Sie entwickelten wie die nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen starke Symptome.

Die statistische Analyse dieser vier Chargen ergab, dass in keinem Fall eine signifikante Resistenzwirkung durch die Replikation von DI-DNA nachzuweisen war (Tab.10). Der geringe Prozentsatz an Pflanzen, die zur Mobilisierung von transgener DI-DNA fähig waren, lässt ebenfalls erkennen, dass diese Chargen nicht für weitere Züchtungsansätze verwendet werden sollten. Noch dazu konnte bei diesen Pflanzen keine Abmilderung der Symptome nachgewiesen werden.

Pflanzen der Chargen 612 OV9, 619 OV8 und 704 OV5 waren nicht in der Lage, das Transgen zu mobilisieren (Tab.10).

Charge 704 OV5 fällt innerhalb der untersuchten Chargen allerdings durch die geringe Infektionsrate von 54% auf. 13 der 28 Pflanzen konnten nicht infiziert werden. Dies lag wohl vor allem daran, dass die Pflanzen bei Anlieferung schon sehr groß waren (ca. 15 cm hoch, 6-8 Folgeblätter). Die nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen verhielten sich hier, wie man es von resistenten Pflanzen erwartet hätte - 12 der 14 Pflanzen zeigen keine Symptome, obwohl sie nachweislich infiziert wurden (Southern Blot Analyse, II.6.2). Da jedoch keine Replikation von DI-DNA stattfand, kann dieser Effekt nicht auf diese zurückzuführen sein. Dennoch scheinen Pflanzen dieser Charge mit einer BCTV Infektion besser fertig zu werden, als andere doppelhaploide Pflanzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den sieben getesteten Chargen keine eine Korrelation zwischen Replikation transgener DI-DNA und Schutz vor BCTV Infektion erlaubt. In den meisten Fällen war die Fähigkeit zur Mobilisierung des Transgens so gering, dass kaum genügend Pflanzen zur Analyse zur Verfügung standen. Die Symptomentwicklung der getesteten Pflanzen widerspricht der theoretisch erwarteten. DI-DNA replizierende Pflanzen zeigten starke Symptome, nicht DI-DNA replizierende Pflanzen erschienen symptomlos.

## Weitere Linien

Es wurden noch weitere doppelhaploide Linien inokuliert. Von diesen wurden 30 Tage nach Infektion Blattproben genommen und bei -20°C eingefroren. Die Southern Blot Analyse (II.6.2.) und PCR Analyse (II.7.2. und II.7.3.) konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr erfolgen.

Tabelle 11 zeigt die Übersicht der Symptomanalyse dieser Linien am Tag der Probenahme.

Tab.11: Symptomanalyse doppelhaploide Pflanzen

Linie	Symptome		
	ohne	mild	stark
201 OV3	7	4	17
212 OV1	7	4	17
214 OV3	1	5	22
217 OV1	2	3	22
218 OV1	2	4	22
219 OV5	4	4	20
222 OV1	1		27
302 OV3	2	4	22
302 OV5	3	7	12
302 OV6			12
403 OV13	2	1	25
406 OV15	4	6	18
408 OV17	1	7	16
417 OV2	3	10	15
419 OV4	6	6	16
421 OV1	4		10
421 OV2	3		4
423 OV1	4	2	22
502 OV5	1		27
503 OV5			10
602 OV6	1		27
603 OV17		2	26
607 OV5	2		14
608 OV2	1	16	11
613 OV1	4	3	21
620 OV1	1	5	22
622 OV8	7	4	7
701 OV11	1	3	24

Linie	Symptome		
	ohne	mild	stark
703 OV5		6	22
703 OV17	1		27
704 OV3	3	9	16
704 OV20	5	4	19
7S2894	1	4	23
7S2905	6	16	22
7S3061	4	29	23
7S3067	2		38
7B6111	4	3	46

#### Zusammenfassung:

Von den 1200 infizierten Einzelpflanzen der doppelhaploiden Pflanzen waren nach 3 Monaten der Untersuchung über 800 Pflanzen verstorben.

Anhand der sieben ausführlich analysierten Chargen konnte bei keiner einzigen ein deutlicher Zusammenhang zwischen DI-DNA Replikation und Resistenzwirkung gegen BCTV erkannt werden. Es scheint unwahrscheinlich, dass sich unter den noch nicht analysierten Linien Chargen finden lassen, welche eine Resistenzwirkung durch replikative DI-DNA aufweisen, da die Pflanzen zum Großteil starke Symptome zeigten (Tab.11). Mittlerweile waren über 65% dieser Pflanzen gestorben.

Zu bemerken ist, dass die PCR-Analyse auf das Transgen mit diesen Proben erhebliche Schwierigkeiten bereitete. Das herkömmliche PCR-Schema (II.7.2.) erbrachte in den meisten Fällen zunächst keine Amplifikation des Transgens. Eine Optimierung der PCR mit neuen Primerkombinationen, verschiedenen Temperaturprofilen und *Taq* DNA Polymerasen anderer Firmen erbrachte auch nicht das gewünschte Ergebnis. Erst als die bisher „nicht-transgenen“ DNA-Proben mit dem Prep-A-Gene-Kit (Fa. Bio-Rad) einer weiteren Aufreinigung unterzogen wurden (II.8.2.), gelang auch in diesen Fällen der Nachweis der Transgenität.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die als „nicht-transgen“ eingestuft Pflanzenproben der F<sub>1</sub>-Linien 84116 T, 84118 T und 84124 T ebenfalls mit diesem Kit aufgereinigt, um zu untersuchen, ob in den vorherigen Experimenten auch schon dieses Problem - damals unbemerkt - auftrat.



Es stellte sich jedoch heraus, dass keine dieser als „nicht-transgen“ eingestuften F<sub>1</sub>-Proben transgen war.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass dieses Problem nur bei den Doppelhaploiden aus der Gewebekultur auftrat. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Pflanzen durch den Stress, dem sie z.B. bei der Kultivierung auf Kanamycin bzw. der kurzen Akklimatisierungsphase vor Infektion, ausgesetzt waren, vermehrt stress-induzierte Proteine gebildet hatten, welche bei der Nukleinsäureaufreinigung in der Probe verblieben und damit die PCR behinderten. Ähnliche Probleme sind in unserem Labor von anderen Pflanzenspezies bekannt (mündliche Mitteilung, Dr. Thomas Frischmuth).

### **3. Blattscheibentest**

Innerhalb dieses Projekts sollte ein Blattscheibentest zur Untersuchung der viralen Replikation für die Zuckerrübe etabliert werden. In der Literatur fanden sich mehrere Angaben bezüglich geeigneter Kultivierungsmedien [Schlangstedt *et.al*, 1992; Freytag *et.al*, 1988; Szabados und Gaggero, 1985; van Geyt und Jacobs, 1985; de Greef und Jacobs, 1979;].

Um die Medien vergleichen zu können, wurden aus den beiden Zuckerrübenlinien 4F0007 (sensitiv gegenüber BCTV-Infektion) und 3H9727 (resistent gegen BCTV-Infektion) sowohl Blattscheiben, als auch Blattstiele auf Festmedien inkubiert (II.9.2.ff). Die Inkubationszeit betrug zwei Wochen, wobei die Explantate nach einer Woche auf frische Medien überführt wurden. Es konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden:

Tab.12: Ergebnisse der Optimierung der Medienzusammensetzung im Blattscheibentest

<b>Medium</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<b>MS1</b>	einfache Herstellung gutes Wachstum beider Zuckerrübenlinien	keine
<b>MS2</b>	einfache Herstellung	schlechter Wuchs der Explantate
<b>MS3</b>	einfache Herstellung	schlechter Wuchs der Explantate
<b>B5</b>	keine	Explantate trocknen aus
<b>RV</b>	gutes Wachstum beider Zuckerrübenlinien	aufwendige Herstellung

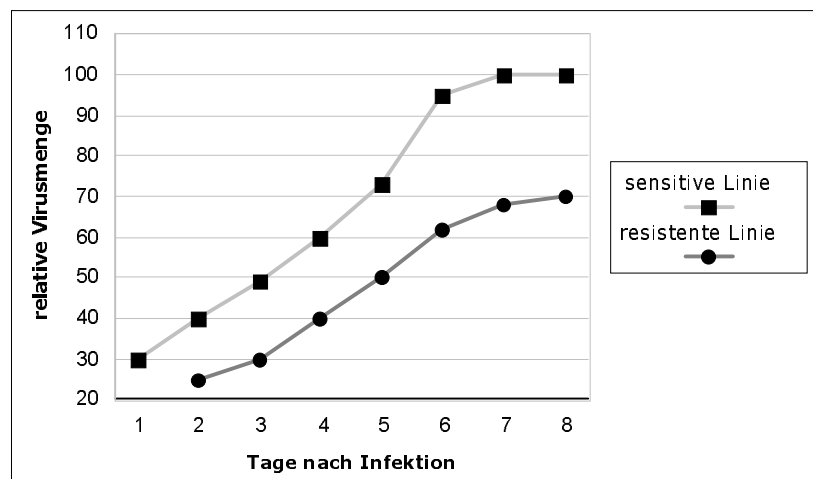
Die Blattstielexplantate erwiesen sich als ungeeignet zur Kultivierung. Die Blattstielstücke verfärbten sich nach 4 Tagen braun und bildeten kein Kallusgewebe. Dies wurde auf allen Medien beobachtet.

Aufgrund der leichteren Herstellung wurde im weiteren Verlauf das MS1-Medium zur Kultivierung der Zuckerrüben-Blattscheiben eingesetzt.

Der Blattscheibentest sollte als schnelle Methode etabliert werden, um resistente von sensitiven Zuckerrübenpflanzen unterscheiden zu können, sowie einen genauen Einblick in den Resistenzmechanismus der Zuchtlinie 3H9727 zu erhalten. Dazu wurden zunächst von der Linie 4F0007 und

3H9727 Blattscheiben auf Precallusing-MS1-Platten inkubiert. Nach Agroinfektion mit BCTVpBin1.2 LBA4404 wurden die Blattscheiben zwei Tage auf frischen Precallusing-Platten inkubiert und dann auf Selektivmedium (II.9.2.1) umgesetzt. Nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten wurden Proben genommen und die DNA extrahiert (II.5.2.1). Dieses Vorgehen war nötig, da die infizierten Blattscheiben keine Symptome entwickelten, obwohl sich das Virus in ihnen vermehrte. Die Analyse der replikativen viralen DNA-Formen erfolgte mit Hilfe des Southern Blots (II.6.2.).

Die Analyse der resistenten bzw. sensitiven Zuckerrübenlinien ergab, dass in der sensitiven Linie 4F0007 schon einen Tag nach Infektion replikative, virale DNA nachweisbar war, die in der resistenten Linie erst nach drei Tagen auftrat. Nach zwölf Tagen erreichte die Akkumulation von viraler DNA ihr Maximum in beiden Linien, wobei die sensitive Linie einen



höheren Anteil viraler DNA aufwies (Abb.9).

Abb.9: Schematische Darstellung des relativen Virus DNA Gehaltes über die Zeit der Probenahme.

Die Maximalmenge an Virus-DNA-Gehalt in der sensitiven Linie entspricht 100%. Die Werte wurden anhand der Intensität der Banden im Southern Blot ermittelt (Augenmaß).

Um zu klären, ob die Resistenzwirkung auf Replikations- oder Ausbreitungsebene zu suchen ist, wurden Protoplastenexperimente durchgeführt. Man wollte so den Parameter der Virusausbreitung außer Acht lassen. Verhielt sich die Virusreplikation in den Protoplasten wie in Blattscheiben, so müsste die Resistenzwirkung auf der Ebene der Replikation einsetzen. Wenn allerdings Unterschiede in der Virusreplikation zwischen Protoplasten und Blattscheiben zu beobachten wären, so müsste die Ausbreitung des Virus für das Resistenzphänomen verantwortlich sein.

Innerhalb dieser Arbeit wurde versucht, Protoplasten aus beiden Zuckerrübenlinien zu isolieren und diese mittels Elektroporation mit BCTVpBin1.2 DNA zu transformieren. Leider misslangen alle Versuche. Zum einen ließen sich die zwei Zuckerrübenlinien unterschiedlich gut protoplastieren - die Ausbeute an sensitiven Zuckerrübenprotoplasten war deutlich höher, als die der resistenten. Die Ausbeute im Allgemeinen variierte je nach der Qualität des Ausgangsmaterials. Eine Transfektion der Protoplasten war weder mit der Elektroporation (II.9.3.1) noch mit dem PEG-vermittelten Transfer (II.9.3.2) zu erreichen.

Im Verlauf von Transfektionsexperimenten der Zuckerrübenlinien 71036 K, 71037 K und 71038 K zeigte sich, dass die Zuverlässigkeit des Blattscheibentests zur schnellen Bestimmung von resistenten Zuckerrübenpflanzen nicht gewährleistet war.

Einige Pflanzen dieser drei Linien wurden nicht mit BCTV agroinokuliert. Nach Heranwachsen der Pflanzen bis zum 10. Folgeblatt wurden von jeder Pflanze vier Blattscheiben ausgestochen und durch Partikelbeschuss mit BCTV pBin1.2 DNA infiziert (II.9.2.4). Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurde aus den Blattscheiben DNA isoliert (II.5.2.1). Die Proben wurden zunächst über die Southern Blot Analyse (II.6.2.) auf Infektionsstärke (Gehalt an viraler DNA) und Gehalt an DI-DNA untersucht. Im Anschluss daran erfolgte die Analyse auf Amplifikation replikativer DI-DNA (II.7.3.) mittels PCR. Aus Blättern der nicht infizierten Pflanzen, von denen die Blattscheiben ausgestochen worden waren, wurde ebenfalls DNA isoliert um das Transgen mittels PCR nachzuweisen

(II.7.2.). Diese PCR Analyse konnte nicht mit der DNA aus den Blattscheiben durchgeführt werden, da die zum Beschuss eingesetzte BCTV DNA ebenfalls mit diesen Primern amplifiziert worden wäre. Tabelle 13 verdeutlicht die gewonnenen Ergebnisse.

Tab.13 : Zusammenfassung der Blattscheibeninfektionstests der Linien 71036 K, 71037 K und 71038 K

Linie	Pflanzen	Transgen*	replikative DI-DNA**	Infektionsgrad***		
				ohne	mild	stark
71036 K	4	pos. 0				
		neg. 4		1	3	
71037 K	40	pos. 5	pos. 1			1
			neg. 4	1	2	1
		neg. 35		7	16	12
71038 K	14	pos. 3	pos. 0			
			neg. 3	1	1	1
		neg. 11			8	3

\* Die Analyse auf Integration des Transgens ins Pflanzengenom erfolgte an DNA aus nicht-infizierten Blättern der jeweiligen Pflanzen.

\*\*Die Analyse auf replikative DI-DNA wurde nur an den Proben vorgenommen, die sich als transgen herausstellten.

\*\*\*Der Infektionsgrad wurde anhand des Southern Blots bestimmt. Blattscheibenproben, die ein ähnlich starkes Signal wie eine BCTV-sensitive, infizierte Kontrollpflanze ergaben, wurden als stark infiziert eingestuft. Proben mit wesentlich schwächerem Hybridisierungssignal wurden als mild infiziert eingestuft. Als nicht infiziert wurden Proben ohne jegliches Signal eingeordnet.

Die Ergebnisse dieses Experiments ermöglichen keine Aussage über die „Resistenz“ der Einzelpflanzen. Beispielsweise zeigte die einzige transgene, DI-DNA replizierende Probe ein starkes Hybridisierungssignal, welches vergleichbar mit dem Signal der sensitiven Kontrollpflanze war. Der Gehalt an viraler DNA innerhalb der Linien schwankte derart, dass es unmöglich war, einen Durchschnittswert für diese Proben zu finden. Wenn schon die einzelnen Pflanzen einer Linie so unterschiedlich auf die Infektion mit BCTV reagieren, ist diese Analysemethode denkbar ungeeignet, um einen Schnelltest für verschiedene Zuckerrübenlinien zu etablieren. Jedem Test müsste eine Evaluierung der einzelnen Linie vorausgehen - und schon diese wäre aufgrund der großen Schwankungen des Infektionsgrads nur mit erheblichem Aufwand (z.B. Erhöhung des Probeumfangs) zu erreichen.

Es erwies sich jedoch, dass der Blattscheibentest gekoppelt mit der Partikelbeschusstechnik ein verlässliches Mittel zur viralen Replikationsbestimmung darstellt. Mit den oben genannten Linien 71036 K- 71038 K konnte zwischen 75% bis 93% replikative Virus DNA nachgewiesen werden. Da BCTV-Infektionen nicht durch mechanische Inokulation (Aufreiben von Virus-DNA) von Pflanzen hervorgerufen werden können,

wird normalerweise infektiöse virale DNA in einem geeigneten Agrobakterium Stamm benötigt. Diese herzustellen ist zeit- und arbeitsaufwendig. Der Partikelbeschuss von Blattscheiben ermöglicht es dennoch, lineare Virus-DNA auf Replikation zu testen. Lassen sich nach Beschuss der sensitiven Blattscheiben replikative Virus-DNA-Formen nachweisen, so kann man davon ausgehen, dass das Virus intakt ist.

#### 4. Bestimmung von BCTV-Varianten in Idaho, USA

In Idaho wurden Blattproben von 114 Pflanzen gesammelt, die augenscheinlich BCTV-infiziert waren.

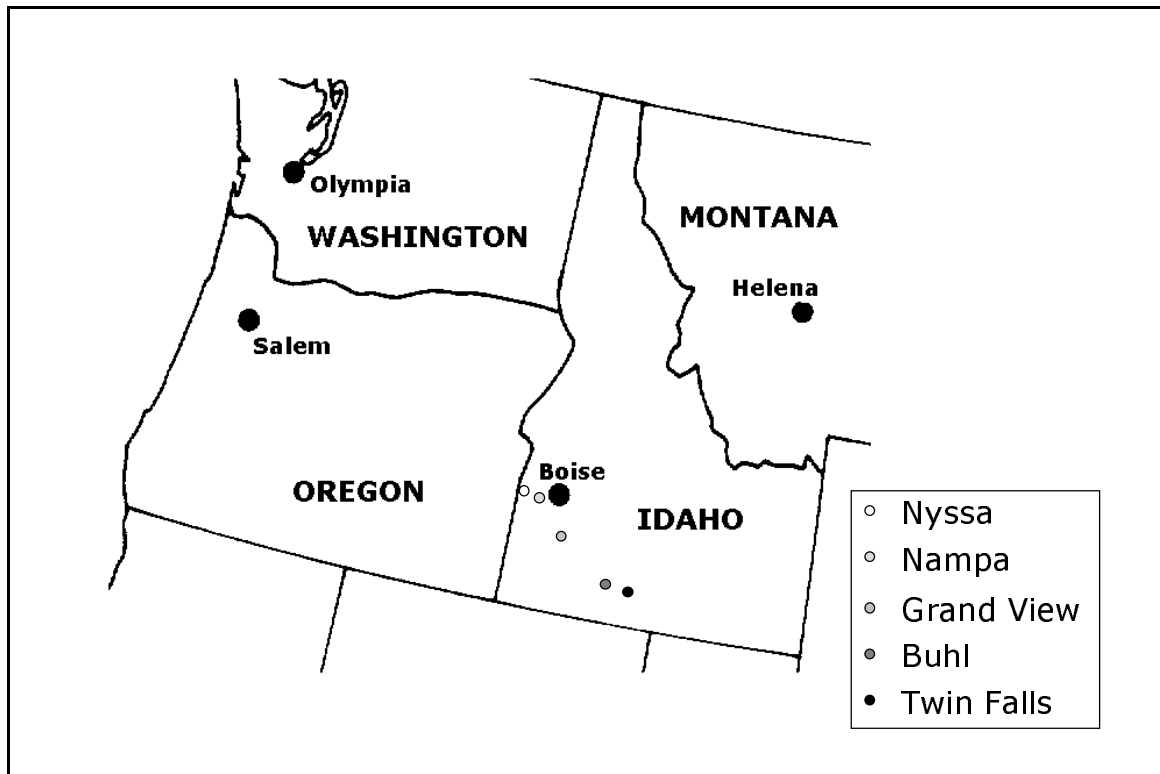


Abb.10: Karte des US-Bundesstaates Idaho  
gezeigt sind ausgewählte Orte der Probenahme

Von diesen Pflanzen wurde die Gesamt-DNA präpariert (II.5.2.1) und mittels Southern Blot (II.6.2.) auf BCTV-Infektion untersucht. Mittels Klonierung konnten von der Probe 105 erste Sequenzdaten erhalten werden, die zum Design eines ersten Primerpaares herangezogen wurden, um gesamt-genomische BCTV-Klone mittels PCR (II.7.4.) aus den Proben zu generieren. Es handelte sich hierbei um die Primer BCTV 14 und BCTV 15, die eine *Bam*HI-Resitriktionsschnittstelle enthielten:

**BCTV 14:** 5'-AGC GGA TCC AAC CCA AAA TAA GAA TCG G-3'

**BCTV 15:** 5'-AGC GGA TCC CGC TGC GCG GCC TTT TAG-3'

Die Amplifikation von PCR-Produkten erfolgte bei einer Anlagerungs-temperatur von 65°C und es gelang eine Amplifikation von entweder



gesamt-genomischer DNA (Abb.11, Spuren 2,3,4) oder subgenomischer DNA (Abb.11, Spuren 5,6,8,10)

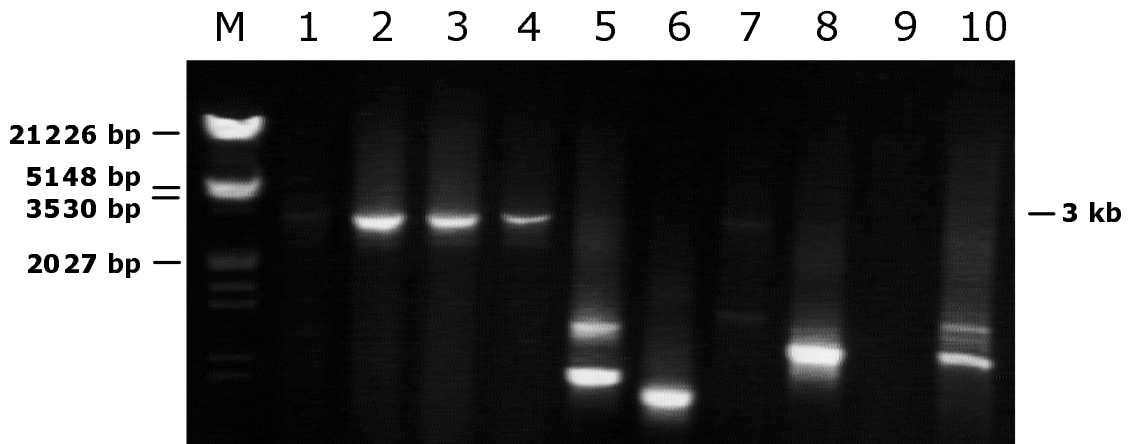


Abb.11: Beispielfoto einer Agarosegelelektrophorese der USA-Proben Nr. 1 - 10 nach PCR mit den Primern BCTV 14 und 15

M: Marker,  $\lambda$ -DNA, *EcoRI/HindIII* verdaut; es wurden je 5  $\mu$ l PCR-Ansatz aufgetragen. Spuren 2,3 und 4 zeigen ein gesamt-genomisches Amplifikat von ca. 3 kb Größe. Spuren 5,6,8 und 10 zeigen verschiedene subgenomische Amplifikate.

Die Proben, bei denen mit den Primern BCTV 14 und 15 keine Amplifikation von DNA erfolgte, wurden mit sogenannten degenerierten Primern untersucht (II.7.1). Die Primer BCTV 3 und BCTV 5 wurden anhand der Sequenz der Intergen Region von BCTV erstellt. Da sich die bisher bekannten Stämme dort nur in wenigen Nukleotiden unterscheiden, wurden diese Sequenzunterschiede in Primer BCTV 5 berücksichtigt:

**BCTV 3:** 5'-AGC AAG CTT AAT AAT ACC GGA TGG CCC-3'

**BCTV 5:** 5'-AGC AAG CTT TAT TA (AT) (AT) (AG) C GGA TGG CCC-3'

Die Amplifikation von PCR-Produkten erfolgte bei einer Anlagerungstemperatur von 48°C.

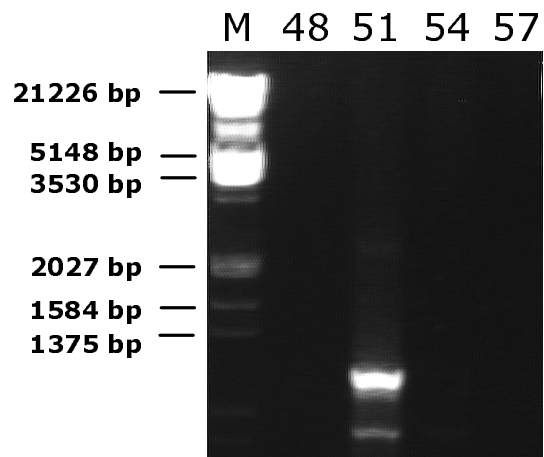


Abb.12: Beispielfoto einer Agarosegelelektrophorese der USA-Proben Nr. 48, 51, 54, 57 nach PCR mit den Primern BCTV 3 und 5. M: Marker,  $\lambda$ -DNA, *EcoRI/HindIII* verdaut; es wurden je 5  $\mu$ l PCR-Ansatz aufgetragen. Nur Probe 48 zeigt ein Amplifikat von ca. 0,5 kb Größe.

Mit Hilfe dieser beiden Primerpaare konnte in den meisten der 114 Proben virale BCTV-DNA nachgewiesen werden (Tab.14: Grau unterlegt sind die Proben, bei denen mittels PCR gesamt-genomische Amplifikate erhalten werden konnten.)

Tab.14: Analyse der USA-Proben mittels Southern Blot und PCR

Standort	Feld	Pflanze	Nummer	Southern Blot	PCR 14 / 15	PCR 3 / 5
Beta	1	1	94	+	+	n.d.
		2	89	+	+	n.d.
		3	106	+	+	n.d.
		4	76	+	+	n.d.
		5	93	+	-	+
BSDF	1	1	95	+	+	n.d.
		2	96	+	+	n.d.
		3	105	+	+	n.d.
		4	77	+	-	+
		5	90	+	-	+
Buhl	1	1	98	+	+	n.d.
		2	79	+	+	n.d.
		3	78	+	+	n.d.
		4	97	+	+	n.d.
		5	84	+	+	n.d.
	2	1	80	+	-	+
		2	108	+	+	n.d.
		3	109	+	+	n.d.
		4	107	+	+	n.d.
		5	83	+	+	n.d.
	3	1	54	+	-	+
		2	66	-	-	+
		3	35	+	+	n.d.
		4	81	+	+	n.d.
		5	82	+	-	+
Grand View	1	1	51	-	+	+
		2	Probe nicht vorhanden			
		3	69	+	+	n.d.
		4	48	-	-	-
		5	65	+	+	n.d.
	2	1	49	+	+	n.d.
		2	52	+	+	n.d.
		3	64	+	+	n.d.
		4	70	+	+	n.d.
		5	63	+	+	n.d.
	3	1	59	+	+	n.d.
		2	5	+	+	n.d.
		3	55	+	+	n.d.
		4	67	+	+	n.d.
		5	50	+	+	n.d.

Standort	Feld	Pflanze	Nummer	Southern Blot	PCR 14 / 15	PCR 3 / 5
Grand View	4	1	60	+	+	n.d.
		2	56	+	+	n.d.
		3	57	+	-	+
		4	4	+	+	n.d.
		5	58	+	-	+
Marsing	1	1	33	+	-	+
		2	25	+	+	n.d.
		3	42	+	+	n.d.
		4	37	+	+	n.d.
		5	40	+	+	n.d.
	2	1	39	+	+	n.d.
		2	26	+	+	n.d.
		3	2	+	+	n.d.
		4	32	+	-	+
		5	38	+	-	+
	3	1	11	+	+	n.d.
		2	19	+	-	+
		3	1	+	+	n.d.
		4	34	+	-	+
		5	29	+	-	+
Nampa	1	1	24	+	-	+
		2	23	+	+	n.d.
		3	14	+	+	n.d.
		4	9	+	-	+
		5	36	+	+	n.d.
	2	1	72	+	+	n.d.
		2	92	+	+	n.d.
		3	28	+	+	n.d.
		4	27	+	+	n.d.
		5	12	+	+	n.d.
	3	1	47	+	-	+
		2	85	+	+	n.d.
		3	30	+	+	n.d.
		4	111	+	+	n.d.
		5	10	+	+	n.d.
	4	1	112	+	+	n.d.
		2	91	+	-	+
		3	110	+	+	n.d.
		4	86	+	-	+
		5	61	+	-	+
Nyssa	1	1	100	+	+	n.d.

Standort	Feld	Pflanze	Nummer	Southern Blot	PCR 14 / 15	PCR 3 / 5
Nyssa	1	2	71	+	+	n.d.
		3	99	+	+	n.d.
		4	113	+	+	n.d.
		5	88	+	+	n.d.
	2	1	75	+	+	n.d.
		2	101	+	+	n.d.
		3	73	+	+	n.d.
		4	31	+	+	n.d.
		5	74	-	+	n.d.
	3	1	114	+	-	+
		2	41	+	-	+
		3	87	+	-	+
		4	43	+	-	+
		5	102	+	-	+
	4	1	46	+	-	+
		2	7	+	+	n.d.
		3	106	+	-	+
		4	104	+	+	n.d.
		5	44	+	-	+
	Twin Falls	1	1	15	+	+
2			8	+	+	n.d.
3			18	-	+	n.d.
4			6	+	+	n.d.
5			45	+	-	+
2		1	16	-	-	-
		2	20	+	-	+
		3	17	+	-	+
		4	68	+	-	+
		5	62	+	-	+
3		1	53	+	+	n.d.
		2	3	+	+	n.d.
		3	13	+	+	
		4	22	+	+	
		5	21	+	-	+

+ = nachgewiesen, - = nicht nachgewiesen, n.d. = nicht analysiert

Es wurde im Anschluß versucht, die gesamt-genomischen Amplifikate in den Vektor pBluescript KS+ zu klonieren (II.4.). PCR-Produkte, die durch die Primer BCTV 14 und BCTV 15 erhalten wurden (II.7.4.), wurden gelgereinigt (II.8.2.), einer Verdauung mit *Bam*HI unterzogen (II.8.3.) und in *Bam*HI-verdauten Vektor ligiert (II.8.5.). Nach Transformation in *E. coli* JM83 (II.4.1.2) konnten die im folgenden beschriebenen Klone erhalten werden.

#### 4.1 BCTV105

Die Probe 105 stammt aus der Züchtungsanstalt der Fa. Betaseed in Idaho. Das Isolat wurde über die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle in pBluescript KS+ kloniert. Der Klon wurde vollständig sequenziert. Die daraus abgeleitete Genomorganisation ist in Abb. 13 dargestellt.

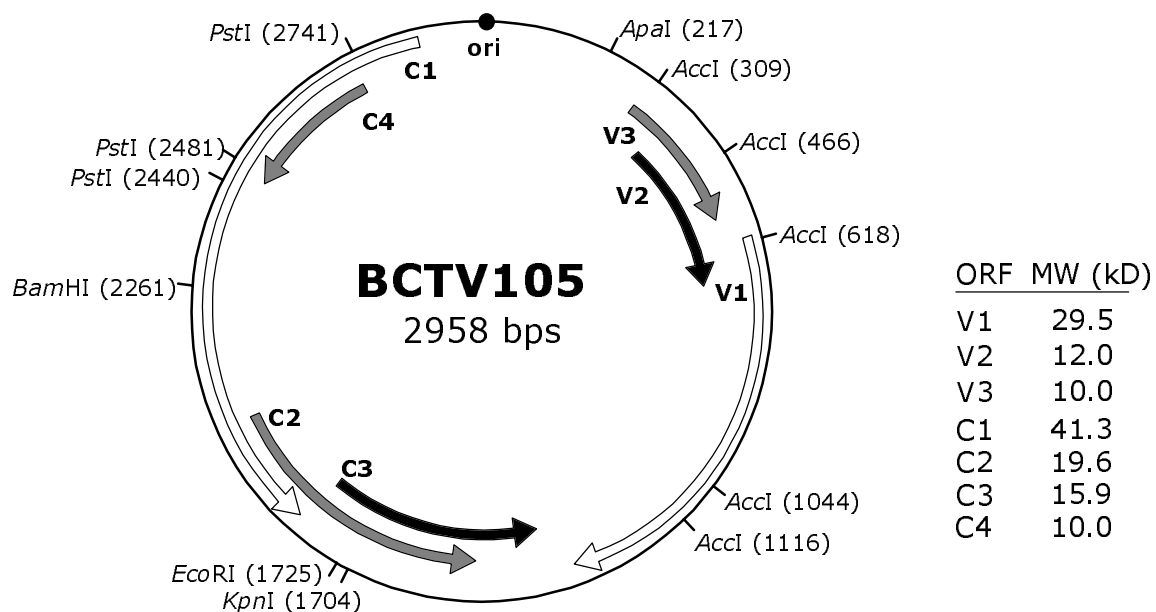


Abb.13: Genomorganisation von BCTV 105  
 ori: Replikationsursprung, Pfeile: Offene Leserahmen (ORFs),  
 Positionen der Restriktionsschnittstellen in Klammern.  
 Die Größe des codierten Genproduktes ist in kD angegeben.

Der Homologievergleich über die gesamte DNA-Sequenz (s. Anhang V.5.3.1) mit den bekannten BCTV-Stämmen (Tab.15) ergab, dass Isolat 105 die höchste Identität mit 95,8% zum CFH-Stamm aufweist.

Tab.15: DNA-Sequenzvergleich von Isolat 105 mit den bekannten Curtoviren

	Virus				
	BCTV-Cal	BCTV-Wor	BCTV-CFH	HrCTV	TPCTV
BCTV 105	85.5%	84%	95.8%	58,7%	53,3%

Der Vergleich der Nukleotidsequenz der Offenen Leserahmen des Isolates 105 mit denen der Curtoviren ergab folgende Identitäten (Tab.16):

Tab.16: Vergleich der Offenen Leserahmen des Isolats 105 mit den korrespondierenden ORFs der bisher sequenzierten Curtoviren

	Virus				
	BCTV-Cal	BCTV-Wor	BCTV-CFH	HrCTV	TPCTV
BCTV 105					
C1	72,5%	78,8%	98,5%	56,8%	67,3%
C2	78,8%	81,3%	99,0%	47,8%	52,1%
C3	83,7%	71,7%	99,3%		56,0%
C4	72,0%	69,0%	98,9%	52,9%	72,6%
V1	99,0%	97,2%	99,5%	79,9%	43,7%
V2	99,5%	97,6%	97,6%	75,9%	44,8%
V3	99,6%	97,7%	97,4%	79,7%	

graue Felder: der betreffende Leserahmen fehlt im Vergleichsvirus

Anhand des Vergleiches der einzelnen Leserahmen ist deutlich, dass das Isolat 105 dem CFH-Stamm am ähnlichsten ist. Leserahmen V2 bzw. V3 zeigen zwar eine etwas höhere Homologie zum Kalifornischen- bzw. Worland-Stamm, doch in allen übrigen Leserahmen zeigt der CFH-Stamm die größte Identität. Deutlich verschieden sind die nicht-BCTV Stämme der Curtoviren. Die höchste Homologie besteht zu HrCTV im V1 Leserahmen, zu TPCTV im C4 Leserahmen.

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch im Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser Leserahmen wieder (Tab.17).

Tab.17: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Offenen Leserahmen des Isolats 105 mit den bekannten Curtoviren

	Virus				
	BCTV-Cal	BCTV-Wor	BCTV-CFH	HrCTV	TPCTV
BCTV 105					
C1	70,7%	79,6%	98,0%	54,1%	68,7%
C2	63,0%	62,0%	97,1%	33,3%	23,6%
C3	82,4%	67,6%	99,3%		35,8%
C4	50,0%	50,7%	97,5%	60,0%	44,9%
V1	98,8%	98,0%	98,4%	81,1%	22,2%
V2	99,0%	95,1%	94,1%	33,3%	37,5%
V3	98,9%	97,7%	97,1%	71,3%	

graue Felder: der betreffende Leserahmen fehlt im Vergleichsvirus

Das Rep Protein (Leserahmen C1) von BCTV105 weist die höchste Homologie zum CFH-Stamm auf. Gleiches gilt für die Proteine TrAP (ORF C2), REn (ORF C3) und für ORF C4, der eine Rolle in der Symptomentwicklung zu spielen scheint.

Die Virusstrang-orientierten Genprodukte zeigen die höchste Identität mit dem Kalifornischen Stamm: das Hüllprotein (ORF V1), das Transportprotein (ORF V3) und Leserahmen V2 unterscheiden sich allerdings nicht so drastisch von BCTV-CFH und BCTV-Wor, wie die Komplementärstrang-codierten Genprodukte von BCTV-Cal und BCTV-Wor.

Wiederum deutliche Unterschiede sind für die Viren HrCTV und TPCTV zu erkennen: während das Hüllprotein und das Transportprotein von HrCTV noch die größte Verwandtschaft zu BCTV105 aufweisen, sind zu den anderen Genprodukten max. 60% Identität erreicht. Noch größere Abweichungen zeigt TPCTV. Dessen Rep Protein besitzt die höchste Homologie zu BCTV105 - alle anderen Genprodukte weisen Sequenzübereinstimmungen von < 50% auf.



Eine Besonderheit auf DNA-Ebene der Intergenischen Region weist der Sequenzbereich zwischen den Nukleotiden 66 bis 168 auf. Er besitzt eine höhere Homologie zum Kalifornischen BCTV-Stamm von 97,1%, während zum CFH-Stamm nur eine Identität von 71,2% besteht (Abb.14).

```

                2869                                     2928
BCTV 105 CATAT-TGAATCG--GGC-TCTCTT--CAAATCCTC-TATCAATTGGGTGCTTTGG-GTG
BCTV-Cal  ...T.G.ACTC..AT.A.G.GG...AG..T..TAA.A...T...A-.TA...A..A
BCTV-CFH  .....-.....-.....-.....-.....C.....-.....-.....-.....

                2929                                     2958/1                                     13
BCTV 105 CTCT-TA----AATACCAC---CA-AGGGGCCATCCGCATTAATATTACCGGATGGCCCC
BCTV-Cal  T.A.A..TATT.G...A..TTT..T.A.....TTA.....G
BCTV-CFH  .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....

                14                                     73
BCTV 105 CAAAAAATACGTGGCCCAATGAAAAATGCCACGTGGAAAGCAAAGATGT-CGATGTGA
BCTV-Cal  A.....GG.CA-.....C....CG..A.....G.GG.CT.T..AAT.....
BCTV-CFH  .....-.....-.....-.....-.....T.....-.....T.....-T.....

                74                                     133
BCTV 105 CGTTTTTGAGCGGGAAACTTCCTCAAGAAGATTCCTGCGGGAAACTTCCTGAAGAAGATT
BCTV-Cal  .....G.....
BCTV-CFH  T.GA...G.....G.....T...-.....-.....C.....-CC

                134                                     193
BCTV 105 CCTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAATATAAGTGGACA-ACTTTATTAAAGTAACT
BCTV-Cal  .....A.G...G.....-.....
BCTV-CFH  .....T---.TT..C..AG.C.--AA--.AG...-CC....T...G.-.G..A...--

                194                                     153
BCTV 105 TTACTTTATTAAAAGTAAAGTAA-GTGGGCCCCACAGGAACTTGCTCAGCAAGTTTGA
BCTV-Cal  .....-.....T.....
BCTV-CFH  ---.---G.....G.TC.TT...T.....A.....A.....C...

                154                                     204
BCTV 105 ATTATGTCGTTTTATATACGTTATTTTTACATGTATATGTACTTATAAATG
BCTV-Cal  .....A.....
BCTV-CFH  .....T..TG...A.....

```

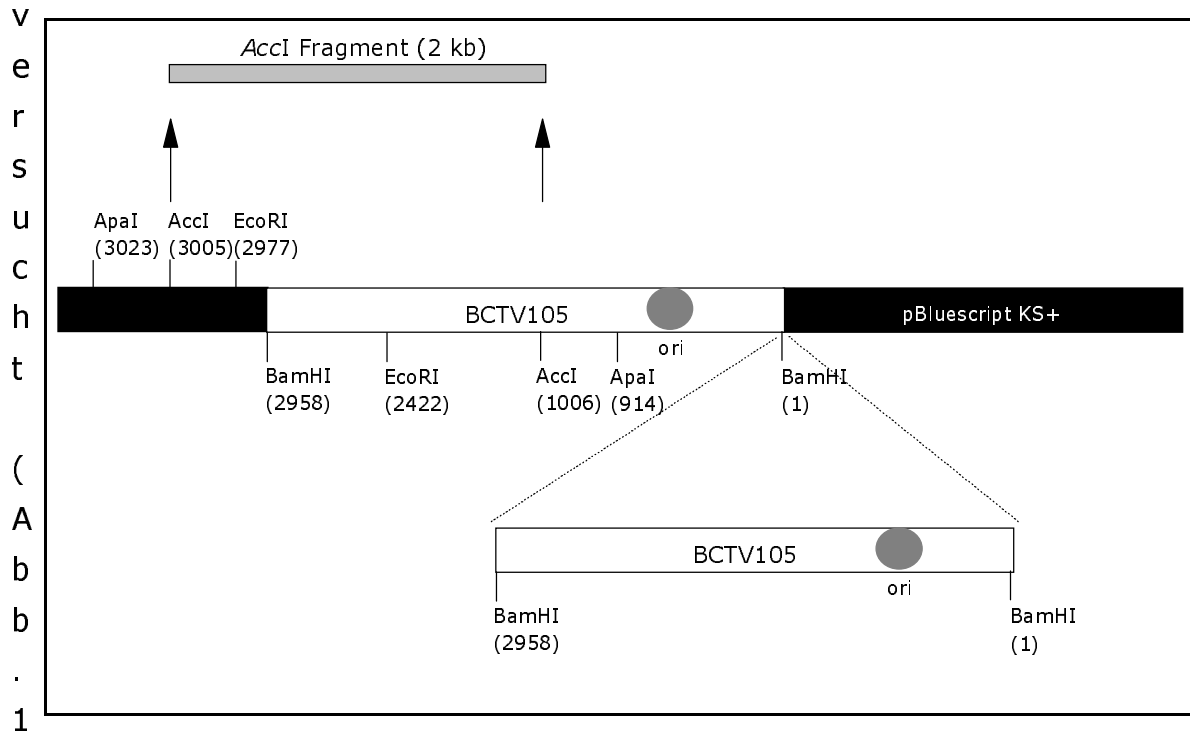
Abb.14: Homologievergleich der DNA-Sequenz innerhalb der Intergenischen Region von BCTV105 mit dem CFH- und Kalifornischen Stamm.

dunkelgrau: Replikationsursprung, Pfeile: Sequenzwiederholungen  
hellgrau: Bereich hoher Homologie zwischen BCTV105 und BCTV-Cal.

Um zu klären, ob das klonierte Virus infektiös ist, wurde die DNA durch Restriktion mit *Bam*HI linearisiert (II.8.3.) und Blattscheiben der sensitiven Zuckerrübenlinie 4F007 mit der Partikelkanone beschossen (II.9.2.4). Die Blattscheiben wurden 1-7 Tage lang auf MS1-Nährmedium inkubiert (II.9.2.1). Die Probenahme erfolgte an verschiedenen Tagen nach Beschuss, aus ihnen wurde DNA extrahiert (II.5.2.1) und diese im Southern Blot analysiert (II.6.2.). Es konnte keine Replikation von

viraler DNA nachgewiesen werden. Es scheint, dass die klonierte Virus-DNA nicht in der Lage ist sich zu replizieren. Zur verlässlichen Replikationsanalyse müsste also ein Bitmer-Klon hergestellt werden.

Die Erzeugung eines Bitmer-Klons wurde auf die verschiedenste Weise



5).

Abb.15: Erzeugung eines Bitmer-Klons anhand des Beispiels der *AccI*-Verdauung (Erläuterung im Text)

Es wurden zunächst sog. „Rumpfkclone“ von BCTV105 erstellt, die nur ein Teilstück („Bit-Stück“) des viralen Genoms enthielten. Durch Restriktion (II.8.3) von BCTV105pBluescript mit *AccI* wurde ein Fragment von ca. 2 kb Größe ausgeschnitten (in Abb.15 hellgrau dargestellt). Der restliche Teil der DNA wurde durch Religation der *AccI*-Restriktionsschnittstellen zirkularisiert (II.8.5), was einen *AccI*-Rumpfklon von BCTV105pBluescript DNA ergab. Dieser wurde einer weiteren Restriktion (II.8.3.) mit *BamHI* unterzogen, was zur Linearisierung der DNA führte. In der folgenden Reaktion sollte mit *BamHI* verdaute BCTV105 DNA mit der linearisierten DNA des Rumpfkloves ligiert werden (II.8.5.), was den gewünschten Bitmer-Klon ergeben hätte.

Innerhalb dieser Arbeit gelang diese Bitmer-Klonierung nicht. Da sich Bitmer-Klone, die den Replikationsursprung doppelt enthalten, als besonders infektiös herausstellten (persönliche Mitteilung, Dr. Thomas Frischmuth), wurde weiter versucht, solche Bitmer-Klone zu erstellen. Dazu wurde BCTV105pBluescript DNA jeweils einzeln mit den Enzymen *EcoRI* und *ApaI* verdaut und - wie oben für *AccI* beschrieben - weiterbehandelt. Die entsprechenden Rumpfkclone konnten generiert werden, die anschließende Ligation mit gesamt-genomischer, viraler BCTV105 DNA erbrachte jedoch in keinem Fall das gewünschte Ergebnis. Deshalb wurden im Anschluß auch Bitmer-Klonierungen vorgenommen, bei denen der virale Replikationsursprung nur einmal im Konstrukt vorhanden wäre. Eine Restriktion mit *PstI* ergab zwar wieder den Rumpfklon, doch auch mit diesem Ansatz scheiterte das weitere Vorgehen.

Da die Bitmer-Klonierung von BCTV105 nicht gelang, konnten auch keine Infektionstests mit dieser DNA durchgeführt werden. Somit steht der Beweis für die Infektiösität dieser Virusvariante aus. Von der Nucleotid- und Aminosäuresequenz her sollte man jedoch annehmen, dass BCTV105 infektiös ist, da sich zu den bisher bekannten BCTV-Stämmen hohe Homologien auf DNA-Ebene ergaben und da alle 7 Offenen Leserahmen, die für BCTV beschrieben sind, in der bekannten Größe vorhanden sind.

## 4.2 BCTV59

Die Probe 59 stammt aus Grand View, Idaho (Abb.16). Das Isolat wurde über die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle in pBluescript KS+ kloniert (II.4.). Der Klon ist vollständig sequenziert. Er enthält ein DI-DNA Isolat der Probe 59. Der Homologievergleich von BCTV59 mit BCTV105 ergab eine Homologie von 100%. BCTV59 beinhaltet ebenfalls die Region, die eine höhere Homologie zum Kalifornischen Stamm besitzt, was die Ergebnisse von BCTV105 belegt. Abb.16 zeigt die Genomorganisation der DI-DNA BCTV59.

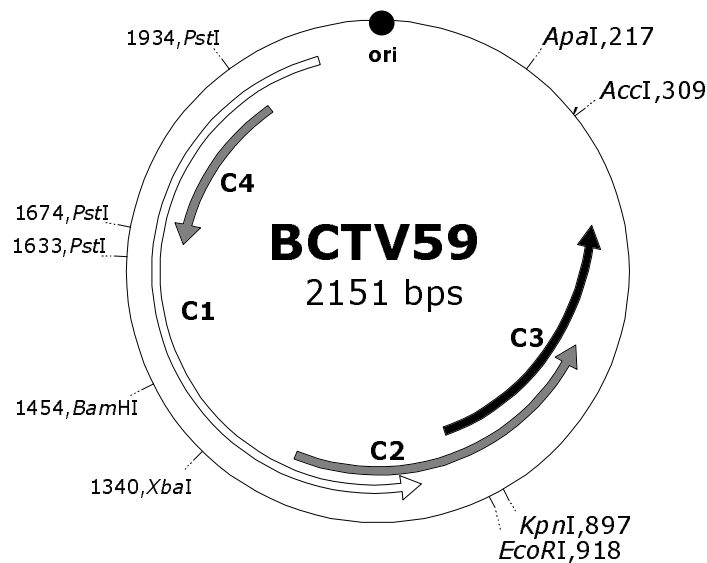


Abb.16: Genomorganisation von BCTV59

ori: Replikationsursprung, Pfeile: Offene Leserahmen, Positionen der Restriktionsschnittstellen in Klammern.

Dieser Klon bestätigt die Sequenz von BCTV105 u.a. in dem Bereich, in dem die höhere Identität zum Kalifornischen Stamm BCTV-Cal besteht (s. Anhang V.5.3.2). Aufgrund der 100% Homologie dieser DI-DNA zu BCTV105, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei Isolat 59 um das gleiche handelt, wie bei Isolat 105.

### 4.3. Weitere Isolate aus den USA

Dank der freundlichen Unterstützung von Herrn Drake Stenger wurden mir weitere DNAs gesamt-genomischer Klone aus den USA zur Verfügung gestellt. Diese Klone wurden in seiner Arbeitsgruppe anhand ihres Restriktionsmusters grob den bisher bekannten BCTV-Stämmen zugeordnet (Stenger und McMahon, 1997).

Zur teilweisen Sequenzierung wurden Primer abgeleitet, die den C1 Leserahmen umfassen (II.7.ff), die Proben wurden zusätzlich mit den Primern BCTV105 A BCTVid-2 ansequenziert.

Untersucht wurden die Proben pID-1-149, pWA-95-3-106 und pML-95-1-64 (Tab.18).

Tab.18: Untersuchte Proben der Arbeitsgruppe Stenger, Ergebnisse nach Restriktionsanalyse [Stenger und McMahon, 1997]

Probe	Bundesstaat	Ort	Stamm-Identifikation
pID-1-149	Idaho	Grand View	CFH
pWA-95-3-106	Washington	Mapton	Worland
pML-95-1-64	Washington	Moses Lake	Worland

Die Proben wurden mit verschiedenen Primern ansequenziert, um weitere Aussagen über ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen BCTV-Stämmen machen zu können (Tab.19). Die Sequenzdaten sind im Anhang aufgeführt (V.5.3.3).

Tab.19: Ergebnisse der Sequenzierungen anderer USA-Isolate

Probe	Primer	maximale Sequenz-homologie zu:	im Nukleotidbereich:
pID-1-149	BCTVid-C-1	CFH (99,3%)	1695-1834
	BCTVid-2	CFH (84,2%)	1181-1697
	BCTV105A	CFH (97,8%)	369-1155
pWA-95-3-106	BCTV105A	Wor (97,7%)	358-1123
pML-95-1-64	BCTV105A	Wor (97,8%)	367-1132

Die bisherigen Ergebnisse der Sequenzierungen ergaben, dass die Klassifikation der Klone durch die Restriktionsanalyse der Arbeitsgruppe Stenger eine verlässliche Einordnung der Proben darstellte, da ich die gleiche Charakterisierung erhielt.

## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse

### 5.1. Infektionsanalysen der F<sub>1</sub>-Generationen

Es gelang im Laufe der Arbeit die Identifikation mehrerer Zuckerrübenlinien, die eine Resistenzwirkung gegen BCTV Infektion durch die Replikation von DI-DNA mobilisiert vom Transgen zeigten. Es handelt sich hierbei um folgende Linien:

- Linie 71034 T (Selbstungslinie aus VC3-8)
- Linie 76032 J (Kreuzung aus C68\*C89 mit VC3-6)
- Linie 84111 K (Kreuzung aus S1-(D106) mit VC3-6)
- Linie 84107 K (Kreuzung aus S1-(D106) mit VC3-6)
- Linie 84118 T (Kreuzung aus S1-(R12) mit VC3-8)
- Linie 84124 T (Kreuzung aus S1-(R13) mit VC3-8).

Diese sechs Linien wurden nach der statistischen Auswertung der Daten mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt (Tab.20).

Tab.20: Zusammenfassung der Zuckerrübenlinien mit vermuteter Resistenzwirkung gegen eine BCTV Infektion

Linie	infizierte Pflanzen	Transgen	replikative DI-DNA	Symptome		
				ohne	mild	stark
71034 T	44	pos. 34	pos. 32	9	10	13
			neg. 2		1	1
		neg. 10			10	
76032 J	36	pos. 21	pos. 2	1		1
			neg. 19		13	6
		neg. 13		5	8	
84111 K	115	pos. 49	pos. 38	20	16	2
			neg. 11	7	4	
		neg. 66	9	44	13	
84107 K	59	pos. 36	pos. 24	8	14	2
			neg. 12	1	10	1
		neg. 23	4	18	1	
84118 T	35	pos. 22	pos. 18		9	9
			neg. 4		1	3
		neg. 13		2	11	
84124 T	76	pos. 65	pos. 51	38	10	3
			neg. 14	5	6	3
		neg. 11	5	4	2	

Zusammenfassende Beurteilung:

Linie **76032 J** ist nicht zur Weiterzüchtung geeignet. Von 58% transgenen Pflanzen replizierten nur 10% DI-DNA. Eine Linie, deren Erfolg von der Mobilisierung der transgenen DI-DNA abhängt sollte einen wesentlich höheren Anteil an DI-DNA Replikation aufweisen. Da selbst bei diesen DI-DNA replizierenden, transgenen Pflanzen starke Symptome zu beobachten waren, ist diese Linie völlig indiskutabel.

Linie **84107 K** ist ebenfalls kaum geeignet zur weiteren Züchtung. Bei ihr wurde gegenüber den DI-DNA negativen Gruppen nur eine geringe Verschiebung von Pflanzen mit milden Symptomen zu symptomlosen Pflanzen innerhalb der DI-DNA replizierenden Gruppe beobachtet.

Linie **71034 T** zeigt zwar die höchste Rate der transgenen Pflanzen, die nach Infektion mit BCTV DI-DNA replizieren, doch ist die Anzahl an Pflanzen mit starken Symptomen noch sehr hoch im Vergleich zu den Linien 84111 K und 84124 T.

Linie **84118 T** rangiert mit 63% transgenen Pflanzen im Mittelfeld der untersuchten Linien. 82% dieser Pflanzen replizierten transgene DI-DNA. Nur die geringfügige Verschiebung des Symptombildes lässt diese Linie als prinzipiell geeignet darstellen: während an nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen vorwiegend starke Symptome auftraten, entwickelten die transgenen, DI-DNA replizierenden Pflanzen jeweils zur Hälfte milde bzw. starke Symptome. Dieser Unterschied ist jedoch zur Weiterzucht nicht ausreichend, zumal keine symptomlosen Pflanzen auftraten.

Die Analyse der Linie **84111 K** zeigt, dass diese zwar die geringste Rate transgener Pflanzen aufweist (43%), allerdings replizierten 78% dieser Pflanzen DI-DNA und entwickelten vorwiegend keine oder milde Symptome. Diese Linie scheint eine gewisse Toleranz gegenüber BCTV Infektionen zu besitzen, da in der nicht-transgenen Gruppe Pflanzen mit milden Symptomen überwogen.

Linie **84124 T** stellte sich während der Untersuchungen als die Zuckerrübenlinie mit der besten Resistenz gegenüber BCTV heraus. Die transgenen DI-DNA replizierenden Pflanzen waren zum Großteil völlig symptomfrei, bzw. zeigten sehr milde Symptome. Die Symptomstärke dieser Linie ist es auch, die sie so hervorragend macht: infizierte Pflanzen zeigten zwar 3 Wochen nach Inokulation die typischen Symptome einer BCTV Infektion, erholten sich aber innerhalb der nächsten Wochen. Pflanzen mit milden Symptomen wuchsen zur normalen Größe der

nicht-inokulierten Kontrollpflanze heran und unterschieden sich nur noch durch ein mildes Blattkräuseln von den symptomfreien Pflanzen. Pflanzen mit starken Symptomen zeichneten sich durch eine deutliche Wachsminderung und stärkeres Blattrollen aus. Sie wären allerdings im Vergleich mit Pflanzen anderer Linien dort als „mild“ eingestuft worden.

Die untersuchten Linien 71034 T, 84111 K und 84124 T lassen einen Resistenzeffekt durch Replikation transgener DI-DNA erkennen. Am eindeutigsten ist dieser bei Linie 84124 T ausgeprägt. Es ist also gelungen, die Ergebnisse, die an *Nicotiana benthamiana* gewonnen wurden, an Zuckerrübe zu reproduzieren.

## 5.2. Infektionsanalyse der Doppelhaploiden

Die Doppelhaploiden stammten aus der Gewebekultur und wurden über Wachstum auf Kanamycin-haltigem Medium auf Transgenität selektiert. Somit sollten die resultierenden Pflanzen zu 100% transgen sein.

Von diesen Pflanzen versprach man sich, dass der Einfluss der transgenen DI-DNA auf die Symptomentwicklung und -stärke noch eindeutiger zum Tragen kommen würde.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten aufgrund der DNA-Qualität der Proben gelang der Nachweis, dass tatsächlich alle Pflanzen der getesteten Linien transgen waren. Die Fähigkeit, DI-DNA nach BCTV Infektion zu replizieren, war allerdings sehr gering (zwischen 0 - 40% Replikationsrate). Somit konnten anhand dieser Experimente keine verwertbaren Aussagen über die Wirkung der DI-DNA Replikation getroffen werden, da in den meisten Fällen zu wenig DI-DNA replizierende Pflanzen zur Verfügung standen.

Angesicht der Tatsache, dass sich von den 21 untersuchten Zuckerrübenlinien der F<sub>1</sub>-Generation nur sechs mit vermuteter DI-DNA vermittelter Resistenz gegen BCTV herausstellten, sollten die Analysen der weiteren Doppelhaploiden unbedingt abgewartet werden, bevor ein endgültiges Urteil gefällt wird.



### 5.3. Blattscheibentests

Es standen zwei Zuckerrüben-Anbausorten zur Verfügung, an deren Beispiel ein Schnelltest zur Resistenzbestimmung etabliert werden sollte. Zunächst mussten die Anzuchtmedien optimiert werden. Als geeignet zur längerfristigen Kultivierung beider Sorten stellte sich das MS1-Medium heraus. Blattscheiben waren Blattstielstücken bei beiden Sorten überlegen.

Die zwei untersuchten Sorten unterschieden sich im Auftreten viraler DNA nach Infektion: die sensitive Sorte 4F0007 zeigte bereits einen Tag nach Infektion virale DNA im Southern Blot, während bei der resistenten Sorte 3H9727 erst drei Tage nach Infektion BCTV DNA nachweisbar war.

Diese Ergebnisse zeigten auch, dass die Replikation von BCTV in keiner der Sorten völlig unterdrückt wurde. Die Aufklärung des Resistenzmechanismus der resistenten Sorte sollte anhand von Protoplastenexperimenten erfolgen. Die Protoplastierung erwies sich jedoch als schwierig, da die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren. Somit konnte diese Frage nicht beantwortet werden.

Auch die Idee eines Schnelltests zur Resistenzbestimmung wurde verworfen, da sich zeigte, dass jede getestete Zuckerrübenlinie einen anderen Zeitverlauf der Virusvermehrung aufwies.

Der Blattscheibentest diente in Kombination mit der Partikelbeschusstechnik im Verlauf dieser Arbeit somit nur noch als Mittel, die Replikationsfähigkeit von Virusisolaten in sensitiven Pflanzen zu testen.

### 5.4. Bestimmung von BCTV-Varianten in Idaho, USA

Es gelang zwei Virus-Isolate aus Feldproben zu klonieren. Die virale DNA wurde über PCR amplifiziert und in den Vektor pBluescript KS+ integriert. Die zwei Isolate (BCTV105 und BCTV59) weisen 100% Identität ihrer Nukleinsäuren auf. BCTV105 konnte als gesamt-genomischer Virusklon erhalten werden, während von BCTV59 nur eine 2,1 kb große DI-DNA erhalten wurde.

Das Auftreten von DNA-Sequenzen, die eine hohe Homologie zum Kalifornischen Stamm (BCTV-Cal) aufweisen ist ungewöhnlich, da bisher keine solchen Sequenzen aus Feldisolaten in diesem Anbauggebiet zu finden waren [Stenger und McMahon, 1997]. Die Infektiösität des Isolates BCTV105 konnte nicht bewiesen werden, da sich die monomere DNA im

Partikelbeschusseexperiment als nicht replikationsfähig herausstellte und die Bitmer-Klonierung von BCTV105 nicht gelang.

Die Teilsequenzierungen der Proben der Arbeitsgruppe Stenger zeigten, dass die Charakterisierung anhand der Restriktionsmuster durch die Gruppe eine verlässliche Einordnung der verschiedenen BCTV Proben erlaubte. Nach Auswertung der Sequenzdaten wurde die gleiche Zuordnung zu den verschiedenen BCTV-Stämmen erhalten (III.4.3.).

## **IV. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Themen bearbeitet werden:

- Untersuchung DI-DNA vermittelter Resistenz gegen BCTV in Zuckerrüben
- Etablierung eines Schnelltests zur Bestimmung resistenter Zuckerrüben
- Untersuchung der Variabilität der BCTV Population in Idaho, USA.

### **1. Untersuchung der DI-DNA vermittelten Resistenz**

Zur Untersuchung, ob die in *N. benthamiana* beschriebene Resistenzwirkung gegen eine BCTV Infektion [Frischmuth und Stanley, 1994] auch in Zuckerrübe erreicht werden kann, standen transgene F<sub>1</sub>-Linien zu Infektionstests zur Verfügung (II.2.1.). Die erreichte Resistenz in *N. benthamiana* äußerte sich in milderem Symptomen der transgenen Pflanzen gegenüber den nicht-transgenen Kontrollen. Der Virus DNA Gehalt war auf 10 - 30% der Kontrollpflanzen erniedrigt, während die transgene, replikative DI-DNA ca. 30% der Gesamt-DNA Menge ausmachte. Einen Auszug der Ergebnisse zeigt Tabelle 21.

Tab.21: Ergebnisse der Infektionstest mit BCTV in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen [Frischmuth und Stanley, 1994]

Linie	Infektionsrate	Symptome		
		mild	mittel	stark
Transgen 1	88%	17	11	2
Transgen 2	100%	16	14	1
Transgen 3	100%			30
Kontrolle	100%			20

Der geringe Anteil transgener Pflanzen der Linien 1 und 2 mit starken Symptomen mit 7% bzw. 3% zeigte deutlich, dass in diesen Pflanzen ein Effekt durch die Mobilisierung der transgenen DI-DNA zu erreichen war. Die überwiegende Zahl der Pflanzen dieser Linien zeigten sehr milde Symptome. Im Gegensatz dazu zeigten alle Pflanzen der nicht-transgenen Kontrolllinie und der transgenen Linie 3 starke Symptome. Linie 3 war nicht in der Lage, das Transgen aus dem Pflanzengenom zu mobilisieren, da dieses nur einen Replikationsursprung aufwies. Diese Linie war der Beweis dafür, dass nicht allein die Anwesenheit des Transgens im Pflanzengenom die Verbesserung der Symptome erbrachte, sondern dass

die Replikation dieses Transgens auf Kosten des Elternvirus den entscheidenden Schritt dieser Resistenz darstellte. Die nicht-transgene Kontrolle diente zur Überprüfung der Inokulationsmethode.

Solche eindeutigen Ergebnisse konnten während der Zuckerrüben-Infektionstests nicht gewonnen werden. Von 21 untersuchten Linien wurden nur 6 gefunden, die nach der statistischen Analyse eine Korrelation von replikativer DI-DNA und Resistenzwirkung aufzeigten (Tab.8).

Es wurden folgende Unterschiede zwischen *N. benthamiana* (Selbstungslinien der homozygoten F<sub>2</sub>-Generation) und Zuckerrübe beobachtet:

- die Zuckerrüben der F<sub>1</sub>-Generationen waren nicht alle transgen. In den **Kreuzungslinien** (transgene F<sub>0</sub>-Pflanze mit Hochleistungssorte) hätte man **mindestens 50%** transgene Pflanzen erwartet, wenn die F<sub>0</sub>-Pflanze nur eine Kopie des Transgens enthalten hätte. Für die **Selbstungslinien** (transgene F<sub>0</sub>-Pflanze, geselbstet) hätte man im gleichen Fall **mindestens 75%** transgene Pflanzen vorausgesetzt. Die erhaltenen Daten zeigen jedoch, dass das Transgen nicht so stabil im Pflanzengenom integriert wurde, da in vielen Linien Werte unter diesen Richtwerten auftraten (Tab.22)

Tab.22: Analyse der Transgenität der einzelnen Linien

<b>Kreuzungs- linien</b>	<b>Transgen in %</b>	<b>Selbstungs- linien</b>	<b>Transgen in %</b>
66061 J	35	61061 T	62
76031 J	71	71031 T	14
76032 J	58	71032 T	28
76033 J	23	71033 T	19
76034 J	70	71034 T	68
76036 J	100	71036 K	0
76037 J	63	71037 K	6
76038 J	27	71038 K	11
84107 K	61		
84111 K	43		
84116 T	69		
84118 T	63		
84124 T	86		

Die Linien, die nach statistischer Analyse DI-DNA Resistenz zeigten, wurden in der Tabelle grau unterlegt.

- außerdem konnte beobachtet werden, dass längst nicht alle transgenen Zuckerrüben nach der BCTV-Infektion das Transgen mobilisieren

konnten. In den homozygoten *N. benthamiana* Pflanzen wurde dies nicht beobachtet. In Tabelle 23 sind die Ergebnisse an Zuckerrübe dargestellt.

Tab.23: Analyse der Mobilisierungsfähigkeit des Transgens

<b>Kreuzungs- linien</b>	<b>repl. DI-DNA mobilisiert %</b>	<b>Selbstungs- linien</b>	<b>repl. DI-DNA mobilisiert %</b>
66061 J	58	61061 T	20
76031 J	0	71031 T	50
76032 J	10	71032 T	100
76033 J	0	71033 T	29
76034 J	30	71034 T	94
76036 J	0	71036 K	0
76037 J	20	71037 K	0
76038 J	11	71038 K	0
84107 K	67		
84111 K	78		
84116 T	86		
84118 T	82		
84124 T	78		

Die Linien, die nach statistischer Analyse DI-DNA Resistenz zeigten, wurden in der Tabelle grau unterlegt.

Aus den Tabellen 22 und 23 lässt sich kein Zusammenhang zwischen Transgenität und Mobilisierung von transgener DI-DNA erkennen. Die Linie mit der höchsten Transgenität (76036 J) weist z.B. keine Mobilisierung von DI-DNA auf. Linie 71032 T, die nur zu 28% transgene Pflanzen aufweist, kann das Transgen hingegen in 100% der Fälle mobilisieren.

- die Milderung der Symptome, die in *N. benthamiana* gefunden wurde, konnte in Zuckerrübe nur in einer Linie deutlich wiederholt werden. Es handelte sich dabei um die Linie 84124 T, die aus der Kreuzung von S1-(R13) mit VC-3-8 hervorging (Tab.24).

Tab.24: Ergebnisse der Linie 84124 T

Transgen	replikative DI-DNA	Symptome		
		ohne	mild	stark
pos. 65	pos. 51	38	10	3
	neg. 14	5	6	3
neg. 11		5	4	2

Der Unterschied dieser Linie zu den Ergebnissen in *N. benthamiana* liegt darin, dass die „Negativpflanzen“ (transgen, nicht-DI-DNA replizierend, bzw. nicht-transgen) auch eine Aufspaltung der Symptome zeigten, während die *N. benthamiana* Negativpflanzen alle nur starke Symptome entwickelten (siehe Tab. 21).

Dennoch kann in Linie 84124 T ein Effekt durch Replikation der transgenen DI-DNA erkannt werden. Die Auswertung mittels Chi-Quadrat Test ergab einen  $\chi^2$ -Wert von 18,19 (Berechnung siehe II.11), was eine signifikante Abweichung der transgenen, DI-DNA replizierenden Pflanzen von den Kontrollpflanzen bedeutete ( $\chi^2$ -Wert<sub>(Tab.)</sub> = 5,99). Die Tatsache, dass nur an Pflanzen dieser Linie ein „Erholungseffekt (recovery)“ zu beobachten war (s. Ergebnisteil, S.77ff.), stellt diese Linie als außergewöhnlich heraus. Solch ein „recovery“ konnte auch in *N. benthamiana* gefunden werden.

Dass die Negativpflanzen ebenfalls eine Symptomaufspaltung zeigten, weist darauf hin, dass in dieser Linie noch zusätzlich ein Heterosis-Effekt aufgetreten war. Als Heterosis-Effekt bezeichnet man das Phänomen, dass mit der Kreuzung verschiedener Pflanzen eine Steigerung der qualitativen und quantitativen Leistungsfähigkeit einhergeht. Für Linie 84124 T bedeutet dies, dass durch die Kreuzung der Ausgangslinien eine gewisse genetische Disposition übertragen wurde, die es auch den nicht DI-DNA replizierenden Pflanzen ermöglicht, mit einer BCTV Infektion besser fertigzuwerden. Pflanzen, die durch Kreuzung mit der F<sub>0</sub>-Linie VC3-8 erzeugt wurden, wiesen im allgemeinen eine Symptomaufspaltung der Negativpflanzen auf (Tab. 7 und 8). Ob zusätzlich ein Effekt in der

Ausgangslinie S1-(R13) alleine zu beobachten ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, da dieses eine der Hochleistungssorten der Fa. Planta ist und mir von diesen Sorten keinerlei Saatgut zur Verfügung stand. Die gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es gelungen ist, in Linie 84124 T DI-DNA vermittelte Resistenz gegen BCTV zu etablieren. Die hohe Qualität dieser Linie wird jedoch noch zusätzlich durch einen Heterosis-Effekt verstärkt.

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Begriff der Resistenz muss allerdings näher diskutiert werden [Huth, 1999]. Resistenz bezeichnet die Nichtanfälligkeit einer Pflanze gegen ein bestimmtes Pathogen, während nicht resistente Pflanzen in hohem Maß anfällig sind. Das unterschiedliche Maß an Resistenz wird durch folgende Begriffe eingeteilt:

- Immunität (Synonyme: Nicht-Wirt-Resistenz, extreme Resistenz, absolute Resistenz).
- Partielle Resistenz (Synonym: Translokationsresistenz)
- Toleranz (Synonym: relative Resistenz)

Das höchste Mass an Resistenz besteht bei der Immunität der Pflanze. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass das Pathogen nicht in der Lage ist, diese Pflanze zu infizieren, die Pflanze stellt also keinen Wirt dar. Im Falle der Immunität kann das Pathogen zu keinem Zeitpunkt in der Pflanze nachgewiesen werden.

Die Partielle Resistenz tritt bei Pflanzen auf, die vom Pathogen infiziert werden können. Das Pathogen bleibt allerdings auf die primär infizierten Gewebe beschränkt (z.B. durch hypersensitive Reaktion der Pflanze), kann sich also nicht systemisch in der Pflanze ausbreiten.

Die Toleranz besteht in solchen Pflanzen, die vom Pathogen infiziert werden, welches sich systemisch in der Pflanze ausbreiten kann und sich in allen Teilen der Pflanze repliziert. Die Stärke der Toleranz hängt von der Stärke der pflanzlichen Reaktion auf die Infektion ab.

In den infizierten Zuckerrüben konnte in allen Pflanzen nach erfolgter Infektion BCTV mittels Southern Blot (II.6.2.) nachgewiesen werden. Auch die Pflanzen der Linie 84124 T zeigten selbst nach Eintritt in das Stadium der Erholung von der Infektion immer noch Virus-DNA, was Frischmuth und Stanley 1994 auch in *N. benthamiana* beobachteten. Somit ist die Verwendung des Begriffs „Resistenz“ irreführend. Aufgrund der Termini,

die von Huth 1999 vorgeschlagen wurden, sollte man hier von DI-DNA vermittelter Toleranz gegen BCTV Infektionen sprechen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es leider nicht gelungen, aus der Analyse der doppelhaploiden Pflanzen weitere Ergebnisse zu gewinnen, die die Wirkung der replikativen DI-DNA bekräftigten (Tab.10). Aus der Analyse dieser Pflanzen, die zu 100% transgen waren, erhoffte man sich eine eindeutigere Aussage, als sie bei den F<sub>1</sub>-Linien erhalten werden konnte. Leider konnten die Pflanzen der sieben untersuchten Linien nur zu einem geringen Teil die transgene DI-DNA aus dem Pflanzengenom mobilisieren und amplifizieren. Manche Linien waren dazu überhaupt nicht in der Lage. Auffallend verhielten sich die Pflanzen der Linie 704 OV5. Nur rund die Hälfte der Pflanzen ließen sich infizieren. Die geringe Infizierbarkeit kann ein Indiz dafür sein, dass diese Pflanzen über einen gewissen Schutz vor BCTV Infektionen verfügen. Er liegt jedoch nicht im Bereich der DI-DNA vermittelten Resistenz, da keine der Pflanzen das Transgen replizierte. Bei dieser Linie scheint durch die Kreuzung ein Heterosis-Effekt aufgetreten zu sein.

Da die wenigen Pflanzen für eine aussagekräftige Analyse nicht ausreichen, müssen von den doppelhaploiden Pflanzen noch weitere Linien untersucht werden.

## **2. Etablierung eines Schnelltests zur Identifikation von resistenten Zuckerrüben**

Angeichts des Aufwands, der nötig war, um im Rahmen dieser Dissertation Zuckerrübenlinien zu finden, die resistent gegen BCTV waren (von über 1500 Pflanzen waren nur 51 Pflanzen gegen BCTV ausreichend geschützt), wäre es wünschenswert, einen Test anzuwenden, der einem viel Arbeit abnehmen könnte.

Dazu sollten aus zu untersuchenden Pflanzen Blattscheiben gestochen werden, diese mittels Partikelbeschuss mit BCTV infiziert und das zeitliche und mengenmäßige Auftreten viraler DNA beobachtet werden.

Für die Anbausorten 3H 9727 (resistent) und 4F 7004 (sensitiv) konnte das Testsystem etabliert werden (Ergebnisteil S.87ff), da in den sensitiven



Blattscheiben virale replikative DNA schneller auftrat und zu einem höheren Gehalt akkumulierte, als in den resistenten Blattscheiben.

Die Anwendung an ausgewählten transgenen Linien (71036 K, 71037 K und 71038 K) zeigte aber schnell, dass diese Ergebnisse nicht reproduzierbar waren (Tab.13). Der Gehalt an viraler DNA in den Blattscheiben der einzelnen Linien variierte stark, was verhinderte, dass ein Durchschnittswert gebildet werden konnte. Ohne diesen konnte jedoch auch keine verlässliche Wertung der Signalstärken erreicht werden. Die einzige Probe, in der DI-DNA Replikation nachgewiesen werden konnte, wies ein so starkes Hybridisierungssignal wie sensitive Kontrollpflanzen auf. Somit musste auf die Etablierung dieses Tests verzichtet werden.

Dieser Test wäre vor allem deshalb von Interesse gewesen, da die Gesamtpflanzen nicht infiziert worden wären. Hätte sich eine Pflanze als resistent herausgestellt, hätte man von ihr Saatgut gewinnen können und sie für weitere Züchtungen eingesetzt. Dies ist mit den BCTV-infizierten Pflanzen der untersuchten F<sub>1</sub>-Linien nicht möglich, da infizierte Zuckerrüben keine oder nur verkümmerte Blüten ausbilden können (pers. Mitteilung, Dr. Thomas Frischmuth).

### **3. Untersuchung der Variabilität der BCTV Population in Idaho**

Der US-Bundesstaat Idaho ist der zweitgrößte Zuckerrübenproduzent in den Vereinigten Staaten. BCTV Infektionen wüteten in den 50er Jahren im Anbaugebiet, sodass die Ernteaufträge annähernd 100% betrugten. In den 60er und 70er Jahren begann man, den Überträgerorganismus *Circulifer tenellus* zu bekämpfen (pers. Mitteilung, Dr. Thomas Frischmuth). Diese Zikade flieht vor den strengen Wintern in Idaho in die südlichen Anreinerstaaten Nevada und Utah. Dort wurden in den Überwinterungsgebieten Insektizide gespritzt, was die Population der Zikade drastisch verringerte. Diese geringere Anzahl an Überträgern ließ die Infektionsrate in Idaho deutlich sinken. Mit dem Ende der Insektizidbehandlung in den 80er Jahren stiegen die Infektionsraten zunächst nicht, da BCTV resistente Zuckerrüben auf dem Markt waren, die während der Vorjahre erzeugt wurden. Diese Resistenz konnte jedoch in den letzten Jahren gebrochen werden.

Ziel dieser Untersuchungen war es, die BCTV-Population in Idaho näher zu untersuchen. Die resistenten Anbausorten wurden bisher gegen den Kalifornischen Stamm BCTV-Cal gezüchtet. Dieser Stamm wurde jedoch seit längerem nicht mehr aus Feldisolaten in Idaho isoliert [Stenger und McMahon, 1997; Stenger, 1995]. Der in Idaho zur Zeit vorherrschende Stamm ist BCTV-CFH, ein Virusstamm, der in vielen Pflanzen stärkere Symptome als BCTV-Cal verursachte [Stenger *et al.*, 1990]. Die Gruppe um Stenger charakterisierte in Idaho Feldisolate anhand ihrer Restriktionsmuster und ordnete diese den bisher bekannten Stämmen zu. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit, zwei Feldisolate zu charakterisieren. Isolate 105 und 59 zeigten beide die größte Homologie zu BCTV-CFH, besaßen jedoch beide einen Sequenzbereich, mit höherer Identität zu BCTV-Cal. Diese Isolate geben einen Hinweis darauf, dass in Idaho der Kalifornische Stamm vorgekommen sein musste. BCTV105 und BCTV59 sind wahrscheinlich durch Rekombination der Elternviren in einer doppelinfizierten Pflanze erzeugt worden (Tab.15 - 17). Beide Isolate würden in der Analyse der Stengergruppe über Restriktionskartierung als BCTV-CFH identifiziert werden - ohne die Sequenzanalyse wäre ihr BCTV-Cal Anteil nicht entdeckt worden.

Die genauere Analyse der Nukleotidsequenz der Offenen Leserahmen von BCTV105 (Tab.16) ergab, dass die Leserahmen des Komplementärstranges C1-C4 und V1 die höchste Homologie zum CFH-Stamm besitzen (98,5% - 99,5%), während die Virusstrang-Leserahmen V2 und V3 eine höhere Identität zu BCTV-Cal zeigen (99,5% - 99,6%). Zusätzlich weist auch die DNA-Sequenz der Intergen Region (Abb.14) des Isolats 105 eine beinahe 100%ige Identität zu BCTV-Cal auf. Die ersten ca. 600 Nukleotide von BCTV105 stammen somit wahrscheinlich von BCTV-Cal, während der Rest des Isolats von BCTV-CFH stammt.

Diese Vermutung ist nicht unbegründet, da die Rekombination von Pflanzenviren häufig beobachtet wird:

Vergleicht man z.B. die Sequenzen von Geminiviren miteinander, findet man Sequenzhomologien zwischen Curto- und Begomoviren in den ORFs des Rep Proteins, des TrAP Proteins und des REn Proteins. Zumindest das Rep Protein und der C4 Leserahmen der Curtoviren stammen von einem Begomovirus ab [Klute *et al.*, 1996]. Man vermutet deshalb, dass die Curtoviren durch Rekombination zwischen einem Mastrevirus und einem

Begomovirus entstanden sind [Stanley *et al.*, 1986; Howarth und Vandemark, 1989; Lazarowitz, 1992; Klute *et al.*, 1996; Briddon *et al.*, 1998]. Die Anteile Rep, C4 und eingeschränkt auch REn und TrAP stammen vermutlich von einem Begomovirus ab, die Genomteile des Hüllproteins und V2 von einem Mastrevirus. Wie in der Einleitung beschrieben (Tab.1) infizieren Mastreviren in der Regel nur Monokotyle. Es wurden jedoch auch Mastreviren beschrieben, die dikotyle Pflanzen infizierten [Morris *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1997]. Somit kann man sich durchaus vorstellen, dass Curtoviren durch Rekombination während einer Mischinfektion von Mastre- und Begomoviren in einer dikotylen Pflanze entstanden sind. Das Auftreten von Mischinfektionen ist ein für Geminiviren bekanntes Phänomen [Lazarowitz, 1991; Harrison *et al.*, 1997]. Durch intermolekulare Rekombination von ACMV und EACMV (East African Cassava Mosaik Virus) entstand z.B. das UgV (Uganda Virus, Zhou *et al.*, 1997].

Auch die Entstehung von DI-DNA kann durch ein Rekombinationsereignis erklärt werden. DI-DNAs enthalten nur Genomteile des Elternvirus - es ist daher wahrscheinlich, dass durch intramolekulare Rekombination des Elternvirus einige Genombereiche deletiert wurden. Das häufige Auftreten von Sequenzduplikationen an den Deletionsstellen erhärtet diese Vermutung [Frischmuth und Stanley, 1993].

Rekombinationsereignisse traten jedoch auch zwischen Virus und Pflanze auf - z.B. wurden im Genom von *N. tabacum* Anteile geminiviraler Sequenzen entdeckt [Kenton *et al.*, 1995; Bejarano *et al.*, 1996].

Das Isolat 105 könnte also durchaus durch intermolekulare Rekombination zwischen BCTV-Cal und BCTV-CFH in einer doppelinfizierten Zuckerrübe entstanden sein. Ein wichtiges Indiz dafür ist die Tatsache, dass der Genombereich vom Replikationsursprung bis zu Nukleotid 600 von BCTV-Cal zu stammen scheint. Die Intergene Region mit dem Replikationsursprung scheint die Rekombination von Geminiviren zu erleichtern, da dort während der Replikation durch den Einzelstrangbruch ein bevorzugter Angriffspunkt für Rekombinationen gebildet wird [Frischmuth und Stanley, 1998]. Da Geminiviren im pflanzlichen Zellkern replizieren, ist auch der Austausch von pflanzlichen Genomanteilen mit Geminiviren kein Problem.

Die Sequenzdaten, die von verschiedenen Proben der Stengergruppe erhalten werden konnten, stützen die Charakterisierung der Isolate anhand ihres Restriktionsmusters. Die Probe pID1-149 aus Idaho zeigt bisher die höchste Homologie zu BCTV-CFH, was in Einklang damit steht, dass dieser Virusstamm der vorherrschende in Idaho ist. Die zwei Proben aus Washington hingegen stellten sich nach der Teilsequenzierung als BCTV-Wor heraus.

Zusammenfassendes Urteil:

Die Intergenen Regionen der Idaho-Isolate 105 und 59 sind homolog zu BCTV-Cal. In dieser Region liegen die *cis*-aktiven Elemente zur Erkennung des viralen Replikationsursprungs. Somit besteht die Hoffnung, dass in transgenen Pflanzen, die eine BCTV-Cal DI-DNA vermittelte Resistenz aufweisen, die DI-DNA auch durch diese Isolate mobilisiert werden kann und diese Pflanzen vor Infektion geschützt sind.

Es besteht jedoch das Problem der Virusstamm Spezifität [Stenger, 1994; und Einleitung S.12f]. In den Versuchen von Stenger zeigte sich, dass nur BCTV-Cal in der Lage war, ein BCTV-Cal DI-DNA Konstrukt aus dem Pflanzengenom zu mobilisieren und amplifizieren. Die Stämme BCTV-CFH und BCTV-Wor waren dazu nicht in der Lage. Somit ist die Schutzwirkung durch transgene DI-DNA nur gegen das betreffende Elternvirus erreicht. Im Falle des Zuckerrübenanbaus in Idaho, wo BCTV-CFH der vorherrschende Stamm ist, sollten somit transgene Zuckerrüben produziert werden, die ein DI-DNA Konstrukt aus BCTV-CFH enthalten.

## V. Anhang

### 5.1. Plasmide und Konstrukte

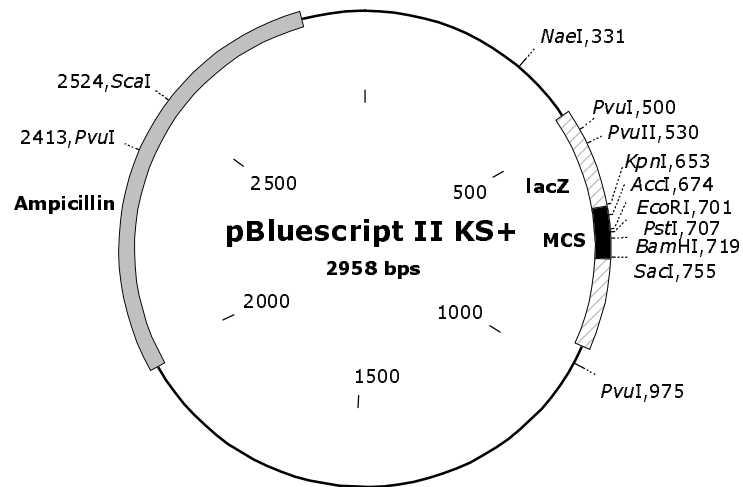


Abb.17: Plasmidkarte des Vektors pBluescript II KS+  
Auswahl einiger Restriktionsschnittstellen,  
MCS: multiple cloning site, lacZ:  $\beta$ -Galaktosidase Gen  
Ampicillin: Resistenzmarker

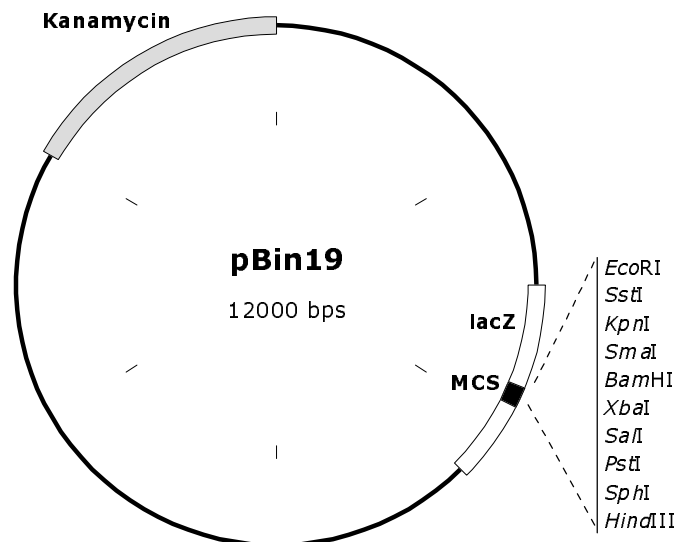


Abb.18: Plasmidkarte des Vektors pBin19  
Auswahl einiger Restriktionsschnittstellen,  
MCS: multiple cloning site, lacZ:  $\beta$ -Galaktosidase Gen  
Kanamycin: Resistenzmarker

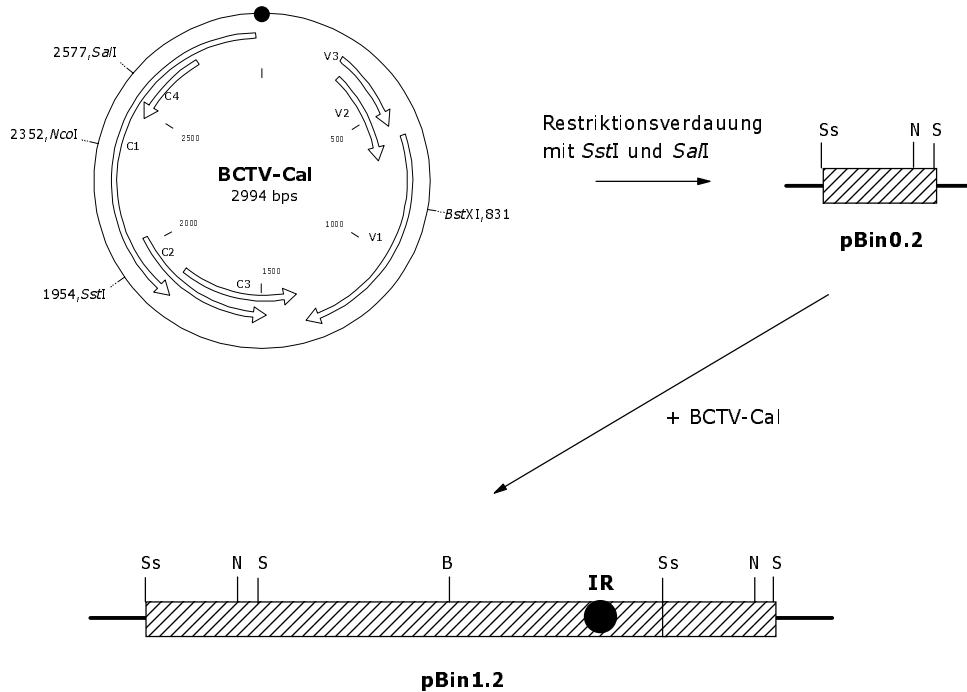


Abb.19: Schematische Darstellung des BCTV-Cal Bitmers im Vektor pBin19 zur Agroinfektion [nach Briddon *et al.*, 1989]

links: Genomorganisation von BCTV-Cal mit ausgewählten Restriktionschnittstellen. Durch Verdauung mit *SstI* und *SaII* entsteht ein 623 bp großes Bitstück, das in pBin19 kloniert wurde (pBin0.2). Die Klonierung des Gesamtgenoms von BCTV-Cal in pBin0.2 ergibt das Bitmer-Konstrukt pBin1.2. Dieses enthält die Intergene Region (IR) nur einmal.

Ss: *SstI*, S: *SaII*, B: *BstXI* und N: *NcoI*.

## 5.2. Ausführliche Pflanzendaten

Im folgenden sind die Analysen der Einzelpflanzen nach Pflanzennummer angeführt. In den Tabellen finden sich auch die nicht infizierten Kontrollpflanzen, die fett gedruckt wurden. Nicht infizierte Pflanzen tragen einen Stern\*.

Tab.25: Pflanzendaten Mai-November 1998

Linie	Transgen	repl. DI-DNA	Symptome		
			ohne	mild	stark
<b>61061 T</b>	<b>pos. 16</b>	<b>pos. 3</b>		20 21	4
		neg. 13	<b>25*</b>	1 12 13 16 18 22 23 24	3 10 14 15
	neg. 9			2 7 8 17 19	5 6 9 11
<b>66061 J</b>	<b>pos. 13</b>	<b>pos. 7</b>		4 7 14 22	9 18 32
		neg. 6	11	1 3 27	10 33
	neg. 22		<b>35*</b>	2 5 17 25 26 30 34	6 8 12 13 15 16 19 20 21 23 24 28 29 31
<b>71031 T</b>	<b>pos. 6</b>	<b>pos. 3</b>	<b>1*</b> 13		12
		neg. 3	9*		10 11
	neg. 25		15 17* 18* 27*	3 5 6 8 16 20 22 24 25 28	2 4 7 14 21 23 26 29 30 31
<b>71032 T</b>	<b>pos. 6</b>	<b>pos. 5</b>	9	8 11	7 10
		neg. 1	6		
	neg. 13		<b>1*</b> 13* 15*	14 17 18 19	2 3 4 5 12 16
<b>71033 T</b>	<b>pos. 9</b>	<b>pos. 2</b>			5 6
		neg. 7	23* 25*	22 33 37	24 36
	neg. 28		<b>1*</b> 2* 28* 30*	3 17 18 19 20 21 27 35	4 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 26 29 31 32 34
<b>71034 T</b>	<b>pos. 37</b>	<b>pos. 32</b>	11 17 25 31 33 35 36 39 40	6 20 24 27 32 34 38 41 47 51	2 3 5 9 10 19 21 22 26 42 44 46 49
		neg. 5	<b>1*</b> 8* 15*	7	23
	neg. 13		37* 43* 45*		4 12 13 14 16 18 29 30 48 50
<b>71036 K</b>	<b>pos. 0</b>	<b>pos. 0</b>			
		neg. 0			
	neg. 4		<b>1*</b>	2 3 4	
<b>71037 K</b>	<b>pos. 2</b>	<b>pos. 0</b>			
		neg. 2	2*		15
	neg. 17		<b>1*</b> 5* 7*	4 6 9 18	3 8 10 11 12 13 14 16 17 19
<b>71038 K</b>	<b>pos. 4</b>	<b>pos. 0</b>			
		neg. 4	<b>1*</b> 3* 15	2	
	neg. 16		7 12 16 18 19	4 5 6 9 11 13 14 17 20	8 10

Tab.26: Pflanzendaten August 1998

Linie	Transgen	repl. DI-DNA	Symptome		
			ohne	mild	stark
76031 J	pos. 5	pos. 0			
		neg. 5		6 7	2 3 5
	neg. 2		1*		4
76032 J	pos. 18	pos. 1	3		
		neg. 17		4 5 6 9 10 11 20 21 22 23 24 25	7 8 12 14 19
	neg. 8		1* 17 26	13 15 16	2 18
76033 J	pos. 4	pos. 0			
		neg. 4		2 27 28	3
	neg. 25		1* 12 18 24 29	5 6 7 9 10 11 13 14 15 19 20 23 25 26	4 8 16 17 21 22
76034 J	pos. 14	pos. 0			
		neg. 14	8 9 14	4 5 10 13 19	2 3 12 15 16 18
	neg. 5		1* 7 17	11	6
76036 J	pos. 1	pos. 0			
		neg. 1			2
	neg. 1		1*		
76037 J	pos. 2	pos. 0			
		neg. 2		1*	3
	neg. 1				2
76038 J	pos. 9	pos. 0			
		neg. 9	2 4 12 14	7 8	5 6 15
	neg. 6		1* 9		3 10 11 13



Tab.27: Pflanzendaten Dezember 1998

Linie	Transgen	repl. DI-DNA	Symptome		
			ohne	mild	stark
76031 J	pos. 1	pos. 0			
		neg. 1	1*		
	neg. 1				2
76032 J	pos. 4	pos. 1			9
		neg. 3	1*	3	5
	neg. 8			8 10	2 4 6 7 11 12
76033 J	pos. 9	pos. 0			
		neg. 9	1* 2 8	4 6 7 10 14 15	
	neg. 7			9 11	3 5 12 13 16
76034 J	pos. 23	pos. 10	6	14 28	3 5 10 17 26 27 29
		neg. 13	1* 12 16 25		4 9 11 13 15 20 23 24 30
	neg. 7				2 7 8 18 19 21 22
76036 J	pos. 2	pos. 0			
		neg. 2	1*		2
	neg. 0				
76037 J	pos. 15	pos. 3			4 7 17
		neg. 12	1* 11	6 19	3 8 13 15 16 18 21 22
	neg. 7				2 5 9 10 12 14 20
76038 J	pos. 7	pos. 1		12	
		neg. 6	1* 9 14	6	16 19
	neg. 13			2 8 10 11 13	3 4 5 7 15 17 18 20

Tab.28: Pflanzendaten Mai 1999

Linie	Transgen	repl. DI-DNA	Symptome		
			ohne	mild	stark
<b>84111 K</b>	<b>pos. 49</b>	<b>pos. 38</b>	9 15 32 39 44 55 83 103 107	12 13 14 16 28 29 30 33 34 36 38 40 42 46 52 53 56 64 68 77 80 90 92 98 100 101 104 111	3
		neg. 11	43 89	5 18 21 22 27 50 74 116	25
	neg. 67		1* 48	8 10 11 17 19 23 26 31 35 37 41 45 47 49 51 54 58 59 60 63 65 66 67 69 70 71 72 73 75 76 82 84 86 87 88 93 95 99 105 106 108 109 110 112 113 114 115	2 4 6 7 20 24 57 61 62 78 79 81 85 91 94 96 97 102
<b>84107 K</b>	<b>pos. 36</b>	<b>pos. 25</b>	12 13 26 50 58 59	9 19 20 22 25 27 28 29 31 38 47 54	4 6 7 8 21 40 44
		neg. 11	1*	3 24 32 33 39 53	5 14 17 18
	neg. 24		43 56	2 15 16 23 34 35 36 37 45 48 49 57 60	10 11 30 41 42 46 51 52 55
<b>84116 T</b>	<b>pos. 29</b>	<b>pos. 25</b>	17 21 38 40 42	2 3 4 9 10 14 15 16 18 19 29 30 31 36 43	6 7 25 28 35
		neg. 4		11 12 13 39	
	neg. 14		1* 37	5 8 20 22 41	23 24 26 27 32 33 34
<b>84118 T</b>	<b>pos. 23</b>	<b>pos. 18</b>	9 18	4 5 7 8 10 11 12 14 15 16 17 30 33 36	6 20
		neg. 5	1*	19 26	3 32
	neg. 13			21 22 24 25 29 34	2 13 23 27 28 31 35
<b>84124 T</b>	<b>pos. 66</b>	<b>pos. 51</b>	2 3 12 14 16 18 19 22 23 24 26 28 30 31 39 45 50 52 55 58 60 66 67 68 69 70 73 74	4 5 6 8 9 10 11 25 27 29 33 34 36 37 38 40 42 44 47 51 59 71 72	
		neg. 15	1*	7 21 32 46 53 54 57 64 65 75	13 43 62 63
	neg. 11		15 49	17 20 41 56 76 77	35 48 61

Tab.29: Pflanzendaten der doppelhaploiden Pflanzen

Linie	Transgen	repl. DI-DNA	Symptome		
			ohne	mild	stark
207 OV1	pos. 28	pos. 1		7	
		neg. 27	1* 8 9 11 16 18	2 3 4 5 6 12 15 21 22 23 25	10 13 14 17 19 20 24 26 27 28
218 OV4	pos. 28	pos. 4	1* 4 26	2 5	
		neg. 24	9 10 17 19 23 24 25 27	3 6 8 12 13 14 15 16 20 22 28	7 11 18 21
406 OV1	pos. 28	pos. 11	22	2 3 4 11 16 23	7 8 9 10
		neg. 16	1* 5 13	15 18 19 20 25 26 27 28	6 12 14 17 21 24
612 OV9	pos. 28	pos. 0			
		neg. 28	1* 3 4 9 12 14 19 20 21 22 25 26	13 16 27	2 5 6 7 8 10 11 15 17 18 23 24 28
616 OV5	pos. 28	pos. 2			27 28
		neg. 28	1*		2 - 26
619 OV8	pos. 28	pos. 0			
		neg. 28	1* 2 4 5 11 14 20 21 22 23 24 25 27	15	3 6 7 8 9 10 12 13 16 17 18 19 26 28
704 OV5	pos. 28	pos. 0			
		neg. 28	1* 2 3* 4* 5* 7 8 10 11* 12* 13 14* 15 16* 17 18 19* 20* 21 22 23 24* 25* 26* 27 28		6 9

### 5.3. Sequenzdaten

#### 5.3.1 Sequenz von BCTV105

```

ACCGGATGGC CCCCAAAAAA TACGTGGCCC AATGAAAAAA TGCCACGTGG
AAAGCAAAG ATGTTCGATGT GACGTTTTTG AGCGGGAAC TTCCTCAAGA
AGATTCCTGC GGGAAACTTC CTGAAGAAGA TTCCTTTCAG ATAAGATTTG
TTGACTGGTC AATATAAGTG GACAACTTTA TTAAAGTAAC TTTACTTTAT
TAAAAGTAAA GTAAGTGGGC CCCACAGGAA ACTTGCTCAG CAAGTTTTGA
ATTATGTCGT TTTATATACG TTATTTTTAC ATGTATATGT ACTTATAAAT
GATGGTCTGT CTACCAGACT GGTTATTTTT GCTATTTATC TTCAGTATTC
TACTGCAATC AGGTACGAAC TTTTATGGGA CCTTTCAGAG TGGATCAATT
TCCAGACAAT TATCCAGCCT TTCTAGCAGT ATCGACCAGT TGTTTCTTAA
GGTACAACAC GTGGTGTATA CTAGGTATCC ATCAAGAGAT AGGGTCTCTG
ACCCTAGAAG AAGGCGAGGT CTTTCGTCAA TTCCAGAAGG AAGTGAAGAA
GCTACTGAGG TGTAAGGTTA ATTTTCATAG GAAGTGTTCC TTGTATGAGG
AAATATACAA GAAATACGTA TACAATGTCC CAGAAAAGAA AGGTGAATCC
TCAAAGTGCG TGGCCGAAGA AGAGGAGGAC TAGTACGACT TCGAGGAAAT
ACCAATGGAA GAGACCTGTG ACAAAAAACA GGACTCTGAA GTTAAAGATG
TATGATGATA TGTTGGGTGC TGGTGGTATA GGATCTACCA TTAGTAATAA
TGGTATGATT ACTATGTTGA ATAATTATGT CCAGGGTATT GGTGATAGTC
AGAGAGCGAA GAACGTTACT GTGACGAAGC ATTTGAAGTT TGATATGGCT
CTTATGGGGA GTTCTCAGTT CTGGGAGACT CCTAATTATA TGACCCAATA
TCATTGGATT ATCATAGACA AGGATGTTGG GTCAGTGTTT CCTACTAAGT
TATCGAGTAT ATTTGATATT CCCGATAACG GTCAGGCTAT GCCGTCTACT
TATCGTATTC GAAGAGATAT GAACGAGAGG TTTATTGTGA AGAAGAAATG
GAGAACTCAT TTGATGTCTA CTGGTACTGG ATATGGAGGG AAGGAGACTT
ACAAGGCTCC TTCAATGCCA AATTACAAGA AACCGATGAA TATCAATGTC
CGCAATCTGA ACATGAGGAC TATTTGGAAA GACACCGGTG GTGGGAAGTA
TGAAGACGTG AAGGAGAATG CTTTACTCTA TGTTGTTGTT AATGATAATA
CGGATAATAC TAATATGTAT GCCACTTTGT TTGGCAATTG TAGATGTTAT
TTTTATTAAT AAAAATATTA TATTTTTAAT ACAATTTTCAAT TGCAACACTC
TGGTTCTGAA TTACACTTGA TACAAAATTA AATTCCTTCAAT ACAGGACATG
ATTTAAACCT CTAATTACAT TATTAATACA AATTTAAACCT AAATTATCCA
AGTATATCTC TAGTCTCTTT TTCAAGACTT TCAAAAAACG GTCCCCAGTT
AATGTCCTGT GTGATCCAGT GATCGTCAA TCTATCCAGC ACTTGTGAAG
ATTCAAGTAT TTGCGGAGGT TGTGGTTGAA TCTTATCTGG ACTTTCAGTT
GATAAACTGG CCCGGAACGG AGGAAGTCTT GGAGTTTGAG GTACAATGGA
TTCGGTACCA AGTCCACGGG TATGGAATTC GTCGCTTGTT GCAGCGTGAT
GGGTTCTCT GTGCGAAAAT CCCTGATTAC ATTCATGATG AATTGTGAAA
TGACACTTAC AAGGAAGTTT GATCTTGCGA GGACGCTTCT TGATTGTTAT
CAAAGAGAGG ACTTGTGAGT TTGGCGAAAA CTGAATTTTG TAATGTCCAG
GACCTAAGGG CTTCAATTTT TGATTTATTG AGGAAGTCTT GGTAAGAGCT
GCCTTCGCCT GGATTGCATA ATATAATACT GGAATACCA CCGTTAATGA

```

CACGTGGTTT TCCATACTTT AAGTTTGTCT GCCACTCTCT TTGTGCGCCT  
ATAAGGTGCT TCCAATGCTT CATCTTTAAG TAATCGGGAT CTACGTCATC  
AATGACGTTA TACAGAACAT TATCACTATA AGTTTTTAAA CTAAAATCTA  
AATGCCCAGT AATATAATTA TGTGGACCTA AACACCTGGC CCACATTGTT  
TTACCTGTTC TTGAATCACC CTCTATGATT ATACTATTAT ATCTAAAAGG  
CCGCGCAGCG GGATCCAAAC CAAAATAAGA ATCGGCCCAT TCCTGAATAA  
TTTCTGGAAC TCTAGTGAAA GAAGAAAGAG CAAAAGGTGG TTGATAAAGA  
TCTGGAGGAG GAAGAAAAAT AGCCTCTAAG TTAGGTTTGA GGTTGTGATA  
CTGAAAAATA TATTTTTCTG GGAGTTTCTC CTTTATTATC TGCAGAGCTT  
CTAATGCATT ACCTGCATTT AATGCCTCTG CTGCAGCATC ATTAGCCGTC  
TGTTGACCTC CGCGTGCAGA TCTTCCATCG ACCTGAAATT CACCCCAGTC  
GATGTGATCT CCGTTCTTTG AGACGTAGGA CTTGACGTCG GAACTGGATT  
TAGCTCCCTG AATATTGCAG TGGAATTGTT TGCTGGTACT TCGATGTACC  
AGATCGAAGT AACGGGCATT ACGGATCTGG ACTTTTCCTT CGAATTGAAT  
AAGGGCATGC AGATGTGGTT CCCCATTTTC ATGTAATTCT CTGCAGATGC  
GAATATATTT TTTATTCGAC GGTGTATTTA TAGCGAGGAG CTGTTCTAAG  
GCGTCTTCTT TGGTACTGA ACATTGAGGG TATGTAAGGA AAAAATTTTT  
GGCTTTTTTG TAAAAGGCA TATTGAATCG GGCTCTCTTC AAATCCTCTA  
TCAATTGGGT GCTTTGGGTG CTCTTAAATA CCACCAAGGG GCCATCCGCA  
TTAATATT

### 5.3.2 Sequenz von BCTV59

```

ACCGGATGGC CCCCAAAAAA TACGTGGCCC AATGAAAAAA TGCCACGTGG
AAAGCAAAAG ATGTTCGATGT GACGTTTTTTG AGCGGGAAAC TTCCTCAAGA
AGATTCCTGC GGGAAACTTC CTGAAGAAGA TTCCTTTCAG ATAAGATTTG
TTGACTGGTC AATATAAGTG GACAACTTTA TTAAAGTAAC TTTACTTTAT
TAAAAGTAAA GTAAGTGGGC CCCACAGGAA ACTTGCTCAG CAAGTTTTGA
ATTATGTCGT TTTATATACG TTATTTTTTAC ATGTATATGT ACTTATAAAT
GATGGTCTGT CTA CTGTTGAC TGGATATGGA GGGAAAGGAGA CTTACAAGGC
TCCTTCAATG CCAAATTACA AGAAACCGAT GAATATCAAT GTCCGCAATC
TGAACATGAG GACTATTTGG GAAGACACCG GTGGTGGGAA GTATGAAGAC
GTGAAGGAGA ATGCTTTACT CTATGTTGTT GTTAATGATA ATACGGATAA
TACTAATATG TATGCCACTT TGTTTGGCAA TTGTAGATGT TATTTTTATT
AATAAAAATA ATATATTTTT AATACAATTT CATTGCAACA CTCTGGTTCT
GAATTACACT TGATACAAAA TTAAATTCTT CATA CAGGAC ATGATTTAAA
CCTCTAATTA CATTATTAAT ACAAATTA AA CCTAAATTAT CCAAGTATAT
CTCTAGTCTC TTTTCAAGA CTTTCAAAAA ACGGTCCCA GTTAATGTCC
TGTGTGATCC AGTGATCGTC AAATCTATCC AGCACTTGTG AAGATTCAAG
TATTTGCGGA GGTTGTGGTT GAATCTTATC TGGACTTTCA GTTGATAAAC
TGGCCCGGAA CGGAAGAAGT CCTGGAGTTT GAGGTACAAT GGATTCGGTA
CCAAGTCCAC GGGTATGGAA TTCGTCGCTT GTTGCAGCGT GATGGGTTCC
TCTGTGCGAA AATCCCTGAT TACATTCATG ATGAATTGTG AAATGACACT
TACAAGGAAG TTTGATCTTG CGAGGACGCT TCTTGATTGT TATCAAAGAG
AGGACTTGTG AGTTTGGCGA AA ACTGAATT TTGTAATGTC CAGGACCTAA
GGGCTTCATT TTCTGATTTA TTGAGGAAGT CTTGGTAAGA GCTGCCTTCG
CCTGGATTGC ATAATATAAT ACTGGGAATA CCACCGTTAA TGACACGTGG
TTTTCCATAC TTTAAGTTTG TCTGCCACTC TCTTTGTGCG CCTATAAGGT
GCTTCCAATG CTT CATCTTT AAGTAATCGG GATCTACGTC ATCAATGACG
TTATACAGAA CATTATCACT ATAAGTTTTT AA ACTAAAAT CTAGATGCCC
AGTAATATAA TTATGTGGAC CTA AACACCT GGCCACATT GTTTTACCAG
TTCTTGAATC ACCCTCTATG ATTATACTAT TATATCTAAA AGGCCGCGCA
GCGGGATCCA AACCAAAATA AGAATCGGCC CATTCTGAA TAATTTCTGG
AACTCTAGTG AAAGAAGAAA GAGCAAAAGG TGGTTGATAA AGATCTGGAG
GAGGAAGAAA AATAGCCTCT AAGTTAGGTT TGAGGTTGTG ATACTGAAAA
ATATATTTTT CTGGGAGTTT CTCCCTTATT ATCTGCAGAG CTTCTAATGC
ATTACCTGCA TTTAATGCCT CTGCTGCAGC ATCATTAGCC GTCTGTTGAC
CTCCGCGTGC AGATCTTCCA TCGACCTGAA ATTCACCCA GTCGATGTGA
TCTCCGTTCT TTGAGACGTA GGA CTTGACG TCGGAACTGG ATTTAGCTCC
CTGAATATTG CAGTGG AATT GTTTGCTGGT ACTTCGATGT TGCAGATCGA
AGTAACGGGC ATTACGGATC TGGACTTTTC CTTCGAATTG AATAAGGGCA
TGCAGATGTG GTTCCCCATT TTCATGTAAT TCTCTGCAGA TGCGAATATA
TTTTTTATTC GACGGTGTAT TTATAGCGAG GAGCTGTTCT AAGCGTCTT
CTTTGGTTAC TGAACATTGA GGGTAGGTAA GGAAAAAATT TTTGGCTTTT

```

TGTAAAAAAG GCATATTGAA TCGGGCTCTC TTCAAATCCT CTATCAATTG  
 GGTGCTTTGG GTGCTCTTAA ATACCACCAA GGGGCCATCC GCATTAATAT  
 T

### 5.3.3 andere Isolate aus den USA

#### pID-1-149 mit BCTVid-C-1:

AATTCGTCGC TTGTTGCAGC GTAATGGGTT CCTCTGTGCG AAAATCCCTG  
 ATTACATTCA TGATGAATTG TGAAATGACA CTTACAAGGA AGTTTGATCT  
 TGCAGGACG CTTCTTGATT GTTATCAAAG AGAGGACTTG

#### pID-1-149 mit BCTVid-2:

CATGAGGACT ATTTGGAAAG ACACCGGTGG TGGGAAGTAT GAAGATGTGA  
 AGGAGAATGC TTTACTCTAT GTTGTTGTGG GGGATAAAAC GGATAACACC  
 AATATGTATG CCACTTTGTT TGGCAATTGT AGACGTCATC TCCATTAATA  
 AAAATATTAT TTATTTAATA CAATTTTCATC GCAACACCAG TATATCGAAT  
 TACACCTGAC AAAAAATTAA ATTCCCCAAA CAGGACACGA TTCAAACCCC  
 CAATGACATT ATTAACACAA ATCAAACCCA TATCACCCAA GTATATCGCC  
 AGGCCCTTT TCAAGACGCC CAAAAACGG GCCCCAGTCA AAGGCCCGTG  
 TGAACCAGTG ACCGTCAGAA CCAACCAGCA CCGGTGAAGA GTCAAGGATT  
 TGCAGGAGGT GTGGTTGAAT CCCATCCGGA CCCGCAGTCG ATAAACCGGC  
 CCGGGTCGGA AGAAGGCCTG GAGTCTGAGG CACAACGGAT TCGGGACCAA  
 ATCCACGGGT ATGGAATGCC CGGGGAGCCG TCGACCCGCA GCCAAGCC

**pID-1-149 mit BCTV105A:**

TATTCCAGAC	AATTATCGAG	CCTTTCTAGC	AGTATCGACC	AGTTGTTTCT
TAAGGTACAA	CAAGTGGTGT	ATACTAGGTA	TCCATCAAGA	GATAGAGTCT
CTGACCCTAG	AAGAAGGCGC	GGTCTTTCTT	CAATTCCAGA	AGGAAGTGAA
GAAGCTACTG	AGGTGTAAGG	TTAATTTTCA	TAGGAAGTGT	TCATTGTATG
AGGCAATATA	CAAGAAATAC	GTATACAATG	TCCCAGAAAA	GAAAGGTGAA
TCTCCAAAGT	GCGTGGCCGA	AGAAGAGGAG	GACTACTACG	ACTTCGAGGA
AATACCAATG	GAGGACACCT	GTGACAAAAA	ACAGGACTCT	GAAGTTAAAG
ATGTATGATG	ATATGTTGGG	TGCTGGTGGT	GTAGGATCTA	CCATTAGTAA
TAATGGTATG	ATTACTATGT	TGAATAATTA	TGTCCAGGGT	ATTGGTGATA
GTCAGAGAGC	GAAGAACGTT	ACTGTGACCA	AGCATTTGAA	GTTTGATATG
GCTCTTATGG	GGAGTTCTCC	TTTCTGGGAG	ACTCCTAATT	ATATGACCCA
ATATCATTGG	ATTATCATAG	ACAAGGATGT	TGGGTCAGTG	TTTCCTACTA
AGTTATCGAG	TATATTTGAT	ATTCCCGATA	ACGGTCAGGC	TATGCCGTCT
ACTTATCGTA	TTCGAAGAGA	TATGAACGAG	AGGTTTATTG	TGAAGAAGAA
ATGGAGAACT	CATTTGATGT	CTACCGGTAC	TGGATATGGA	GGGAGGAGAC
TTACAACGCT	CCTTCAATGC	CAATTACAGA	AACCGA	

**pWA95-3-106 mit BCTV105A:**

GACAATTATC	CAGCCTTTCT	AGCAGTATCG	ACCAGTTGTT	TCTTAAGGTA
CAACAGGTGG	TGTATACNAG	GTATCCATCA	AGAGATAGAG	CCTCTGACCC
TAGAAGAAGG	CGAGGTCTTT	CTGCAATTCC	AGAAGGAAGT	GAAGAAGCTA
CTGAGGTGTA	AGGTCAACTT	TCATAGGAAG	TGTTTCGTTGT	ATGAGGAAAT
ATACAAGACG	TACGTACACA	ATGTCCCAGA	AAAGAAAGGT	GAATCTCTCA
AAGTGCGTGG	CCGAAGAAGA	GGAGGACTAC	TACGACTTCG	AGGAAATACC
AATGGAGGAG	ACCTGTGACA	AAAAACAGGA	CTCCGAAGTT	AAAGATGTAT
GATGATATGC	TTGGTGCTGG	TGGTATAGGA	TCTACCATTA	GTAATAATGG
TATGATTACT	ATGTTGAATA	ATTATGTCCA	AGGTATTGGT	GATAGTCAGA
GAGCGAACAA	CGTTACTGTG	ACGAAGCATT	TGAAGTTTGA	TATGGCTCTT
ATGGGGAGTT	CCCGTTCTGG	GAGACTCCTA	ATTATATGAC	CCAATATCAT
TGGATTATCA	TAGACAAGGA	TGTTGGGTCA	GTGTTCCCTA	CTAAGTTATC
TAGTATATTT	GATATTCCTG	ATAACGGTCA	GGCTATGCGT	CTACTTATCG
TATTCGAAGA	GATATGAACG	AGAGGTTTCAT	TGTGAAGAAG	AAGTGGAGAA
CTCATTTGAT	GTCTACTGGG	TACTGGCTAT	GGAGGTAAGG	AGACTTACAA
CGCTCCTTCA	ATGCCA			

**pML-95-1-64 mit BCTV105A:**

CCAGCCTTTC	TAGCAGTATC	GACCAGTTGT	TTCTTAAGGT	ACAACAGGTG
GTGTATACTA	GGGATCCATC	AAGAGATAGA	GCCTCTGACC	CTAGAAGAAG
GCGAGGTCTT	TCTGCAATTC	CAGAAGGAAG	TGAAGAAGCT	ACTGAGGTGT
AAGGTCAACT	TTCATAGGAA	GTGTTTCGTTG	TATGAGGAAA	TATACAAGAC
ATACGTACAC	AATGTCCCAG	AAAAGAAAGG	TGAATCCTCA	AAGTGCGTGG
CCGAAGAAGA	GGAGGACTAC	TACGACTTCG	AGGAAATACC	AATGGAGGAG
ACCTGTGACA	AAAAACAGGA	CTCCGAAGTT	AAAGATGTAT	GATGATATGC
TTGGTGCTGG	TGGTATAGGA	TCTACCATTA	GTAATAATGG	TATGATTACT



ATGTTGAATA	ATTATGTCCA	GGGTATTGGT	GATAGTCAGA	GAGCAAACAA
CGTTACTGTG	ACGAAGCATT	TGAAGTTTGA	TATGGCTCTT	ATGGGGAGTT
CTCCTTTCTG	GGAGACTCCT	AACTATATGA	CACAATATCA	TTGGATTATC
ATAGACAAGG	ATGTTGGGTC	AGTGTTCCCT	ACTAAGTTAT	CCAGTATATT
TGATATTCCG	GATAACGGTC	AGGCTATGCC	TTCTACTTAT	CGTATTCGAA
GAGATATGAA	CGAGAGGTTC	ATTGTGAAGA	AGAAGTGGAG	AACTCATTTT
GATGTCTACT	GGGTACTGGC	TATGGGAGGC	AAGGAGACTT	ACAAGGCCTC
CTTCAATGCC	AAATTACAAG			

#### 5.4. Tabellenwerte für den $\chi^2$ -Test

Auszug aus: Köhler, Schachtel, Voleske, Biostatistik, Springer-Lehrbuch:

Tab.30:  $\chi^2$ -Tabelle

Freiheitsgrad FG	Signifikanzniveau $\alpha$		
	5%	1%	0,1%
1	3,84	6,63	10,83
2	5,99	9,21	13,82
3	7,81	11,34	16,27
4	9,49	13,28	18,47
5	11,07	15,09	20,52
6	12,59	16,81	22,46
7	14,07	18,48	24,32
8	15,51	20,09	26,13
9	16,92	21,67	27,88
10	18,31	23,21	29,59

## 5.5. Größen und Einheiten

Tab.31: Größen und Einheiten

Größe	Symbol	Einheit	Einheitensymbol
elektrische Feldstärke	E	Newton/Coulomb = Volt/Meter	1 N/C = 1 V/m
elektrische Kapazität	C	Farad	F
Leistung	P	Watt	W
Spannung	U	Volt	V
Stoffmenge	N	Mol	mol
Stoffmengen- konzentration	c	molar	M = mol/l
Stromstärke	I	Ampère	A
Temperatur	$\vartheta$	Grad Celsius	°C
Volumen	V	Kubikmeter Liter	m <sup>3</sup> 1l = 1 dm <sup>3</sup>
Zeit	t	Sekunde	s

Tab.32: Bezeichnungen der dezimalen Vielfachen und Teile von Maßeinheiten

Zehnerpotenz	Vorsilbe	Kurzzeichen
10 <sup>3</sup>	Kilo	k
10 <sup>-1</sup>	Dezi	d
10 <sup>-2</sup>	Centi	c
10 <sup>-3</sup>	Milli	m
10 <sup>-6</sup>	Mikro	μ
10 <sup>-9</sup>	Nano	n
10 <sup>-12</sup>	Piko	p

## **5.6. Chemikalienliste**

Agar  
Agarose  
*p*-Aminobenzoesäure  
Ammoniumperoxodisulfat  
Ampicillin  
Arginin  
Ascorbinsäure  
Asparagin  
Bacto-Trypton  
N6-Benzyladenin  
Biotin  
Blocking Reagent, Boehringer Mannheim  
Borsäure  
Bromphenolblau  
Calciumchlorid Dihydrat  
Carbenicillin  
Cellulase „Onozuka R-10“  
Chloroform  
Cholinchlorid  
CSPD-Substrat, Boehringer Mannheim  
DIG-DNA Labeling Kit, Boehringer Mannheim  
DMF, Dimethylformamid  
DMSO, Dimethylsulfonat  
dNTP Master Mix, Eurogentec  
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure  
Ethanol  
Ficoll  
Folsäure  
Gamborg's B5 Basal Salt Mixture (G-5768, Sigma)  
Gamborg's Vitamin Powder (G-2519, Sigma)  
 $\alpha$ -D(+)-Glucose  
Glutamin  
Glycerin  
Glycin  
Gold Microcarrier, Bio-Rad  
Hefe Extrakt  
Heringssperma DNA  
Indol-3-buttersäure  
Inosit  
IPTG, Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid  
Kaliumchlorid  
Kaliumdihydrogenphosphat  
Kaliumiodid  
Kaliumnitrat  
Kaliumsulfat Pentahydrat  
Kanamycin

Klorix  
Lambda-DNA, Fa. Fermentas  
N-Lauroylsarkosin  
Lithiumchlorid  
Loading buffer, Sequi Therm Cycle Sequencing Kit LC, Epicentre  
Lysozym  
Murashige and Skoog Basal Medium with Gamborg's Vitamins (M-0404, Sigma)  
Murashige and Skoog Basal Medium (M-5519, Sigma)  
Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (M-5524, Sigma)  
Macerozym „Onozuka R-10“  
Magnesiumsulfat Heptahydrat  
Maleinsäure  
MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)  
Natriumacetat  
Natriumchlorid  
Natriumcitrat  
Natriumhydroxid  
Nicotinsäure  
Nucleobond-Kit  
Panthothensäure  
PEG 4000  
Phenylalanin  
Prep-A-Gene Kit, Bio-Rad  
2-Propanol  
*n*-Propylgallat  
Pyridoxin HCl  
Riboflavin  
Rifampicin  
RNase A  
Salzsäure  
SDS, Natriumdodecylsulfat  
Spermidin  
Sucrose  
Thiamin HCl  
Tris (Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan)  
Tris-gesättigtes Phenol  
Tryptophan  
Tween-20  
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)

## **5.7. Geräteliste**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Biolistic®PDS-1000 / He Particle Delivery System	Bio-Rad
Gelapparaturen	MWG-Biotech
Gene Pulser ®II	Bio-Rad
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific
Kühlwasserbad RM6	Lauda
Laborschüttler Vortex Genie-2	Scientific Industries
Nanopure-Anlage	Barnstead
Photometer, Gene Quant II	Pharmacia
Pulse Controller Plus	Bio-Rad
Schüttelwasserbad GFL 1092	GFL
Sequencer Li-Cor 4000 L	MWG-Biotech
Spannungsquelle Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia
Taumel-Rollenmischer RM5	Hecht-Assistent
Thermocycler Touch Down	Hybaid
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman
UV-Crosslinker	Amersham Life Science
Vacuum Concentrator	Bachofer
Video Copy Processor	Mitsubishi
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Zentrifuge RC 5C Plus	Sorvall
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech

## **5.8. Tabellenverzeichnis**

Tab.1: Einteilung der Geminiviren	11
Tab.2: Untersuchte F <sub>1</sub> -Linien	27
Tab.3: Doppelhaploide Pflanzen zur Resistenzbestimmung	28
Tab.4: verwendete Taq DNA Polymerasen	44
Tab.5: verwendete Primer	45
Tab.6: verwendete 5'-IR-markierte Primer zur Sequenzierung	62
Tab.7: Übersicht der Linien, die keine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und Symptomstärke aufweisen	71
Tab.8: Übersicht der Linien, die eine Korrelation zwischen replikativem DI-DNA Gehalt und Symptomstärke aufweisen	74
Tab.9: Symptomanalyse weiterer inokulierter Linien	79
Tab.10: Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten doppelhaploiden Pflanzen	81
Tab.11: Symptomanalyse doppelhaploide Pflanzen	84
Tab.12: Ergebnisse der Optimierung der Medienzusammensetzung im Blattscheibentest	87
Tab.13: Zusammenfassung der Blattscheibeninfektionstests der Linien 71036 K, 71037 K und 71038 K	90
Tab.14: Analyse der USA-Proben mittels Southern Blot und PCR	95
Tab.15: DNA-Sequenzvergleich von Isolat 105 mit den bekannten Curtoviren	99
Tab.16: Vergleich der Offenen Leserahmen des Isolats 105 mit den korrespondierenden ORFs der bisher sequenzierten Curtoviren	99
Tab.17: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Offenen Leserahmen des Isolats 105 mit den bekannten Curtoviren	100
Tab.18: Untersuchte Proben der Arbeitsgruppe Stenger, Ergebnisse nach Restriktionsanalyse	105
Tab.19: Ergebnisse der Sequenzierungen anderer USA-Isolate	105
Tab.20: Zusammenfassung der Zuckerrübenlinien mit vermuteter Resistenzwirkung gegen eine BCTV Infektion	106
Tab.21: Ergebnisse der Infektionstest mit BCTV in transgenen <i>N. benthamiana</i> Pflanzen	111
Tab.22: Analyse der Transgenität der einzelnen Linien	112
Tab.23: Analyse der Mobilisierungsfähigkeit des Transgens	113
Tab.24: Ergebnisse der Linie 84124 T	114
Tab.25: Pflanzendaten Mai-November 1998	123
Tab.26: Pflanzendaten August 1998	124
Tab.27: Pflanzendaten Dezember 1998	125

Tab.28: Pflanzendaten Mai 1999	126
Tab.29: Pflanzendaten der doppelhaploiden Pflanzen	127
Tab.30: $\chi^2$ -Tabelle	134
Tab.31: Größen und Einheiten	135
Tab.32: Bezeichnungen der dezimalen Vielfachen und Teile von Maßeinheiten	135



## **5.9. Abbildungsverzeichnis**

Abb.1: Genomorganisation der BCTV-Stämme	13
Abb.2: Schema der Experimente an transgenen Pflanzen	18
Abb.3: Schematische Darstellung des Ti-Plasmids vom Nopalintyp	51
Abb.4: Schema der Herstellung des DI-DNA Transgens aus BCTV-Cal	66
Abb.5: Symptome BCTV-infizierter Zuckerrüben, 50 dpi	67
Abb.6: Southern Blot Analyse BCTV-infizierter Zuckerrüben	68
Abb.7: Agarosegelelektrophorese der PCR auf Transgen und replikative DI-DNA.	69
Abb.8: Symptomausprägung der Linie 84124 T im Vergleich zu 84118 T und 84116 T, 50 dpi	78
Abb.9: Schematische Darstellung des relativen Virus DNA Gehaltes über die Zeit der Probenahme.	88
Abb.10: Karte des US-Bundesstaates Idaho	92
Abb.11: Beispielfoto einer Agarosegelelektrophorese der USA-Proben Nr. 1 - 10 nach PCR mit den Primern BCTV 14 und 15	93
Abb.12: Beispielfoto einer Agarosegelelektrophorese der USA-Proben Nr. 48, 51, 54, 57 nach PCR mit den Primern BCTV 3 und 5	94
Abb.13: Genomorganisation von BCTV 105	98
Abb.14: Homologievergleich der DNA-Sequenz innerhalb der Intergen Region von BCTV105 mit dem CFH- und Kalifornischen Stamm.	101
Abb.15: Erzeugung eines Bitmer-Klons anhand des Beispiels der AccI-Verdauung	102
Abb.16: Genomorganisation von BCTV59	104
Abb.17: Plasmidkarte des Vektors pBluescript II KS+	121
Abb.18: Plasmidkarte des Vektors pBin19	121
Abb.19: Schematische Darstellung des BCTV-Cal Bitmers im Vektor pBin19 zur Agroinfektion	122

## **5.10. Literaturverzeichnis**

- Ach, R. A., Durfee, T., Miller, A. B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P. C., und Grissem, W.** (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell Biol.* 17, 5077-5086.
- Azzam, O., Frazer, J., Rosa, D. d. I., Beaver, J. S., Ahlquist, P., und Maxwell, D. P.** (1994). Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of Bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204, 289-296.
- Bejarano, E.R., Khashoggi, A., Witty, M. und Lichtenstein, C.** (1996). Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *PNAS* 93, 759-764.
- Birnboim, H. C., und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513.
- Boulton, M. I., Steinkellner, H., Donson, J., Markham, P. G., King, D. I., und Davies, J. W.** (1989). Mutational analysis of the virion-sense genes of Maize streak virus. *J. Gen. Virol.* 70.
- Briddon, R. W., Bedford, I. D., Tsai, J. H., und Markham, P. G.** (1996). Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, Tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219, 387-394.
- Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J., und Markham, P. G.** (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177, 85-94.
- Briddon, R. W., Stenger, D. C., Bedford, I. D., Stanley, J., Izadpanah, K., und Markham, P. G.** (1998). Comparison of a Beet curly top virus isolate originating from the old world with those from the new world. *European Journal of Plant Pathology* 104, 77-84.
- Briddon, R. W., Watts, J., Markham, P. G., und Stanley, J.** (1989). The coat protein of Beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* 172, 628-633.
- Brunetti, A., Tavazza, M., Noris, E., Tavazza, R., Caciagli, P., Ancora, G., Crespi, S., und Accotto, G. P.** (1997). High expression of truncated viral Rep protein confers resistance to Tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 571-579.
- Choi, I.-R., und Stenger, D. C.** (1996). The strain-specific *cis*-acting element of Beet curly top geminivirus DNA replication maps to the directly repeated motif of the ori. *Virology* 226, 122-126.
- Choi, I.-R., und Stenger, D. C.** (1995). Strain-specific determinants of Beet curly top geminivirus DNA replication. *Virology* 206, 904-912.
- Day, A. G., Bejarano, E. R., Buck, K. W., Burrell, M., und Lichtenstein, C. P.** (1991). Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus Tomato golden mosaic virus. *PNAS* 88, 6721-6725.

- Desbiez, C., David, C., Mettouchi, A., Laufs, J., und Gronenborn, B.** (1995). Rep protein of Tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral replication [published erratum appears in PNAS 1995 Nov 21, 92 (24): 11322]. *PNAS* 92, 5640-5644.
- Duan, Y.-P., Powell, C. A., Webb, S. E., Purcifull, D. E., und Hiebert, E.** (1997). Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing mutated BC1 protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 617-623.
- Eagle, P. A., Orozco, B. M., und Hanley-Bowdoin, L.** (1994). A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell* 6, 1157-1170.
- Elmer, J. S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W. E., Bisaro, D. M., und Rogers, S. G.** (1988). Genetic analysis of the Tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Research* 16, 7043-7060.
- Etessami, P., Saunders, K., Watts, J., und Stanley, J.** (1991). Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. *Journal of General Virology* 72, 1005-1012.
- Fontes, E. P., Eagle, P. A., Sipe, P. S., Luckow, V. A., und Hanley-Bowdoin, L.** (1994a). Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* 269, 8459-8465.
- Fontes, E. P., Gladfelter, H. J., Schaffer, R. L., Petty, I. T., und Hanley-Bowdoin, L.** (1994b). Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* 6, 405-416.
- Fontes, E. P., Luckow, V. A., und Hanley-Bowdoin, L.** (1992). A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* 4, 597-608.
- Freytag, A. H., Anand, S. C., Rao-Arelli, A. P., und Owens, L. D.** (1988). An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. in vitro. *Plant Cell Reports* 7, 30-34.
- Frischmuth, T., Engel, M., und Jeske, H.** (1997). Beet curly top virus DI DNA-mediated resistance is linked to its size. *Molecular Breeding* 3, 213-217.
- Frischmuth, T., Roberts, S., von Arnim, A., und Stanley, J.** (1993). Specificity of bipartite geminivirus movement proteins. *Virology* 196, 666-673.
- Frischmuth, T. und Stanley, J.** (1998). Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African cassava mosaic geminivirus. *Journal of General Virology* 79, 1265-1271.
- Frischmuth, T., und Stanley, J.** (1994). Beet curly top virus symptom amelioration in *Nicotiana benthamiana* transformed with a naturally occurring viral subgenomic DNA. *Virology* 200, 826-830.
- Frischmuth, T., und Stanley, J.** (1993). Strategies for the control of geminivirus diseases. *Virology* 4, 329-337.
- Frischmuth, T., und Stanley, J.** (1992). Characterization of Beet curly top virus subgenomic DNA localizes sequences required for replication. *Virology* 189, 808-811.

- Frischmuth, T., and Stanley, J.** (1991). African cassava mosaic virus DNA interferes with the replication of both genomic components. *Virology* 183, 539-544.
- Geyt, J. P. C. v., and Jacobs, M.** (1985). Suspension culture of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Induction and habituation of dedifferentiated and self-regenerating cell lines. *Plant Cell Reports* 4, 66-69.
- Greef, W. d., and Jacobs, M.** (1979). In vitro culture of the sugarbeet: Description of a cell line with high regeneration capacity. *Plant Science Letters* 17, 55-61.
- Haley, A., Zhan, X., Richardson, K., Head, K., and Morris, B.** (1992). Regulation of the activities of African cassava mosaic virus promoters by the AC1, AC2 and AC3 gene products. *Virology* 188, 905-909.
- Hanley-Bowdoin, L., Elmer, J. S., and Rogers, S. G.** (1989). Functional expression of the leftward open reading frames of the A component of Tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 1, 1057-1067.
- Hanson, S. F., Hoogstraten, R. A., Ahlquist, P., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., and Maxwell, D. P.** (1995). Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of Bean golden mosaic geminivirus. *Virology* 211, 1-9.
- Harrison, B. D.** (1985). Advances in geminivirus research. *Ann. Rev. Phytopathology* 23, 55-82.
- Harrison, B. D., Zhou, X., Otim-Nape, G. W., Liu, Y., and Robinson, D. J.** (1997). Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Annals of Applied Biology* 131, 437-448.
- Hayes, R. J., and Buck, K. W.** (1989). Replication of Tomato golden mosaic virus DNA B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA A: requirement of ORF AL2 for production of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 10213-10222.
- Heyraud-Nitschke, F., Schumacher, F., Laufs, J., Schaefer, S., Schell, J., and Gronenborn, B.** (1995). Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Res.* 23, 910-916.
- Heyraud, F., Matzeit, V., Kammann, M., Schaefer, S., Schell, J., and Gronenborn, B.** (1993). Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of Wheat dwarf virus. *EMBO* 12, 4445-4452.
- Höfer, P., Engel, M., Jeske, H., and Frischmuth, T.** (1997). Host range limitation of a pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 1019-1022.
- Holland, J. J.** (1990). Defective viral genomes. In "Virology" (D. M. K. B.N. Fields, Ed.), pp. 151-165. Raven Press, New York.
- Hong, Y., and Stanley, J.** (1996). Virus resistance in *Nicotiana benthamiana* conferred by African cassava mosaic virus replication-associated protein (AC1) transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 219-225.

- Hong, Y., und Stanley, J.** (1995). Regulation of African cassava mosaic virus complementary-sense gene expression by N-terminal sequences of the replication-associated protein AC1. *J. Gen. Virol.* 76, 2415-2422.
- Hoogstraten, R. A., Hanson, S. F., und Maxwell, D. P.** (1996). Mutational analysis of the putative nicking motif in the replication-associated protein (AC1) of Bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 594-599.
- Hooykaas, P. J. J., und Mozo, T.** (1994). *Agrobacterium* molecular genetics. In "Plant Molecular Biology Manual", Vol. B3, pp. 1-9. Kluwer Academic Publishers.
- Hooykaas, R., und Schilperport, R.** (1984). The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. *Advanc. Genet* 22, 209-283.
- Hormuzdi, S. G., und Bisaro, D. M.** (1995). Genetic analysis of Beet curly top virus: Examination of the roles of L2 and L3 genes in viral pathogenesis. *Virology* 206, 1044-1054.
- Howarth, A.J., und Vandemark, G.J.** (1989). Phylogeny of geminiviruses. *Journal of General Virology* 74, 2437-2443.
- Hull, R., und Davies, J. W.** (1992). Approaches to nonconventional control of plant virus disease. *Crit. Rev. Plant Sci.* 111, 17-33.
- Huth, W.** (1999). Reformation of terms of resistance. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzdienst* 57, 162-162.
- Kenton, A., Khashoggi, A., Parokonny, A., Bennett, M. D. und Lichtenstein, C.** (1995). Chromosomal location of endogenous geminivirus-related DNA sequences in *Nicotiana tabacum* L. *Chromosome Research* 3, 346-350.
- Klute, K. A., Nadler, S. A., und Stenger, D. C.** (1996). Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with Rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. *Journal of General Virology* 77, 1369-1378.
- Koukolikova-Nicola, Z., Albright, L., und Hohn, B.** (1987). The mechanism of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to the plant cell. In "Plant DNA infectious agents" (T. S. Hohn, Ed.), pp. 109-148. Springer, Wien.
- van der Krol, A. R., Mol, J. N. M., und Stuitje, A. R.** (1988). Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *BioTechniques* 6, 958-976.
- Latham, J. R., Saunders, K., Pinner, M. S., und Stanley, J.** (1997). Induction of plant cell division by Beet curly top virus gene C4. *The Plant Journal* 11, 1273-1283.
- Laufs, J., I, J., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., und Gronenborn, B.** (1995). Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77, 765-773.
- Lazarowitz, S. G.** (1992). Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11, 327-349.
- Lazarowitz, S. G.** (1991). Molecular characterization of two bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease: role of viral replication

and movement functions in determining host range. *Virology* 180, 327-349.

**Lazarowitz, S. G., Pinder, A. J., Damsteegt, V. D., und Rogers, S. G.** (1989). Maize streak virus genes essential for systemic spread and symptom development. *EMBO* 8, 1023-1032.

**Lazarowitz, S. G., Wu, L. C., Rogers, S. G., und Elmer, J. S.** (1992). Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* 4, 799-809.

**Lenzner, S.**, (1994). Kultur und Manipulation von Protoplasten sowie Pflanzenregeneration bei der Zuckerrübe. *Dissertation* an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin.

**Liu, L., Davies, J. W., und Stanley, J.** (1998). Mutational analysis of Bean yellow dwarf, a geminivirus of the genus Mastrevirus that is adapted to dicotyledonous plants. *Journal of General Virology* 78, 2113-2117.

**Mathis, N., und Hinchee, M. A. W.** (1994). *Agrobacterium* inoculation techniques for plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* B6, 1-9.

**McDaniel, L. L., und Tsai, J. H.** (1990). Partial characterization and serological analysis of Pseudo-curly top virus. *Plant Dis.* 74, 17-21.

**Mol, J. N. M., Krol, A. R. v. d., Tunen, A. J. v., Blokland, R. v., Lange, P. d., und Stuitje, A. R.** (1990). Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS Lett.* 268, 427-430.

**Morris, B.A., Richardson, K.A., Haley, A., Zhan, X. und Thomas, J.E.** (1992) The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of Tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminiviruses infecting monocotyledonous plants. *Virology* 187, 633-642.

**Liu, L., van Tonder, T., Pietersen, G., Davies, J.W. und Stanley, J.** (1997) Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *Journal of General Virology* 78, 2113-2117.

**Lomonossoff, G. P.** (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 323-343.

**Morris, B. A., Richardson, K., Eddy, P., Zhan, X. C., Haley, A., und Gardner, R.** (1991). Mutagenesis of the AC3 open reading frame of African cassava mosaic virus DNA A reduces DNA B replication and ameliorates disease symptoms. *J. Gen. Virol.* 72, 1205-1213.

**Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 263.

**Murashige, T., und Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.

**Nagar, S., Pedersen, T. J., Carrick, K. M., Hanley-Bowdoin, L., und Robertson, D.** (1995). A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7, 705-719.

**Noris, E., Jupin, I., Accotto, G. P., und Gronenborn, B.** (1996). DNA-binding activity of the C2 protein of Tomato yellow leaf curl geminivirus. *Virology* 217, 607-612.

- Orozco, B. M., und Hanley-Bowdoin, L.** (1996). A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *J. Virol.* 70, 148-158.
- Orozco, B. M., Miller, A. B., Settlege, S. B., und Hanley-Bowdoin, L.** (1997). Functional domains of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* 272, 9840-9846.
- Palmer, K. E., und Rybicki, E. P.** (1997). The use of geminiviruses in biotechnology and plant molecular biology, with particular focus on Mastreviruses. *Plant Science* 129, 115-130.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T.** (1989). "Molecular Cloning - A laboratory manual." 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford, J. C., und Johnson, S. A.** (1985). The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. *J. Theor. Biol.* 115, 395-405.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74, 5463.
- Sanz-Burgos, A. P., und Gutiérrez, C.** (1998). Organization of the *cis*-acting element required for Wheat dwarf geminivirus DNA replication and visualization of a Rep protein-DNA complex. *Virology* 243, 119-129.
- Schlangstedt, M., Hermans, B., Zoglauer, K., und Schieder, O.** (1992). Culture of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts in alginate - callus formation and root organogenesis. *Journal of Plant Physiology* 140, 339-344.
- Settlege, S. B., Miller, A. B., und Hanley-Bowdoin, L.** (1996). Interactions between geminivirus replication proteins. *Journal of Virology* 70, 6790-6795.
- Simons, J. N., und Coe, D. M.** (1958). Transmission of Pseudo-curly top virus in Florida by a treehopper. *Virology* 6, 43-48.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503.
- Stanley, J., Frischmuth, T., und Ellwood, S.** (1990). Defective viral DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6291-6295.
- Stanley, J., und Latham, J. R.** (1992). A symptom variant of Beet curly top geminivirus produced by mutation of open reading frame C4. *Virology* 190, 506-509.
- Stanley, J., Latham, J. R., Pinner, M. S., Bedford, I., und Markham, a. P. G.** (1992). Mutational analysis of the monopartite geminivirus Beet curly top virus. *Virology* 191, 396-405.
- Stanley, J., Markham, P. G., Callis, R. J., und Pinner, M. S.** (1986). The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus Beet curly top virus. *The EMBO Journal* 5, 1761-1767.
- Stanley, J., und Townsend, R.** (1985). Characterization of DNA forms associated with Cassava latent virus infection. *Nucleic Acids Res.* 13, 2189-2206.
- Stenger, D. C.** (1998). Replication specificity elements of the Worland strain of Beet curly top virus are compatible with those of the CFH strain but not those of the Cal/Logan strain. *Phytopathology* 88, 1174 - 1178.

- Stenger, D. C.** (1995). Genotypic variability and the occurrence of less than genome-length viral DNA forms in a field population of Beet curly top geminivirus. *The American Phytopathological Society* 85, 1316-1322.
- Stenger, D. C.** (1994). Strain-specific mobilization and amplification of a transgenic defective-interfering DNA of the geminivirus Beet curly top virus. *Virology* 203, 397-402.
- Stenger, D. C., Carbonaro, D., und Duffus, J. E.** (1990). Genomic characterization of phenotypic variants of Beet curly top virus. *Journal of General Virology* 71, 2211-2215.
- Stenger, D. C., und McMahon, C. L.** (1997). Genotypic diversity of Beet curly top virus populations in the Western United States. *The American Phytopathological Society* 87, 737-744.
- Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C., und Bisaro, D. M.** (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8029-8033.
- Stenger, D. C., Stevenson, M. C., Hormuzdi, S. G., und Bisaro, D. M.** (1992). A number of subgenomic DNAs are produced following agroinoculation of plants with Beet curly top virus. *Journal of General Virology* 73, 237-242.
- Stoner, W. N., und Hogan, W. D.** (1950). Viruses affecting vegetable crops in the Everglades area. *Florida Agric. Exp. Stn. Annu. Rep.*, 206.
- Suárez-Lopez, P., und Gutiérrez, C.** (1997). DNA Replication of Wheat dwarf geminivirus vectors: Effects of origin structure and size. *Virology* 227, 389-399.
- Sung, Y. K., und Coutts, R. H.** (1996). Potato yellow mosaic geminivirus AC2 protein is a sequence non-specific DNA binding protein. *FEBS Lett.* 383, 51-54.
- Sung, Y. K., und Coutts, R. H.** (1995). Mutational analysis of Potato yellow mosaic geminivirus. *Journal of General Virology* 76, 1773-1780.
- Sunter, G., und Bisaro, D. M.** (1997). Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): Evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology* 232, 269-280.
- Sunter, G., und Bisaro, D. M.** (1992). Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4, 1321-1331.
- Sunter, G., und Bisaro, D. M.** (1991). Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180, 416-419.
- Sunter, G., Hartitz, M. D., Hormuzdi, S. G., Brough, C. L., und Bisaro, D. M.** (1990). Genetic analysis of Tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while OFR AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179, 69-77.
- Sunter, G., Hartitz, M. D., und Bisaro, D. M.** (1993). Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology* 195, 275-280.
- Szabados, L., und Gaggero, A. C.** (1985). Callus formation from protoplasts of a sugarbeet cell suspension. *Plant Cell Reports* 4, 195-198.



- Timmermans, M. C. P., Das, O. P., und Messing, J.** (1994). Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 79-112.
- Walkerpeach, C. R., und Velten, J.** (1994). Agrobacterium-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. *Plant Molecular Biology Manual B1*, 1-19.
- Westhoff, P., Jeske, H., Jürgens, G., Kloppstech, K., und Link, G.** (1996). "Molekulare Entwicklungsbiologie." Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Woolston, C. J., Reynolds, H. V., Stacey, N. J., und Mullineaux, P. M.** (1989). Replication of Wheat dwarf virus DNA in protoplasts and analysis of coat protein mutants in protoplasts and plants. *Nucleic Acids Res.* 17, 6029-6041.
- Xie, Q., Suarez-Lopez, P., und Gutierrez, C.** (1995). Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO* 14, 4073-4082.
- Zambryski, P.** (1992). Chronicles from the Agrobacterium-plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 465-490.
- Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G.W., Robinson, D.J. und Harrison, B.D.** (1997). Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* 78, 2101-2111.
- Zupa, J., und Zambryski, P.** (1997). The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16, 279-295.

## **Danksagung**

Für die Bereitstellung des Themas und seine erstklassige Betreuung möchte ich meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Thomas Frischmuth herzlich danken. Ganz besonders hervorzuheben sind seine Geduld, die ungeheure Schnelligkeit beim Korrigieren und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge für das Zusammenschreiben.

Dem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid gilt ebenfalls mein besonderer Dank für die Korrektur dieses „fachfremden“ Themas.

Unserem Abteilungsleiter Herrn Prof. Dr. Holger Jeske danke ich im Besonderen für die Einführung in Statistik.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, die mich während der letzten drei Jahre begleitet haben danke ich ebenfalls. Vorallem denke ich dabei an die Gärtner, allen voran an Frau Sigrid Kober, die die Zuckerrüben so sorgsam gepflegt haben.

Dr. Christina Wege danke ich für ihr ständig offenes Ohr und das Beruhigen meiner Nerven vor dem Abschlussvortrag.

Meinem Mitdoktoranden Martin Höhnle danke ich für viele spassige Gespräche, die sich längst nicht nur um die Arbeit drehten. Ohne ihn wären die Laborarbeit und die Tagungen in Regensburg, Heidelberg und Freising nicht so angenehm verlaufen.

Der Fa. Planta, Einbeck danke ich für die Finanzierung dieses Projekts und meiner Stelle.

Meinem Mann Michael danke ich für die Bewältigung meiner Launen, die Mitarbeit bei der Korrektur dieser Arbeit und für die vielen nächtlichen Spontanfahrten an die Uni.

Meinen Eltern danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der Promotion.