

Bestimmung der Kapsidproteindeterminanten für die Übertragung von Geminiviren durch die Weiße Fliege *Bemisia tabaci*

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. Martin Höhnle
aus Stuttgart

Hauptberichter:	PD Dr. Thomas Frischmuth
Mitberichter:	Prof. Dr. Hans-Dieter Görtz
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Juli 2001

Universität Stuttgart, Biologisches Institut,
Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen
2001

Martin Höhnle:

Bestimmung der Kapsidproteindeterminanten für
die Übertragung von Geminiviren durch die
Weiße Fliege *Bemisia tabaci*

„Das schönste Erlebnis ist die Begegnung mit dem Geheimnisvollen. Sie ist der Ursprung jeder wahren Kunst und Wissenschaft. Wer nie diese Erfahrung gemacht hat, wer keiner Begeisterung fähig ist und nicht starr vor Staunen dastehen kann, ist so gut wie tot: Seine Augen sind geschlossen.“

Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
Zusammenfassung	11
Summary	13
1 Einleitung.....	15
1.1 Geminiviren	15
1.1.1 Begomoviren	16
1.1.2 Pseudorekombination von Begomoviren	19
1.2 Die Weiße Fliege <i>Bemisia tabaci</i>	20
1.3 Übertragung von Viren durch Insekten.....	22
1.3.1 Übertragung von Potyviren	24
1.3.2 Übertragung von Caulimoviren	24
1.3.3 Übertragung von Luteoviren	25
1.3.4 Übertragung von Geminiviren.....	26
2 Material und Methoden	29
2.1 Chemikalien	29
2.2 Bakterienstämme, infektiöse Virusklone und Plasmide	29
2.3 Pflanzenmaterial	30
2.4 Enzyme	30
2.5 Reagentsätze (»Kits«).....	31
2.6 Geräte	31
2.7 Sterilisation von Lösungen und Medien	32
2.8 DNA-Präparation.....	32
2.8.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	32

2.8.1.1	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (»Minipräp«)	32
2.8.1.2	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (»Maxipräp«)	33
2.8.2	Isolation von Nukleinsäuren aus Pflanzen	34
2.8.3	Isolation von Gesamt-Nukleinsäuren aus Weißen Fliegen	35
2.8.4	Konzentrationsbestimmung von isolierten Nukleinsäuren	35
2.9	Bakterienanzucht und -transformation.....	36
2.9.1	Anzuchtmedium für Bakterien.....	36
2.9.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> JM83	36
2.9.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.9.4	Screening nach positiven Klonen.....	37
2.10	Nukleinsäure-Nachweis	37
2.10.1	Agarosegel-Elektrophorese	37
2.10.2	Southern Blot-Analyse	38
2.10.2.1	Southern Blot.....	38
2.10.2.2	Nachweis der geblotteten DNA mittels DIG-Hybridisierung	39
2.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2.12	Modifizierung und Reinigung von DNA	46
2.12.1	Restriktion.....	46
2.12.2	Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym	46
2.12.3	Modifikation von DNA mittels Polynukleotidkinase	46
2.12.4	Modifikation von DNA mit Alkalischer Phosphatase	47
2.12.5	Ligation	47
2.12.6	Reinigung von DNA	48
2.12.6.1	Isolation aufgetrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen	48
2.12.6.2	Reinigung von zu sequenzierenden PCR-Amplifikaten	48
2.12.6.3	Reinigung von aus Pflanzen isolierten Virus-Nukleinsäuren.....	48
2.13	DNA-Sequenz-Analyse.....	48
2.14	Herstellung infektiöser Klone von SiGMV/CR-CP- Chimär und AbMV-CP- Mutanten	50
2.15	Infizieren von Pflanzen	55
2.15.1	Inokulum-Herstellung.....	55
2.15.2	Infizieren von Pflanzen durch mechanische Inokulation	56

2.15.3	Infizieren von Pflanzen durch Agroinokulation.....	56
2.15.4	Infizieren von Pflanzen durch Pflanzensaftübertragung (<i>sap transmission</i>)	56
2.15.5	Infizieren von Pflanzen durch Partikelbeschuss	57
2.15.5.1	Vorbereiten der Goldmikroprojekte	57
2.15.5.2	Vorbereiten der Macrocarrier.....	57
2.15.5.3	Partikelbeschuss	58
2.16	Übertragungsversuche von Viren durch die Weiße Fliege (<i>B. tabaci</i>).....	59
3	Ergebnisse	61
3.1	Infektiösität und Übertragbarkeit von AbMV, SiGMV/CR, SiGMV/Ho _{yv} und deren Pseudorekombinationen	61
3.2	Infektiösität und Übertragbarkeit der SiGMV/CR-Kapsidprotein-Chimäre	63
3.3	Infektiösität und Übertragbarkeit von pseudorekombinanten AbMV-CP-Mutanten	67
4	Diskussion	77
	Anhang	89
	Chemikalienliste	89
	Symbole für Aminosäuren	90
	Veröffentlichungen	91
	Abbildungsverzeichnis.....	104
	Tabellenverzeichnis.....	105
	Literaturverzeichnis	107
	Meine Hochschulprofessoren	119
	Danksagung	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Alanin
AAP	Akquisitionszeit (<i>acquisition access period</i>)
AbMV	<i>Abutilon mosaic virus</i> (im Text ist damit AbMV/WI gemeint)
AbMV/Hi	<i>Abutilon mosaic virus</i> aus Hawaii
AbMV/Is	<i>Abutilon mosaic virus</i> aus Israel
AbMV/WI	<i>Abutilon mosaic virus</i> von den Westindischen Inseln (=AbMV im Text)
ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>
bp / bps	Basenpaar (<i>basepair</i>) / Basenpaare (<i>basepairs</i>)
CDP	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'- (5'Chlor)Tricyclo[3.3.1.1. ^{3,7}]Dekan}-4-yl)-1-Phenylphosphat
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälbermagen (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
CP	Kapsidprotein (<i>coat protein</i>)
CsCl	Cäsiumchlorid
CSPD	3-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'- (5'Chlor)Tricyclo[3.3.1.1. ^{3,7}]Dekan}-4-yl)-Phenylphosphat
Δ	Differenz
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double stranded DNA</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Glycin
GroEL	Hitzeschock-Protein (Chaperon) von <i>E. coli</i>
H	Histidin
h	Stunde(n)
HCl	Hypochlorid (Salzsäure)
I	Isoleucin
IAP	Inokulationszeit (<i>inoculation access period</i>)
K	Lysin
kb	Kilobase; = 1 000 Basenpaare
kDa	Kilodalton
L	Leucin
M <Aminosäure>	Methionin
M <Einheit>	molar [mol/l]
max.	maximal

MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
min	Minute(n)
MP	<i>movement protein</i> (Transportprotein)
MpB GroEL	dem <i>E. coli</i> GroEL homologes Protein, gebildet von dem in <i>Myzus persicae</i> vorkommenden Endosymbiont <i>Buchnera</i> sp.
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NSP	<i>nuclear shuttle protein</i> (Kern-Transport-Protein)
ocDNA	<i>open circle DNA</i>
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potentia hydrogenii
PNK	Polynukleotidkinase
PSI	<i>pressure per square inch</i> (= 0,068948 bar)
Q	Glutamin
REn	<i>replication enhancer protein</i> (Replikations-Verstärker-Protein)
Rep	<i>replication associated protein</i> (Replikation-Assoziiertes Protein)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
scDNA	»supergeschraubte« DNA (<i>supercoiled DNA</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde(n)
SiGMV	<i>Sida golden mosaic virus</i>
SiGMV/CR	<i>Sida golden mosaic virus</i> aus Costa Rica
SiGMV/Ho _{yv}	<i>Sida golden mosaic virus</i> 'yellow vein'-Stamm aus Honduras
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
ssRNA	einzelsträngige RNA (<i>single stranded RNA</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TrAP	<i>transcriptional activator protein</i> (Transkription-Aktivator-Protein)
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
TYLCV/Sar	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> aus Sardinien
TYLCV/Is	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> aus Israel
U	Einheit (<i>unit</i>); Mengenangabe bei Enzymen
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen / Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Masse / Volumen (<i>weight per volume</i>)
WmCSV	<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>
WmCSV/Ir	<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i> aus dem Iran

ZUSAMMENFASSUNG

Geminiviren sind kleine, phytopathogene DNA-Viren. Ihr Genom besteht aus einer oder zwei Komponenten zirkulärer einzelsträngiger DNA mit einer Größe von 2,7 bis 3,0 kb, das in doppelt-ikosaedrische Partikel verpackt wird. Geminiviren kommen weltweit vor. Sie infizieren eine Vielzahl von Pflanzen, darunter viele Nutz- und Zierpflanzen, und verursachen große Schäden in den betroffenen Anbaugebieten. Geminiviren werden von Zikaden, Buckelzirpen und der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* (GENN.) übertragen. Die Übertragung erfolgt zirkulativ und nicht-propagativ. Aufgrund ihrer Genomorganisation und ihres Überträgerinsekts werden die Geminiviren in vier Gattungen unterteilt. Die Weiße Fliege *B. tabaci* ist der bislang einzige bekannte Vektor der Geminivirus-Gattung Begomovirus. Begomoviren besitzen in der Regel ein bipartites Genom (DNA A und B). Anhand von eng verwandten bipartiten Begomoviren aus Mittelamerika, wie des *Abutilon mosaic virus* (AbMV), des *Sida golden mosaic virus* aus Costa Rica (SiGMV/CR) und des *Sida golden mosaic virus* aus Honduras (SiGMV/Ho_{yv}) wurde die Übertragung durch ihren Vektor, die Weiße Fliege, untersucht. Das AbMV-Isolat ist nicht durch die Weiße Fliege übertragbar, während die beiden *Sida*-infizierenden Viren sehr effizient von *B. tabaci* übertragen werden. Diese drei Viren sind in der Lage, sogenannte pseudorekombinante Viren durch den Austausch von Genom-Komponenten zu bilden. Das pseudorekombinante Virus SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B ist übertragbar, während das reziproke pseudorekombinante Virus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B nicht übertragbar ist. Dies deutet darauf hin, dass die DNA B oder deren Genprodukte nicht in den Übertragungsprozess involviert ist / sind. Das pseudorekombinante Virus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B wurde jedoch wesentlich besser von der Weißen Fliege aufgenommen als AbMV oder SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B. Die DNA B-Genprodukte fördern also die Aufnahme viraler DNA.

Der Austausch des AbMV-Kapsidproteins gegen das des SiGMV/CR resultierte in einem übertragbaren chimären AbMV. Mutationen im AbMV-Kapsidprotein zeigten, dass der Austausch von zwei Aminosäuren an den Positionen 124 und 149 ausreichend ist, um eine Weiße Fliegen-übertragbare AbMV-Mutante herzustellen. Wurde zusätzlich zu diesen beiden Aminosäuren noch die Aminosäure an Position 174 ausgetauscht, so wurde diese AbMV-Mutante genauso effizient übertragen wie SiGMV/CR. Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass nicht ein kurzes Aminosäure-Motiv wie zum Beispiel das DAG-Motiv, das für die Übertragung von Potyviren durch Aphiden notwendig ist, die Übertragbarkeit von Begomoviren bestimmt, sondern eher die Zusammensetzung der Domäne zwischen den Aminosäuren 123 bis 174. Dabei ist der Abschnitt zwischen den Aminosäuren 123 bis 149 für eine Übertragung hinreichend, aber die gesamte Domäne ist für eine effiziente Übertragung verantwortlich.

SUMMARY

Geminiviruses are single-stranded DNA plant viruses with one or two genome components of 2.7 to 3.0kb in size, encapsidated in twinned (geminate) particles. These viruses have attracted considerable interest as pathogens attacking many economically important crops worldwide. Geminiviruses are transmitted in a circulative nonpropagative manner by whiteflies, leafhoppers, or treehoppers. Due to their genome organisation and their insect vector geminiviruses are divided into four genera. The whitefly species *Bemisia tabaci* (GENN.) is the most efficient vector for the begomovirus genus. The majority of members of this genus has a bipartite genome (DNAs A and B). The closely related bipartite begomoviruses from Central America *Abutilon mosaic virus* (AbMV), *Sida golden mosaic virus* originating from Costa Rica (SiGMV/CR) and *Sida golden mosaic virus* originating from Honduras (SiGMV/Ho_{yv}) were used to study the transmission by their insect vector. The AbMV isolate is deficient in transmission whereas the two *Sida*-infecting viruses are readily transmitted by *B. tabaci*. These three viruses are able to form pseudorecombinant viruses by exchange of genomic components. The pseudorecombinant virus SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B was transmitted by the whitefly *B. tabaci* whereas the reciprocal pseudorecombinant virus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B was not transmitted, indicating that DNA B or their encoded proteins are not involved in the transmission process. However, the pseudorecombinant virus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B was much better acquired than AbMV itself or SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B, indicating that DNA B or DNA B gene products enhance acquisition of viral DNA.

Exchange of AbMV coat protein with that of SiGMV/CR resulted in a transmissible chimeric AbMV. Mutagenesis of AbMV coat protein showed that exchange of two amino acids, at position 124 and 149, is sufficient to render a

whitefly-transmissible AbMV mutant. However, when in addition to amino acids 124 and 149 amino acid 174 was altered, full transmissibility of AbMV was achieved. These results indicate that not a short motif, such as the amino acid triplet, aspartate-alanine-glycine (DAG), involved in aphid transmission of potyviruses, determines transmissibility of begomoviruses by *B. tabaci*, but rather the composition of the CP domain from amino acid 123 to 149, as minimal transmission domain, and from 123 to 174 for efficient transmission.

1 EINLEITUNG

1.1 GEMINIVIREN

Eine große Anzahl von mono- als auch dikotylen Pflanzenarten ist anfällig für den Befall durch Geminiviren. Geminiviren verdanken ihren Namen dem charakteristischen Aussehen ihrer Partikel, denn sie bilden hantelförmige Zwillingspartikel aus. Diese doppelt-ikosaedrischen Viruspartikel bestehen aus 22 Untereinheiten, wobei jede Untereinheit wiederum aus fünf Kapsidproteinen aufgebaut ist (Harrison, 1985). Das Genom der Geminiviren besteht entweder aus einem oder zwei kleinen, zirkulären Einzelstrang-DNA (ssDNA) Molekülen mit einer Größe von 2,5 bis 3,0kb (Harrison, 1985; Lazarowitz, 1992; Timmermans *et al.*, 1994). Geminiviren kommen weltweit vor, hauptsächlich in den Tropen und Subtropen. Sie sind auch in gemäßigten Klimaten wie z.B. im Mittelmeergebiet und in Gewächshäusern Nordeuropas anzutreffen. Der Grad ihrer Ausbreitung hängt wesentlich von dem Vorhandensein der sie übertragenden Insektenvektoren ab. Unter den Pflanzen, die von Geminiviren befallen werden, befinden sich auch zahlreiche landwirtschaftlich genutzte Pflanze, weshalb der durch den Geminiviren-Befall entstandene Schaden immens sein kann (Brown & Bird, 1992; Thresh *et al.*, 1994; Polston & Anderson, 1997; Moffat, 1999; Rybicki & Pietersen, 1999). So wurden durch Geminiviren in der Anbausaison 1993/94 bis zu 95% der Tomatenernte in der Dominikanischen Republik zerstört (Polston & Anderson, 1997), und in Florida betrug der Schaden an der Tomatenernte in der Anbausaison 1991/92 über 140 Millionen Dollar (Moffat, 1999).

Aufgrund der Genomorganisation und dem Überträgerinsekt werden die Geminiviren (Familie *Geminiviridae*) in vier Gattungen unterteilt (Rybicki, *et al.*, 2000) (Tabelle 1.1). Die in dieser Arbeit untersuchten Viren AbMV (*Abutilon mosaic virus*) und SiGMV/CR bzw. SiGMV/Ho_{yv} (*Sida golden mosaic virus* aus Costa Rica bzw. der *yellow vein*-Stamm aus Honduras) gehören zu den Begomoviren (vgl. 1.1.1).

Tabelle 1.1: Einteilung der Geminiviren

Genus	Genomorganisation	Wirtspflanzen	Vektor(en)
<i>Mastrevirus</i>	monopartit	i.d.R. Monokotyle	<i>Cicadellidae</i>
<i>Curtovirus</i>	monopartit	Dikotyle	<i>Cicadellidae</i>
<i>Topocuvirus</i>	monopartit	Dikotyle	<i>Membracidae</i>
<i>Begomovirus</i>	i. d. R. bipartit	Dikotyle	<i>Bemisia tabaci</i>

1.1.1 BEGOMOVIREN

Begomoviren besitzen mit Ausnahme einiger Virus-Isolate aus dem Mittelmeerraum (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV); Navot *et al.*, 1991) und Australien (*Tomato leaf curl virus* (TLCV); Dry *et al.*, 1993) ein bipartites Genom, bestehend aus der DNA A und der DNA B (Abbildung 1-1). Die Gattung verdankt ihren Namen dem *Bean golden mosaic virus* (BGMV; Howarth, *et al.*, 1985). Begomoviren infizieren dikotyle Pflanzen und werden von der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* (GENNADIUS) übertragen (vgl. 1.3.4). Beide DNA-Komponenten bipartiter Begomoviren sind notwendig für eine effiziente Infektion (Padidam *et al.*, 1995; Sung & Coutts, 1995a). Die DNA A enthält alle Informationen, die notwendig sind für die Replikation und den Zusammenbau der Viruspartikel. Die Genprodukte der DNA B spielen bei der Ausbreitung der Viren innerhalb der Pflanze und bei der Symptomausprägung eine Rolle. Die DNA B kann nur in Gegenwart der DNA A repliziert werden. Transiente Replikationsstudien in Blattscheiben oder Protoplasten haben gezeigt, dass die DNA A im Gegensatz zur DNA B autonom repliziert werden kann (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Begomoviren besitzen auf der DNA A fünf offene Leserahmen (ORF), wobei vier auf dem komplementären Strang vorhanden sind und einer auf dem Virus-Strang (Abbildung 1-1). Die DNA B enthält zwei ORF, je einen auf dem komplementären und viralen Strang (Abbildung 1-1). Die gemeinsame Region (*common region*, CR, Abbildung 1-1) ist der einzige Sequenzabschnitt, der zwischen den beiden DNA-Komponenten konserviert ist. Ihr werden regulatorische Funktionen zugeschrieben. So enthält

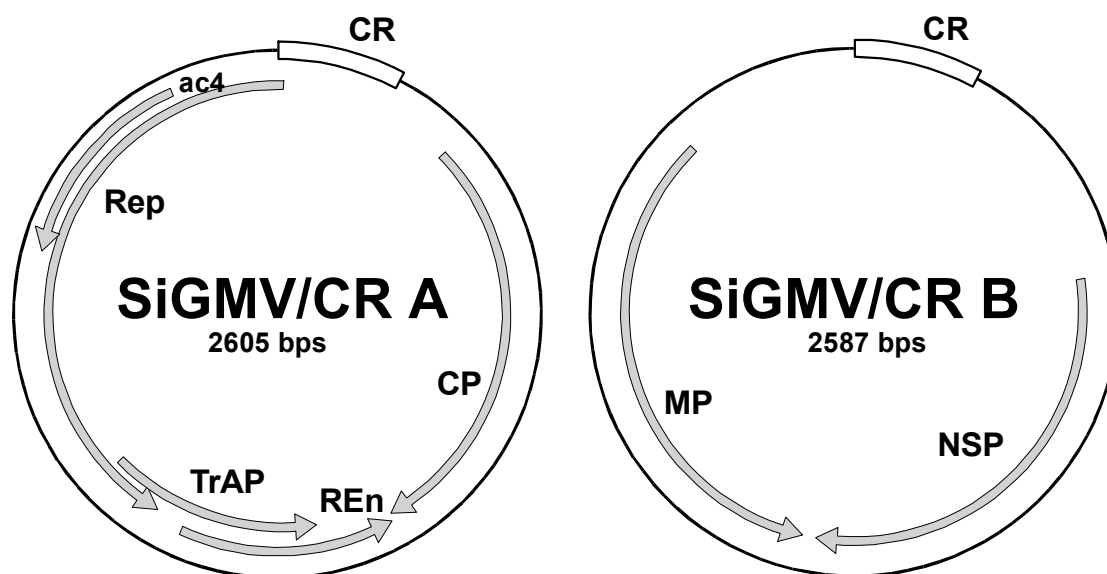


Abbildung 1-1: Genomorganisation des bipartiten Begomovirus SiGMV/CR. Pfeile repräsentieren Offene Leserahmen (ORF) und deren Orientierung. Beschreibung der Funktionen der ORF im Text. Die *common region* (CR) enthält den Replikationsursprung.

sie sowohl den Ursprung der Replikation, als auch Promotorelemente für die bidirektionale Transkription (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Die Funktion(en) einiger Genprodukte sind bekannt:

Das **Rep**-Protein (*replication associated protein*) (Abbildung 1-1) ist essentiell für die Replikation von Geminiviren (Briddon *et al.*, 1989; Sung & Coutts, 1995a; Liu *et al.*, 1998). Rep vermittelt die virus-spezifische Erkennung des eigenen Replikationsursprungs und initiiert durch Einzelstrangspaltung die plus-Strang DNA-Synthese (Frischmuth, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999), wobei die DNA-Replikation nach dem *rolling circle*-Mechanismus erfolgt (Saunders *et al.*, 1991). Die Interaktion von Rep-Oligomeren und REn verstärkt die Replikation (Settlage *et al.*, 1996; Orozco *et al.*, 1997). Biochemische Untersuchungen zeigten, dass Rep Restriktions-, Ligations- und ATPase-Aktivitäten besitzt (Frischmuth 1999, Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

Für die Expression des Kapsidproteins und des NSP's (*nuclear shuttle*

protein) ist das **TrAP**-Protein (*transcriptional activator protein*) (Abbildung 1-1) notwendig (Sunter & Bisaro, 1991; Sunter *et al.*, 1994; Saunders & Stanley, 1995).

Die Interaktion von **REn** (*replication enhancer protein*) (Abbildung 1-1) mit Rep verstärkt die Replikation und moduliert so die Funktion von Rep (Replikation, Repression) (Settlage *et al.*, 1996).

Mutationen im **AC4**-Gen (Abbildung 1-1) scheinen keine Auswirkungen auf den Phänotyp zu haben (Sung & Coutts, 1995a; Pooma & Petty, 1996).

Das Kapsidprotein (**CP**, *coat protein*) (Abbildung 1-1) ist das häufigste virale Protein, das in infizierten Zellen gebildet wird (Morris-Krsinich *et al.*, 1985; Townsend *et al.*, 1985). Das CP bipartiter Begomoviren ist weder essentiell für die Replikation, die systemische Ausbreitung, noch für die Symptombildung (Stanley & Townsend, 1986; Gardiner *et al.*, 1988). Dagegen ist das Kapsidprotein absolut notwendig für die Übertragung durch den Vektor. Zum einen schützt das Kapsidprotein die Virus-DNA während der Übertragung, zum anderen bestimmt das CP, durch welches Insekt das Virus übertragen wird. *African cassava mosaic virus* (ACMV, Begomovirus) wird durch *B. tabaci* übertragen, *Beet curly top virus* (BCTV, Curtovirus) durch die Zikade *Circulifer tenellus* (BAKER). Der Austausch des ACMV-Kapsidproteins durch das von BCTV resultierte in einer durch *C. tenellus* übertragbaren ACMV-BCTV:CP-Chimäre (Briddon *et al.*, 1990). Veränderungen wie Mutationen oder Deletionen im CP können zu einem Verlust der Übertragbarkeit führen (Azzam *et al.*, 1994). Wird das CP-Gen des nicht mehr Weiße Fliege-übertragbaren AbMV durch das eines übertragbaren Virus (SiGMV/CR) ersetzt, so ist das chimäre AbMV durch *B. tabaci* übertragbar (Höfer *et al.*, 1997a).

Die Movementproteine **MP** (*movement protein*) und **NSP** (*nuclear shuttle protein*) (Abbildung 1-1) werden von der DNA B kodiert. MP wird für die Ausbildung von Symptomen gebraucht (von Arnim & Stanley, 1992; Pascal *et al.*, 1993). Beide Movementproteine sind für die systemische Ausbreitung der Viren in der Pflanze (Zell-zu-Zell-Transport und Transport über längere Strecken (via Phloem)) notwendig (von Arnim *et al.*, 1993; Lazarowitz, 1999; Lazarowitz & Beachy 1999).

1.1.2 PSEUDOREKOMBINATION VON BEGOMOVIREN

Unter einer Pseudorekombination bipartiter Begomoviren versteht man eine Mischinfektion bestehend aus der DNA A-Komponente eines Begomovirus und der DNA B-Komponente eines anderen Begomovirus (Abbildung 1-2). Ursprünglich ging man davon aus, dass lebensfähige Pseudorekombinationen nur zwischen sehr nahe verwandten Viren möglich sind, aufgrund der Tatsache, dass die heterologe DNA B *trans*-repliziert werden muss (Frischmuth *et al.*, 1993; Sung & Coutts, 1995b). Jedoch wurden in letzter Zeit immer mehr Pseudorekombinationen zwischen distinkten Geminiviren beschrieben (Gilbertson *et al.*, 1993; Höfer *et al.*, 1997c; Frischmuth *et al.*, 1997; Unseld *et al.*, 2000).

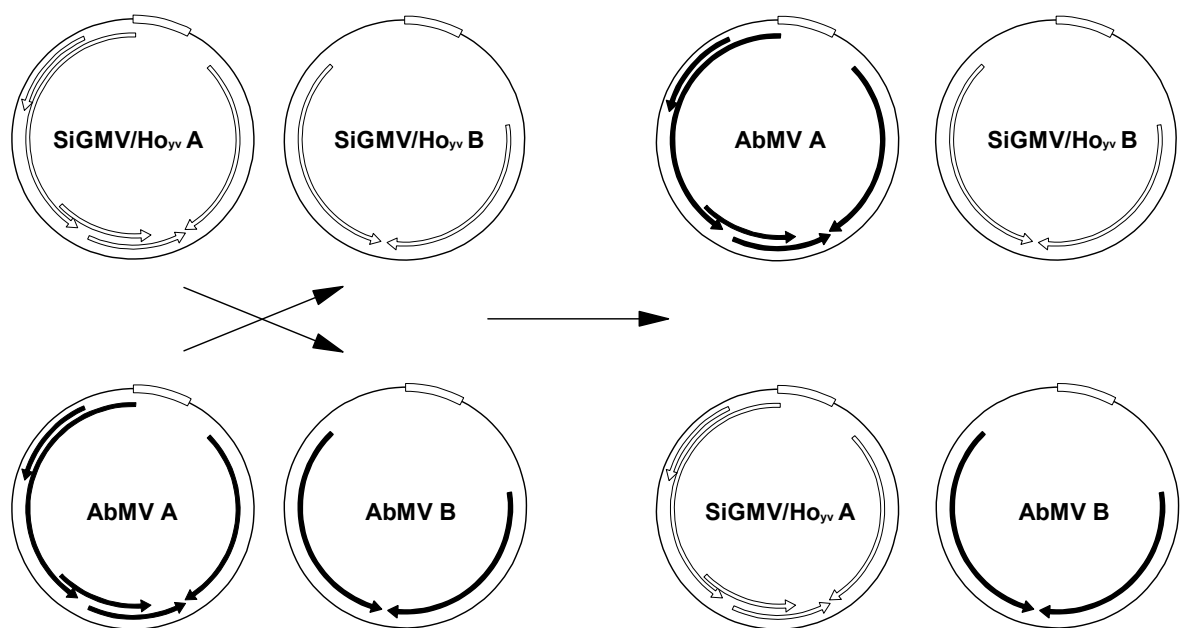


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Pseudorekombination bestehend aus den Genomkomponenten von AbMV und SiGMV/Ho_{yv}.

1.2 DIE WEIßE FLIEGE *BEMISIA TABACI*

Weißer Fliegen sind kleine (1–3 mm), Pflanzensaft-saugende Insekten, deren adulte Tiere in ihrem äußeren Erscheinungsbild Motten ähneln, weshalb sie auch als Mottenschildläuse bezeichnet werden (Martin *et al.*, 2000). Der Körper der adulten Tiere ist mit mehlartigem Wachsstaub bedeckt – daher der Name »Weißer Fliege« (Hennig, 1968) (Abbildung 1-3). Systematisch werden die Weißen Fliegen in die Familie Aleyrodidae (Mottenschildläuse), Unterordnung Aleyrodina, Ordnung Homoptera (Pflanzensauger) eingeordnet (Hoffmann *et al.*, 1994). Die Art *B. tabaci* stellt einen Spezies-Komplex dar (Brown *et al.*, 1995a, 2001), d.h. unterschiedliche Populationen von *B. tabaci* sind morphologisch identisch. Die einzelnen Biotypen werden heute hauptsächlich anhand ihres Esterase-Musters unterschieden (Bedford *et al.*, 1994a; Brown *et al.*, 1995b). Ende der 80er/Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts breitete sich eine äußerst polyphage und sehr fruchtbare Variante von *B. tabaci*, der sogenannte B-Biotyp, in der ganzen Welt aus und verdrängte dort oft die Nicht-B-Biotyp-Populationen (Costa & Brown, 1991; Perring *et al.*, 1993; Bedford *et al.*, 1994b).



Abbildung 1-3: Weiße Fliege *Bemisia tabaci* (GENN.).
Adultes Tier beim Saugen.
Foto: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. I. Bedford.

Die Eiablage erfolgt kreisförmig auf der Blattunterseite. Die postembryonale Entwicklung wird als Allometabolie bezeichnet (Hoffmann *et al.*, 1994, Dettner & Peters, 1999). Nur das erste Larvenstadium ist beweglich, die drei darauffolgenden sind sessil. Das vierte und letzte Larvenstadium wird auch als »Puparium« bezeichnet. Hier erfolgt die Umwandlung zur Imago (Hoffmann *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2000).

Weißer Fliegen sind wärmeliebend und haben dementsprechend ihr Hauptverbreitungsgebiet in den Tropen und Subtropen. In Europa kommen sie hauptsächlich im Mittelmeerraum und in Gewächshäusern vor (Hoffmann *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2000).

Einige Biotypen von *B. tabaci* sind extrem polyphag. Sie wurden auf zahllosen verschiedenen Pflanzenspezies gefunden (Brown *et al.*, 1995a; Martin *et al.*, 2000), darunter viele Kultur- und Zierpflanzen. Weiße Fliegen saugen mittels ihrer stechend-saugenden Mundwerkzeuge im Phloem. Die dadurch entstehenden Schadwirkungen an den Pflanzen können komplex sein. Zum einen werden die Pflanzen durch den Entzug von Assimilaten geschädigt, zum anderen injizieren die Weißen Fliegen während des Saugens phytotoxischen Speichel in die Pflanze. Desweiteren produzieren die Weißen Fliegen große Mengen von Honigtau, der die Ansiedlung von Rußtaupilzen begünstigt (Hoffmann *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist *B. tabaci* ein Überträger von Viruskrankheiten. *B. tabaci* überträgt Gemini-, Carla-, Poty-, Clostero- und Nepoviren (Markham *et al.*, 1994), wobei die Geminiviren die größte Gruppe der übertragenen Viren darstellen. Viele dieser Geminiviren verursachen hohe wirtschaftliche Schäden an Nutzpflanzen wie zum Beispiel an Tomate in Süd-Europa (Moriones *et al.*, 1993; Noris *et al.*, 1994; Bedford *et al.*, 1998), im Nahen Osten (Czosnek, *et al.*, 1988), in Asien (Rochester, *et al.*, 1990), in Australien (Dry, *et al.*, 1993) und in Nord-, Mittel- und Südamerika (Brown & Bird 1992); an Maniok in Afrika (Liu *et al.*, 1997) und Indien (Mathew & Muniyappa, 1992). Geminiviren lassen sich nicht direkt bekämpfen, sondern nur indirekt, indem die sie übertragenden Insekten bekämpft werden. Da der Einsatz von Insektiziden zu resistenten *B. tabaci*-Stämmen führte, versucht man nun verstärkt die Weiße Fliege durch biologische Schädlingsbekämpfungs- (Polaszek & Viggiani, 2001) und IPM (*Integrated Pest Management*)-Maßnahmen

(Ellsworth & Gerling, 2001) unter Kontrolle zu halten. Zum Einsatz kommen hier natürliche Feinde der Weißen Fliege wie Insekten-Prädatoren und Parasitoiden (z. B. *Eretmocerus*) (Kirk *et al.*, 2000). Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Anwendung von *Wolbachia*-Bakterien in der Weiße Fliegen-Bekämpfung (Bourtzis *et al.*, 2001).

1.3 ÜBERTRAGUNG VON VIREN DURCH INSEKTEN

Pflanzenviren können auf unterschiedliche Arten übertragen werden. Neben der vektorfreien Virusübertragung durch Pfropfung, vegetative Vermehrung von Pflanzen bzw. durch Samen und Pollen, werden viele Pflanzenviren durch Vektoren verbreitet. Zu den tierischen Vektoren zählen Arthropoden und Nematoden, zu den pflanzlichen parasitische Blütenpflanzen und Pilze (Hoffmann *et al.*, 1994). Mehr als 70% der phytopathogenen Viren werden von Arthropoden übertragen (van den Heuvel *et al.*, 1999), wobei die Insekten, vor allem jene mit kauenden (z. B. Käfer, Heuschrecken) bzw. stechend-saugenden Mundwerkzeugen (z. B. Aphiden, Mottenschildläuse), wiederum die größte Überträgergruppe darstellen. Nach dem Verhältnis zu ihren Überträgerinsekten lassen sich die durch Vektoren übertragbaren Pflanzenviren in zwei Gruppen unterteilen, in die nicht-zirkulativen und in die zirkulativen Viren (Matthews, 1991; Hoffmann *et al.*, 1994; Schuster, 1998).

Bei **nicht-zirkulativen Viren** findet keine Aufnahme der Viren in das Innere der Insekten (Haemocoel, Speicheldrüsen) statt. Eine erfolgreiche Übertragung ist abhängig von der Fähigkeit der Viren, mit der Cuticula der Mundwerkzeuge und des Vorderdarms zu assoziieren (Gray, 1996). Hierbei werden zwei Übertragungstypen unterschieden, nämlich der **nicht-persistente Übertragungstyp** (*stylet-borne viruses*), bei dem die Viren sofort nach der Aufnahme durch den Vektor auf neue Wirtspflanzen übertragen werden können. Für die Aufnahme der Viren, meist aus äußeren Zellschichten, sind z. T. nur wenige Sekunden Saugen nötig. Die Vektoren sind nur eine kurze Zeit (einige Minuten) infektiös. Diese Viren sind meist leicht mechanisch übertragbar. (Matthews, 1991; Hoffmann *et al.*, 1994; Schuster, 1998; Power, 2000). Bsp.: Übertragung von Poty- und Caulimoviren

durch die Blattlaus *Myzus persicae*. Beim **semi-persistenten Übertragungstyp** (*foregut-borne viruses*) werden Viren in den Vorderdarm aufgenommen (Power, 2000). Die Aufnahme der Viren, meist aus dem Phloem, erfolgt hier nach etwas längerer Zeit. Die Latenzzeit, d.h. die Zeit zwischen Virusaufnahme und -abgabe, beträgt zwischen einigen Stunden und drei Tagen. Die Infektiosität geht mit der Häutung der Insekten verloren (Matthews, 1991; Hoffmann *et al.*, 1994). Bsp.: Übertragung von Closteroviren durch Aphiden.

Bei den **zirkulativen Viren** erfolgt eine Aufnahme der Viren aus dem Darm in das Innere des Insekts. Die Akquisition der Viren (aus dem Phloem) erfordert lange Saugzeiten zwischen zehn und 60 Minuten. Während der Latenzzeit zirkulieren die Viren im Insekt, d.h. es erfolgt eine Translokation der Viren aus dem Darm in das Haemocoel und von dort in die Speicheldrüsen. Die Virusabgabe geschieht während des Saugens mit dem Speichel. Die Vektoren sind nach der Aufnahme der Viren für längere Zeit, oft bis an deren Lebensende, infektiös. Bei zirkulativen Viren wird ferner zwischen propagativer und nicht-propagativer Übertragung unterschieden. Bei der **nicht-propagativen Übertragung** findet keine Vermehrung des Virus im Vektor statt. Die Latenzzeit beträgt hier weniger als einen Tag, während sie bei der **propagativen Übertragung** ein bis zwei Wochen dauern kann. Hier replizieren die Viren in bestimmten Organen des Vektors, bevor sie über die Haemolymphe in die Speicheldrüsen gelangen. Die Infektiosität des Insekts geht mit der Häutung nicht verloren. Gelegentlich werden Viren auch an die Nachkommen der Insekten über das Ei weitergegeben (**transovariale Übertragung**) (Matthews, 1991; Hoffmann *et al.*, 1994; Gray, 1996; Schuster, 1998; Power, 2000).

Begomoviren werden zirkulativ nicht-propagativ von der Weißen Fliege übertragen (Harrison, 1985; Boulton & Markham, 1986) (vgl. Kapitel 1.3.4).

Im Folgenden werden die Übertragungsmechanismen der Poty-, Caulimo-, Luteo- und Geminiviren näher betrachtet:

1.3.1 ÜBERTRAGUNG VON POTYVIREN

Potyviren bilden flexible, fadenförmige Partikel. Ihr Genom besteht aus einzelsträngiger RNA (~10 kb), die zunächst in ein einziges Polyprotein translatiert wird, bevor daraus die funktionellen Einzelproteine durch proteolytische Spaltung gebildet werden (Matthews, 1991; Pirone & Blanc, 1996). Potyviren verursachen zahlreiche zum Teil schwere Krankheiten in Pflanzen, darunter viele Nutzpflanzen. Sie werden nicht-zirkulativ und nicht-persistent von Aphiden übertragen. Für die Übertragung durch Aphiden werden zwei virale Proteine, das Kapsidprotein und ein nicht-strukturelles Protein, die Helfer-Komponente (*helper component (HC)*) benötigt (Gray, 1996). Die Helfer-Komponente, die vor oder gleichzeitig mit dem Virus aufgenommen werden muss, besitzt Bindestellen sowohl für das Kapsidprotein als auch für Bestandteile des Nahrungskanals der Aphiden. Die Helfer-Komponente bildet also eine »Brücke« zwischen dem Virion und der Nahrungskanalwand (Pirone & Blanc, 1996; van den Heuvel *et al.*, 1999). Ein konserviertes Aminosäure-Triplett Aspartat-Alanin-Glycin (DAG) im Aminoterminus des Kapsidproteins ist essentiell für die Übertragung der Potyviren (Atreya *et al.*, 1990, 1995; Gal-On *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1997), wobei der Kontext, in dem dieses DAG-Motiv steht, ebenfalls einen Einfluss auf die Übertragbarkeit hat (López-Moya *et al.*, 1999).

1.3.2 ÜBERTRAGUNG VON CAULIMOVIREN

Caulimoviren sind phytopathogene Pararetroviren. Sie besitzen isometrische Partikel. Ihr Genom besteht aus einer zirkulären doppelsträngigen DNA mit einer Größe von ~8,0 kb. Die Übertragung der Caulimoviren erfolgt nicht-zirkulativ, nicht-persistent durch Aphiden. Durch Mutationsanalysen wurde das Gen II-Produkt des *Cauliflower mosaic virus (CaMV)* als Helfer-Komponente identifiziert. Dieses Gen II-Produkt, auch Aphiden-Übertragungs-Faktor (*aphid transmission factor (ATF)*) genannt, ist in die Übertragung von Caulimoviren durch Aphiden involviert (Rothnie *et al.*, 1994) und akkumuliert in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) in infizierten Zellen (Espinoza *et al.*, 1991). Es besitzt wahrscheinlich zwei funktionelle Domänen, wovon eine mit dem Viruspartikel, die andere mit bestimmten Bindestellen im Nahrungskanal der Aphiden interagiert

(Blanc *et al.*, 1993). Man vermutet, dass ATF eine ähnliche Funktion hat wie die Helfer-Komponente der Potyviren (Schmidt *et al.*, 1994; Pirone & Blanc, 1996).

1.3.3 ÜBERTRAGUNG VON LUTEOVIREN

Luteoviren sind Pflanzenviren mit einem plus-Strang ssRNA Genom mit einer Größe von ~6kb, das in kleine isometrische Partikel verpackt wird. In ihren Wirtspflanzen sind Luteoviren auf das Phloem beschränkt (Martin *et al.*, 1990). Die Übertragung der Luteoviren durch Aphiden erfolgt zirkulativ, persistent und nicht-propagativ, wobei das Kapsidprotein maßgeblich daran beteiligt ist (Gildow, 1987). Die Aufnahme der Luteoviren erfolgt während des Saugens der Aphiden mit dem Pflanzensaft. Über den Vorder- und Mitteldarm gelangen die Viren schließlich in den Hinterdarm. Hier werden sie über eine Rezeptor-vermittelte Endocytose und Exocytose durch die Darmwand in das Haemocoel transportiert (Gildow, 1987, 1993). Viren, die nicht mit spezifischen Rezeptoren in der Darmwand interagieren können, werden mit dem Honigtau ausgeschieden (Gildow, 1993). Die Hinterdarmwand ist also die erste Barriere, die Luteoviren auf ihrem Weg durch ihren Vektor überwinden müssen, wobei diese Barriere von den meisten Luteoviren leicht überwunden wird (Gildow, 1993). Die Viren werden durch die Haemolymph aus dem Abdomen der Tiere in den Kopf zu den akzessorischen Speicheldrüsen transportiert. Hier müssen die Viren zwei Hindernisse überwinden: erstens die Basallamina, die die akzessorischen Speicheldrüsen umgibt, und zweitens das Plasmalemm der akzessorischen Speicheldrüsen, wobei der Transport durch das Plasmalemm in das Innere der Speicheldrüse durch Endo- und Exocytose erfolgt (Gildow & Gray, 1993, Gray, 1996). Die Viren können nun mit dem Speichel in Wirtspflanzen injiziert werden, während die Aphiden im Phloem saugen. Es wird angenommen, dass die Vektor-Spezifität auf der Ebene der akzessorischen Speicheldrüsen bestimmt wird (Gildow, 1987, Gildow & Gray, 1993).

Der Hauptbestandteil des Luteovirus-Kapsids ist das Kapsidprotein (22kDa). Im Kapsid findet man noch ein weiteres Protein mit der Masse 74kDa, das sogenannte *read through*-Protein (RTP). Dieses Protein entsteht als Kapsidprotein-ORF 5-Fusionsprotein, wenn das Stopp-Codon zwischen diesen

beiden ORF »durchgelesen« wird (Morozov & Solovyev, 1999). Brault *et al.* (1995, 2000) konnten zeigen, dass das RTP in die Übertragung von Luteoviren durch Aphiden involviert ist.

Die Haemolymphe fungiert als Reservoir, in dem Virionen in einer infektiösen Form während der Lebenszeit der Aphiden zurückgehalten werden. Symbionin, ein Protein, das von einem endosymbiontischen Bakterium (*Buchnera* sp.) produziert und in die Haemolymphe abgegeben wird, scheint essentiell für die Übertragung von Luteoviren zu sein (van den Heuvel *et al.*, 1994). Symbionin ist mit dem *Escherichia coli-heat shock*-Protein GroEL sehr eng verwandt. Eine Interaktion von *Buchnera*-GroEL mit dem RTP konnte nachgewiesen werden, wodurch die Viruspartikel einem proteolytischen Abbau in der Haemolymphe entgehen (van den Heuvel *et al.* 1997; Hogenhout *et al.*, 1998).

1.3.4 ÜBERTRAGUNG VON GEMINIVIREN

Geminiviren (vgl. Kapitel 1.1) werden zirkulativ (Harrison, 1985) übertragen, wobei die einzelnen Genera durch unterschiedliche Insekten übertragen werden (Tabelle 1.1). Vertreter der Mastre- und Curtoviren werden von Zikaden der Familie *Cicadellidae* übertragen (Harrison, 1985; Matthews, 1991). Die Übertragung des bislang einzigen bekannten Vertreters der Topocuviren erfolgt durch die Buckelzirpe *Micrutalis malleifera* (FOWLER) (Fam. *Membracidae*) (Briddon *et al.*, 1996). Begomoviren werden von der Weißen Fliege *B. tabaci* übertragen (Harrison, 1985; Matthews, 1991). Essentiell für die Übertragung von Geminiviren ist das Kapsidprotein (vgl. 1.1.1).

Bislang ist nur sehr wenig bekannt über die Virus-Vektor-Beziehungen. Der genaue Weg der Begomoviren durch die Weiße Fliege und die zellulären und molekularen Prozesse, die die Übertragung durch *B. tabaci* ermöglichen, sind noch weitgehend unbekannt. Man nimmt jedoch einen ähnlichen Übertragungsmechanismus wie für die Luteoviren (1.3.3) an. Viruspartikel werden mit dem Phloemsaft über die Stilette während des Saugens aufgenommen und gelangen über den Oesophagus und die Filterkammer in den Mitteldarm. Immunolokalisierungs-Experimente zeigten, dass die Filterkammer und der vordere Teil des Mitteldarms die Kompartimente sind, in denen die Viren durch die Darmwand

in das Haemocoel transportiert werden (Hunter *et al.*, 1998). Durch das Haemocoel gelangen die Virionen zu den Speicheldrüsen und werden schließlich in diese transportiert, von wo aus sie mit dem Speichel während des Saugens abgegeben werden. Durch PCR- bzw. *immunocapture PCR*-Analysen konnte virale DNA bzw. das Kapsidprotein im Kopf, im Mitteldarm, im Haemocoel und in den Speicheldrüsen von Weißen Fliegen nachgewiesen werden (Rosell *et al.*, 1999; Ghanim *et al.*, 2001).

Nahe verwandt mit *B. tabaci* ist die Gewächshaus Weiße Fliege *Trialeurodes vaporariorum* (WESTWOOD). *T. vaporariorum* saugt ebenfalls im Phloem und besitzt ein ähnliches Wirtspflanzenspektrum wie *B. tabaci*. Dennoch ist *T. vaporariorum* kein Vektor von Begomoviren. *T. vaporariorum* kann zwar Begomoviren aufnehmen, jedoch nicht übertragen. Virale DNA wurde in *T. vaporariorum* im Darm und im Honigtau nicht aber in der Haemolymphe und im Speichel detektiert (Rosell *et al.*, 1999). Einige Begomoviren wie z. B. *Abutilon mosaic virus* von den Westindischen Inseln, aus Hawaii und Israel oder *Honey-suckle yellow vein mosaic virus* werden zwar von *B. tabaci* aufgenommen, aber nicht übertragen (Bedford *et al.*, 1994a; Wu *et al.*, 1996; Höfer *et al.*, 1997a; Morin *et al.*, 2000). Morin und Kollegen (2000) konnten AbMV (aus Israel) zwar im Mitteldarm, aber nicht in der Haemolymphe und in den Speicheldrüsen von *B. tabaci* nachweisen. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass der kritische Schritt für die Übertragung, im Gegensatz zu den Luteoviren, der Transport der Begomoviren aus dem Darm in das Haemocoel ist.

Die Natur der Begomovirus-Übertragung ist in Bezug auf zeitliche Parameter gut charakterisiert. Die minimale Akquisitions- (*acquisition access period*, AAP) und Inokulationszeit (*inoculation access period*, IAP) beträgt ungefähr zehn bis 20 Minuten (Ghanim *et al.*, 2001). Die Übertragungsrate nimmt aber mit längeren AAP und IAP zu. Die Zeit, die ein Virus benötigt, um den Weg im Vektor zurückzulegen, also von der Aufnahme bis zur Abgabe (Latenzzeit) kann zwischen acht bis 24 Stunden betragen (Ghanim *et al.*, 2001). Weiße Fliegen, die einmal Begomoviren aufgenommen haben, sind bis an ihr Lebensende infektiös (Rubinstein & Czosnek, 1997).

Dubern (1994) konnte zeigen, dass alle vier Larvenstadien von *B. tabaci* infektiös sind, wenn sie auf infizierten Pflanzen gehalten werden. Die Larven übertragen ACMV, wenn sie von infizierten auf nicht-infizierte Pflanzen transferiert wurden.

Die Übertragung der Geminiviren kann ferner als nicht-propagativ (Boulton & Markham, 1986) charakterisiert werden. Eine Weitergabe von Begomoviren über das Ei (transovariale Übertragung) an die Nachkommen, wurde bislang nur einmal beobachtet (Ghanim *et al.*, 1998).

Weißer Fliegen besitzen wie andere Vertreter der Homoptera endosymbiontische Bakterien in spezialisierten Zellen, den Mycetocyten (Buchner, 1965). Ein von diesen Bakterien gebildetes Protein (*B. tabaci* GroEL) weist einen sehr hohen Grad an Homologie mit dem *E. coli* GroEL auf und ist in der Haemolymphe, aber nicht im Verdauungstrakt der Weißen Fliege nachweisbar (Morin *et al.*, 2000). Übertragungsversuche mit TYLCV/Is haben gezeigt, dass die Übertragungsrate um mehr als 80% gesenkt wird, wenn Weiße Fliegen vor der Akquisitionszeit mit einem *Buchnera* GroEL-Antiserum gefüttert wurden (Morin *et al.*, 1999). Eine Interaktion zwischen dem Kapsidprotein von TYLCV/Is bzw. AbMV/Is mit dem *B. tabaci* GroEL konnte nachgewiesen werden (Morin *et al.*, 2000). Morin und Kollegen (1999, 2000) schlugen daher vor, dass Virionen, die die Haemolymphe erreichen und sich auf dem Weg zu den Speicheldrüsen befinden, mit dem *B. tabaci* GroEL interagieren und so geschützt sind vor einem proteolytischen Abbau.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN

Die verwendeten Chemikalien wurden in der Regel von namhaften Herstellern wie Carl Roth, Karlsruhe; Merck, Darmstadt und Sigma, Deisenhofen, bezogen. In der Regel wurde jeweils der Reinheitsgrad »pro analysi« (p.a.) oder höher verwendet. Eine Liste sämtlicher verwendeter Chemikalien befindet sich im Anhang (Seite 89).

Das verwendete demineralisierte Wasser stammte aus einer Nanopore (Barnsted)-Wasseraufbereitungsanlage (wird im Folgenden als Wasser oder H₂O bezeichnet).

2.2 BAKTERIENSTÄMME, INFEKTIÖSE VIRUSKLONE UND PLASMIDE

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

Escherichia coli K12 JM83 (λ^- , ara Δ (pro-lac) rpsL thi phi 80 d lacZ Δ M15 λ^- strA)

Agrobacterium tumefaciens LBA4404

Folgendes Plasmid wurde verwendet:

pBluescript KS+ (2961 bp, f1(+)-origin, ColE1, LacZ, MCS, Amp^R); wurde von der Firma Stratagene, Heidelberg / Deutschland bezogen.

Infektiöse Klone von *Abutilon mosaic virus* von den Westindischen Inseln (AbMV/WI) (Frischmuth *et al.*, 1990) (wird im Folgenden als *Abutilon mosaic virus* (AbMV) bezeichnet), *Sida golden mosaic virus* / Costa Rica (SiGMV/CR) (Höfer *et al.*, 1997b) und *Sida golden mosaic virus* / Honduras yellow vein-Stamm (SiGMV/Ho_{yy}) (Frischmuth *et al.*, 1997), wurden mir freundlicherweise von P. Höfer und T. Frischmuth zur Verfügung gestellt.

2.3 PFLANZENMATERIAL

Folgende Pflanzen wurden für Infektiositätstests eingesetzt bzw. in Übertragungsversuchen verwendet:

- *Hibiscus rosa-sinensis*, L.
- *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker bzw. Kondine Red, MILL.
- *Nicotiana benthamiana*, DOMIN
- *Nicotiana tabacum* cv. Samsun nn, L.
- *Sida rhombifolia*, L.

2.4 ENZYME

- Alkalische Phosphatase (CIAP), Gibco BRL, Karlsruhe / Deutschland
- Klenow-Enzym, Boehringer Mannheim, Mannheim / Deutschland
- Lysozym, Carl Roth GmbH; Karlsruhe / Deutschland
- Polynukleotidkinas (PNK), Boehringer Mannheim, Mannheim / Deutschland
- Proteinkinase K, Boehringer Mannheim / Mannheim, Deutschland
- Restriktionsenzyme (alle von Gibco BRL, Karlsruhe / Deutschland):
 - *EcoR* I
 - *EcoR* V
 - *Pst* I
 - *Sst* I
- RNase A, Sigma, Deisenhofen / Deutschland
- *Taq*-Polymerase: siehe Tabelle 2.1

2.5 REAGENTIENSÄTZE (»KITS«)

- *500 Optimization Kit for PDS-1000/He Particle Delivery System*, Biorad, München / Deutschland
- *DIG-DNA-Labeling Kit*, Boehringer Mannheim, Mannheim / Deutschland
- *DIG-High Prime Kit*, Boehringer Mannheim, Mannheim / Deutschland
- *DNeasy Plant Minikit*, Qiagen, Hilden / Deutschland
- *GFX PCR DNA and Gel Band Purification-Kit*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg / Deutschland
- *Prep-a-gene purification Kit*, Biorad, München / Deutschland
- *Stop-/Loadingbuffer for Li-Cor long read kit*, Epicentre Technologies (bezogen von Biozym, Oldendorf / Deutschland)
- *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg / Deutschland

2.6 GERÄTE

- Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System, Bio-Rad, Hercules / Ca, USA
- Hybaid Touch-Down Thermocycler, Hybaid, Heidelberg / Deutschland
- Li-Cor DNA-Sequencer 4000L, MWG-Biotech, Ebersberg / Deutschland
- Photometer Gene Quant II, Pharmacia, Freiburg / Deutschland
- UV-Crosslinker, Amersham Life Science
- Vacuum Concentrator („Speedvac“), Bachofer, Reutlingen / Deutschland
- Zentrifugen: Biofuge 13, Heraeus Sepatech
 Eppendorf Centrifuge 5417C
 Sorvall RC 5c-plus
 Ultracentrifuge L7-65, Beckman
 Varifuge 3.0R, Heraeus Sepatech

2.7 STERILISATION VON LÖSUNGEN UND MEDIEN

Lösungen, Wasser und Nährmedien wurden, soweit erforderlich, durch Autoklavieren (20 min, 120 °C, 1 bar Überdruck) sterilisiert. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2µm-Filter von Carl Roth bzw. Schleicher & Schuell).

2.8 DNA-PRÄPARATION

2.8.1 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN

Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien:

Mix I: 0,9 ml 20 % Glucose
 2,0 ml 100 mM EDTA / NaOH pH 7,5
 0,5 ml 1 M Tris/HCl pH 7,5
 16,0 ml H₂O
 vor Gebrauch Zugabe von 2–10 mg Lysozym

Mix II: 1,0 ml 2 M NaOH
 1,0 ml 10 % SDS
 8,0 ml H₂O

Mix III: 3 M NaAc / Essigsäure pH 4,8

Tris-EDTA-Puffer (TE):
 10 mM Tris
 1 mM NaEDTA, pH 8,0

2.8.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab («Minipröp»)

Die Plasmid-DNA-Präparation erfolgte mittels alkalischer Lyse nach Birnboim & Doly (1979). Die Präparation erfolgte aus einer 1,5 ml-Übernachtskultur von *E. coli* in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß. Nach dem Sedimentieren der Bakterien (Biofuge, max. UpM, 1 min, RT) wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag in 100 µl Mix I resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden dann 200 µl Mix II zugegeben, durch fünfmaliges Invertieren gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 150 µl Mix III zugegeben, gemischt (durch Invertieren) und ebenfalls fünf Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann zentrifugiert (Biofuge, max. UpM, 10 min,

RT) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 200 µl Phenol/Chloroform (1:1, v/v) versetzt, geschüttelt, zentrifugiert und zur besseren Trennung der Phasen zwei Minuten zentrifugiert. Die wässrige, DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 800 µl 100%-Ethanol gefällt (10 min, RT). Die gefällte DNA wurde sedimentiert (Eppendorf Centrifuge, 14000 UpM, 10 min, RT), der Niederschlag mit 70%-Ethanol gewaschen und in der *Speedvac* getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl 1xTE aufgenommen und die mitisolierte RNA wurde durch Zugabe von 1,0 µl RNase A (1 mg/ml) verdaut (Inkubation 5 min, RT).

2.8.1.2 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (»Maxipräp«)

Die DNA-Präparation im großen Maßstab erfolgte nach der Methode der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation im CsCl-Gradienten.

Der Niederschlag aus einer 500 ml-*E. coli*-Übernachtskultur (Zentrifugation: Sorvall RC 5Cplus, 5000 UpM, 10 min, 4 °C) wurde mit 6 ml Mix I resuspendiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 12 ml Mix II zugegeben, gemischt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 16 ml Mix III dazugegeben, geschüttelt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Varifuge, 4000 UpM, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt, auf 50 ml mit Isopropanol aufgefüllt, geschüttelt und über Nacht bei -20 °C die Plasmid-DNA gefällt. Am nächsten Tag wurde die gefällte DNA pelletiert durch Zentrifugieren (Varifuge, 4000 UpM, 10 min, 4 °C) und in 10 ml einer 50%-igen CsCl-Lösung (in 1xTE) gelöst. Anschließend wurden 150 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und die Ansätze in Zentrifugenröhrchen (Beckman Centrifuge Tube #342413) überführt. Die Ultrazentrifugation (Beckman Ultracentrifuge L7-65) erfolgte über 16 Stunden bei 50000 UpM und 18 °C. Nach Beendigung der Ultrazentrifugation wurde die untere der beiden erhaltenen Plasmid-DNA-Banden mit einer Kanüle abgezogen, in ein Falcon-Röhrchen überführt und zum Entfernen des Ethidiumbromids mit CsCl-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt. Zum Fällen der Plasmid-DNA wurde zuerst das dreifache Volumen an H₂O und anschließend das zweifache Volumen an Ethanol (absolut) zugegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die gefällte

DNA wurde sedimentiert (Varifuge, 4000 UpM, 20 min, 4 °C), das Pellet zweimal mit 70%-Ethanol gewaschen, getrocknet und letztendlich in ca. 50-500 µl (abhängig von der Pelletgröße) 1 x TE-Puffer aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch (2.8.4) und zur Qualitätskontrolle wurde ein Aliquot mit einem bestimmten Restriktionsenzym geschnitten (2.12.1) und in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt (2.10.1).

2.8.2 ISOLATION VON NUKLEINSÄUREN AUS PFLANZEN

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

Die Extraktion erfolgte in Anlehnung an Frischmuth & Stanley (1991). Ein ca. ein-bis-fünf-Markstück-großes Blatt wurde mit 1 ml Extraktionspuffer in einem sterilen Mörser zerkleinert und anschließend in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurde die Suspension zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417C, 14000 UpM, 5 min, RT) und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Phenol/Chloroform (1:1, v/v) versetzt und ca. 45 Minuten geschüttelt, wobei sich die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase anreichern. Zur Phasentrennung wurde kurz (2 min) zentrifugiert, die wässrige Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Chloroform versetzt (um evtl. vorhandene Phenolreste zu entfernen), kurz geschüttelt und zur Phasentrennung wieder zwei Minuten zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert. Durch Zugabe von 80 µl 3 M Natriumactat (pH 4,8) und von 0,8–1 Volumen eiskaltem Isopropanol wurden die Nukleinsäuren über Nacht bei –20 °C gefällt. Anschließend wurden die gefällten Nukleinsäuren sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5417C, 14000 UpM, 15 min, RT) und der Niederschlag mit 70%-Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert und getrocknet (Speedvac). Das Pellet wurde in 100 µl 1 x TE (10 mM Tris, 1 mM NaEDTA; pH 8,0) oder Wasser resuspendiert (30 min, 37 °C). Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte photometrisch (vgl. 2.8.4).

2.8.3 ISOLATION VON GESAMT-NUKLEINSÄUREN AUS WEIßEN FLIEGEN

Tris-CaCl ₂ -Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 1 mM CaCl ₂
Proteinase K	1 mg/ml in 4 mM CaCl ₂
10% SDS	

Die Isolation von Nukleinsäuren aus Weißen Fliegen erfolgte in Anlehnung an Höfer *et al.* (1997a). Jeweils zehn bis 20 Weiße Fliegen wurden in 140 µl Tris-CaCl₂-Puffer, 50 µl Proteinase K, 10 µl 10% SDS (Endvolumen 200 µl) in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß gemörsert und anschließend zwei Stunden bei 65 °C inkubiert. Dann mit 200 µl Phenol/Chloroform (1:1, v/v) versetzt, gemischt und zur Phasentrennung kurz (2 min) zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige wässrige Oberphase wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2 Volumen Ethanol (absolut) gefällt (-20 °C, 2-16 h). Danach wurde die DNA pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5417C, 14 000 UpM, 15 min, RT), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl 1xTE (10 mM Tris, 1 mM NaEDTA; pH 8,0) aufgenommen.

2.8.4 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON ISOLIERTEN NUKLEINSÄUREN

Die Konzentration von isolierter Plasmid-DNA (vgl. 2.8.1.2) oder isolierter viraler Nukleinsäure aus Pflanzengewebe (vgl. 2.8.2) wurde photometrisch bestimmt, indem in der Regel von einer 1:100-Verdünnung (in H₂O) die optische Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) bestimmt wurde. Als Referenzwert wurde die optische Dichte (OD₂₆₀) von Wasser gemessen. Die Differenz dieser Werte ($\Delta OD_{260} = OD_{260}(\text{DNA-Probe}) - OD_{260}(\text{H}_2\text{O})$) wurde zur Bestimmung der Konzentration eingesetzt, die sich daraus wie folgt berechnen lässt:

$$c(\text{DNA}) = \Delta OD_{260} \times F \times 50 \mu\text{g/ml}, \text{ mit } F = \text{Verdünnungsfaktor.}$$

2.9 BAKTERIENANZUCHT UND -TRANSFORMATION

2.9.1 ANZUCHTMEDIUM FÜR BAKTERIEN

Lauria-Bertani-Flüssigmedium (LB):

Bacto-Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	10,0 g

mit H₂O ad 1 000 ml; pH 7,0

Je nach Experiment Zusatz von 100 µg/µl Ampicillin.

Lauria-Bertani-Agarplatten:

Zugabe zum obigen Flüssigmedium von 15 g Agar pro Liter Medium. Je nach Experiment wurden 100 µg/µl Ampicillin bzw. 50 µg/µl Rifampicin und 50 µg/µl Kanamycin nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.9.2 HERSTELLUNG CHEMISCH-KOMPETENTER *E. COLI* JM83

Zellen des *E. coli*-Stammes K12 JM83 wurden nach der CaCl₂-Methode chemisch kompetent gemacht (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 50 ml LB-Flüssigmedium mit 500 µl einer *E. coli* K12 JM83-Übernachtskultur angeimpft und 2,5 Stunden bei 37 °C unter Schütteln (180 UpM) inkubiert. Die Bakterien wurden dann sedimentiert (Varifuge, 3000 UpM, 5 min, 4 °C) und der Niederschlag in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und auf Eis 20 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (Varifuge, 3000 UpM, 5 min, 4 °C) wurde das Bakterien-Pellet in 5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden nach zwei Tagen zur Transformation eingesetzt.

2.9.3 TRANSFORMATION KOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN

Chemisch-kompetente *E. coli* K12 JM83 (2.9.2) wurden transformiert, indem der gesamte Ligationsansatz (2.12.5) mit 300 µl kompetenter *E. coli*-Zellen versetzt und 50 bis 60 Minuten auf Eis gestellt wurde. Danach wurde der Ansatz zwei Minuten bei 42 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-Flüssigmedium

versetzt und 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde der Ansatz kurz anzentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgenommen und verworfen. Die Bakterien wurden in den verbliebenen 100 µl Überstand resuspendiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsmedium (i. d. R. Ampicillin, 100 µg/ml Endkonzentration) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.9.4 SCREENING NACH POSITIVEN KLONEN

Kolonien von Transformanden (2.9.3) wurden mit einem sterilen Zahnstocher ausgestochen, in 1,5 ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Von dieser Übernachtskultur wurde eine Plasmid-DNA-Präparation im kleinen Maßstab (2.8.1.1) durchgeführt und die DNA anschließend mit einem oder mehreren bestimmten Restriktionsenzymen geschnitten (2.12.1). Der Restriktionsansatz wurde zur Identifikation von positiven Klonen im Agarosegel aufgetrennt (2.10.1). Von Klonen mit einem positiven Restriktionsmuster wurde anschließend das CP-Gen sequenziert (2.13). Von den auf diese Art und Weise als positiv ermittelten Klonen wurde eine Stammkultur (sogenannter Gefrierstock) angelegt: Dazu wurde eine exponentiell wachsende *E. coli*-Kultur des betreffenden Klons im Verhältnis 1:1 mit sterilem Glycerin (100 %) gemischt und bei –80 °C weggefroren.

2.10 NUKLEINSÄURE-NACHWEIS

2.10.1 AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE); 10x konzentriert:

89 mM Tris
89 mM Borsäure
2 mM EDTA
pH 8,0

10x Stopp-/Lade-Puffer (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

Zur Überprüfung eines Restriktionsverdau (2.12.1) oder zur Größenabschätzung von PCR-Amplifikaten (2.11) wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (Agarosegel-Elektrophorese) und das Laufmuster fotografisch dokumentiert.

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden unterschiedliche Konzentrationen an Agarose verwendet (für erwartete Banden größer als 0,5kb: 1% (w/v) Agarose). Die entsprechende Menge an Agarose wurde mit der entsprechenden Menge an 0,5xTBE aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5µg/ml) und in die Gel-Apparatur gegossen. Vor der Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10xStopp-Puffer versetzt. Die Detektion der DNA erfolgte durch UV-Beleuchtung. Als Laufpuffer wurde 0,5xTBE verwendet. Es wurde eine Spannung von 5Volt pro Zentimeter Elektrodenabstand angelegt (Sambrook *et al.*, 1989).

Zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurden diese mit einem definierten DNA-Größenstandard verglichen, der stets mit auf das Gel aufgetragen wurde. Als DNA-Größenstandard wurde *Eco* RI / *Hind* III-verdaute Bakteriophagen λ-DNA verwendet. Eine *Eco* RI / *Hind* III-Restriktion von λ-DNA ergibt Fragmente der Größe: 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4873, 5148 und 21226 bp).

2.10.2 SOUTHERN BLOT-ANALYSE

2.10.2.1 Southern Blot

Denaturierungspuffer:	0,5N Natronlauge 1,5M Natriumchlorid
Neutralisierungspuffer:	1,5M Tris / HCl pH 7,5 1,5M Natriumchlorid
20xSSC:	175,32g Natriumchlorid 88,2g Natriumcitrat ad 1l H ₂ O, pH 7,0

Die Durchführung des Southern Blots erfolgte in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989). Jeweils 5µg bzw. 10µg isolierter viraler Nukleinsäuren aus Pflanzen

(vgl. 2.8.2) wurden in einem 1%-igen Agarosegel (0,5xTBE, ohne Ethidiumbromid) aufgetrennt (vgl. 2.10.1). Im Fall isolierter Nukleinsäuren aus Weißen Fliegen (vgl. 2.8.3) wurden Mengen aufgetragen, die der isolierten Nukleinsäure-Menge aus 5, 8, 12 oder 16 Weißen Fliegen entsprach. Nach der Auftrennung im Agarosegel wurden die Geltaschen weggeschnitten und das Gel zunächst zehn Minuten in 0,25N Salzsäure, dann 30 Minuten in Denaturierungspuffer und schließlich 30 Minuten in Neutralisierungspuffer geschüttelt. Während dieser Zeit wurde die Nylon-Membran (Hybond NX, Amersham Life Science) und drei Whatman 3MM-Papiere auf die Gelgröße zurecht geschnitten. Der Aufbau des Blots fand wie folgt statt: Das Gel wurde mit der Unterseite nach oben luftblasenfrei auf ein feuchtes Whatman-Papier (Whatman-Brücke) gelegt, das Verbindung zu einer hochkonzentrierten Salzlösung (10xSSC) hatte. Auf das Gel wurde zunächst die zuvor in Wasser und 10xSSC angefeuchtete Nylon-Membran gelegt, dann zwei in 10xSSC angefeuchtete Whatman-Papiere gefolgt von einem trockenen Whatman-Papier. Darüber wurde schließlich ein Stapel trockenes Filterpapier gelegt und darauf letztendlich zur Erhöhung der Saugkraft eine Glasplatte und ein oder mehrere Gewichte. Um den Blot nicht »kurzzuschließen«, wurde die Whatman-Brücke um das Gel herum mit Haushaltsfolie abgedichtet. Das *Blotting* fand über Nacht statt und am nächsten Tag wurde die Membran kurz in 2xSSC geschwenkt und anschließend im UV-Crosslinker fixiert.

2.10.2.2 Nachweis der geblotteten DNA mittels DIG-Hybridisierung

(a) Herstellung DIG-markierter AbMV A-, SiGMV A- und SiGMV B-Sonden

Zur Herstellung DIG-markierter Sonden wurde der *DIG High Prime-Kit* bzw. der *DIG-DNA-Labeling Kit* der Firma Boehringer Mannheim verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt. Wegen der engen Verwandtschaft von AbMV und SiGMV/CR bzw. SiGMV/Ho_{yy} kreuz-hybridisieren die Sonden, d.h. mit einer AbMV A-Sonde kann die DNA A von SiGMV/CR und SiGMV/Ho_{yy} detektiert werden.

Für die Herstellung der zu markierenden DNA-Fragmente wurden 3 µg DNA

wie folgt verdaut: AbMV A mit *Pst* I, SiGMV/CR A mit *Eco* RV und SiGMV/CR B mit *Sst* I (2.12.1). Bei dieser Restriktion wird das gesamte Virus-Genom aus dem pBluescript-Vektor herausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA in einem 1%-igen Agarosegel (0,5xTBE, mit Ethidiumbromid) aufgetrennt, die Virus-Monomer-Banden ausgeschnitten und aus dem Gelstück die DNA eluiert, wobei die SiGMV/CR DNA A und DNA B mittels des *Prep-a-Gene Purification-Kits* von Biorad (2.12.6.1) und die AbMV DNA A mittels des *GFX PCR DNA and Gel Purification-Kits* (Amersham Pharmacia Biotech) (2.12.6.1) eluiert wurden. Die AbMV A-Sonde wurde mit dem *DIG-High Prime-Kit* markiert. Für die DIG-Markierungsreaktion wurde das gesamte Eluat (16 µl) eingesetzt. Als erstes erfolgte die Denaturierung der eluierten DNA durch Inkubation von zehn Minuten bei 100 °C und schnelles Abschrecken in einem Eis-/Kochsalzbad. Nach Zugabe von 4 µl DIG-High Prime wurde gemischt und kurz anzentrifugiert. Die SiGMC/CR DNA-Fragmente wurden wie folgt markiert: Zu 10 µl Eluat wurden 5 µl H₂O gegeben und durch Inkubation von fünf Minuten bei 95 °C und Abschrecken auf Eis denaturiert. Es wurden dann zur DIG-Markierung der DNA 2 µl Hexanukleotidmix, 2 µl DIG-DNA-Labeling-Mix und 1 µl Klenow-Enzym zugegeben. Die Markierungsreaktionen wurden nach einer Inkubation von 20 Stunden (AbMV A-Sonde) bzw. einer Stunde (SiGMV/CR-Sonden) bei 37 °C durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Um freies, nicht eingebautes DIG-dUTP abzutrennen wurden zu den Ansätzen jeweils 2,5 µl 4 M Lithiumchlorid und 75 µl vorgekühltes (-20 °C) Ethanol zugegeben und gut gemischt. Nach einer ein- bis zweistündigen Inkubation bei -80 °C wurde die gefällte DNA sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5417C, 14 000 UpM, 45 min, RT). Der Niederschlag wurde anschließend mit 50 µl 70%-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl 1xTE (10 mM Tris, 1 mM NaEDTA, pH 8,0) gelöst.

(b) Hybridisierung

Hybridisierungslösung:	5xSSC (vgl. 2.10.2.1) 2% Blockierungsreagenz (vgl. 2.10.2.2 (c)) 0,1% N-Lauroylsarkosin 0,02% SDS
Waschpuffer #1:	2xSSC mit 0,1% SDS
Waschpuffer #2:	0,1xSSC mit 0,1% SDS

Die Prähybridisierung/Hybridisierung fand in Hybridisierungsröhren statt. Zur Prähybridisierung wurde die Nylon-Membran (vgl. 2.10.2.1) mit ca. 30ml Hybridisierungslösung zwei bis vier Stunden bei 65°C inkubiert. Dann wurde die zuvor denaturierte Sonde (95°C, 5 min, dann sofort auf Eis) (vgl. 2.10.2.2 (a)) dazugegeben und mindestens 16 Stunden bei 65°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde (in Hybridisierungslösung) nicht verworfen, sondern weggefroren; sie konnte noch weitere vier bis fünf mal zur Hybridisierung genutzt werden. Es folgten nun mehrere kleine Waschschriffe, um die Membran von nicht-gebundener Sonde zu befreien. Dazu wurde die Membran zunächst einmal kurz mit Waschpuffer #1 gespült, dann zweimal fünf Minuten mit Waschpuffer #1 bei Raumtemperatur gewaschen. Der darauffolgende Waschschriff für 15 Minuten mit Waschpuffer #2 fand bei 65°C statt. Anschließend wurde gleich der Chemilumineszenz-Nachweis durchgeführt (vgl. 2.10.2.2 (c)).

(c) Chemilumineszenz-Nachweis

Puffer #1: 0,1 M Maleinsäure
 3 M Natriumchlorid
 pH 8,0

Blockierungsreagenz:
 10 % (w/v) Blockierungsreagenz (Boehringer
 Mannheim) in:
 0,1 M Maleinsäure
 0,15 M Natriumchlorid
 pH 7,5

Waschpuffer: Puffer #1 mit 0,3 % Tween-20

Puffer #2: Blockierungsreagenz in Waschpuffer, Verdünnung 1:20

Anti-DIG-AP Konjugat (Boehringer Mannheim)

Puffer #3: 0,1 M Tris / HCl, pH 9,5
 0,1 M Natriumchlorid
 50 mM Magnesiumchlorid

CSPD-Lösung: CSPD-Substrat (Boehringer Mannheim) 1:100 in
 Puffer #3 verdünnt

CDP-Star-Lösung: CDP-Star-Substrat (Boehringer Mannheim) 1:100 in
 Puffer #3 verdünnt

Alle folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur auf einem Taumel-Rollenmischer statt. Zunächst wurde die Membran fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen, dann 60 Minuten in 40 ml Puffer #2 inkubiert. 0,7 µl Anti-DIG-AP-Konjugat wurden in 10 ml Puffer #2 verdünnt (Verdünnungsfaktor 1:15.000) und die Membran wurde darin eine halbe Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran viermal zehn Minuten mit Waschpuffer gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 3 Minuten in Puffer #3 und dann fünf Minuten in CSPD-Lösung (falls virale Nukleinsäuren isoliert aus Pflanzen detektiert werden sollten) bzw. in CDP-Star-Lösung (falls virale Nukleinsäuren isoliert aus *B. tabaci* detektiert werden sollten) inkubiert. Darauf wurde die Membran aus der Hybridisierungsröhre entnommen, die überschüssige Flüssigkeit abgestreift, in eine Plastikfolie eingeschweißt und ca. 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte dann die Exposition auf einem Röntgenfilm für drei bis 20 Stunden (CSPD) bzw. fünf bis 30 Minuten (CDP-Star).

2.11 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, die auf K. B. Mullis (1986) zurückgeht und mit der durch aufeinanderfolgende Zyklen von Denaturieren der DNA in Einzelstränge, Anlagern der beiden Primer (*Annealing*) und Elongation der DNA durch eine DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) die Ziel-DNA-Sequenz enorm vervielfältigt werden kann. Neben der Amplifikation können auch während der PCR gezielt Nukleotide ausgetauscht, d. h. Punktmutationen in die amplifizierte DNA eingeführt werden.

Die verwendeten DNA-Polymerasen und die dazugehörigen Standard-PCR-Ansätze sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Wurden von diesen Standard-PCR-Ansätzen abweichende PCR-Ansätze verwendet, so ist dies an entsprechender Stelle vermerkt. Von jedem PCR-Amplifikat wurde ein Aliquot (5 µl) zur Qualitätskontrolle in einem 1%-igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt (2.10.1). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Standardmäßig wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt, sofern nichts anderes angegeben ist:

<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>	<i>Zyklen</i>
95 °C / 5 min	55 °C / 1 min	72 °C / 1 min	x1
95 °C / 1 min	55 °C / 1 min	72 °C / 1 min 30 sec	x30
95 °C / 1 min	55 °C / 1 min	72 °C / 10 min	x1

Die PCR wurde in dieser Arbeit zu folgenden Zwecken eingesetzt:

(a) Zur **Amplifikation und Mutation** von viraler DNA, die dann nach entsprechender Modifikation (vgl. 2.12) zur Klonierung eingesetzt wurde. Siehe dazu Kapitel 2.14 »Herstellung infektiöser Klone von SiGMV/CR-CP-Chimär und AbMV-CP-Mutanten«.

(b) Zur **Detektion**, ob die Weiße Fliege *B. tabaci* bestimmte Virus-Mutanten aufgenommen hat.

Dazu wurden 1,5 µl isolierte DNA (aus Weißen Fliegen (2.8.3)) als Template eingesetzt (das entspricht theoretisch einer Menge DNA, die aus ein bis zwei

Tabelle 2.1: Verwendete DNA-Polymerasen und dazugehörige Standard-PCR-Ansätze

Firma	Eurogentec	Qiagen	Stratagene
DNA-Polymerase:	Goldstar <i>Taq</i>	<i>Taq</i>	<i>PfuTurbo-DNA-Polymerase</i>
PCR-Standardansätze:			
Komponente	Endkonzentration		
10x PCR-Puffer	1 x	1 x	1 x
dNTP-Mix	200 µM pro dNTP	200 µM pro dNTP	200 µM pro dNTP
Primer #1	1 µM	1 µM	1 µM
Primer #2	1 µM	1 µM	1 µM
MgCl ₂	1,25 mM	1,5 mM	2 mM
DNA-Polymerase	1,25 U	1,25 U	1,25 U
DNA-Template	<1 µg, i. d. R. 100 ng	<1 µg, i. d. R. 100 ng	<1 µg, i. d. R. 100 ng
H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl
Endvolumen	50 µl	50 µl	50 µl

Weißer Fliegen isoliert wurde). Ansonsten wurde der Standard-PCR-Ansatz der Qiagen-Taq-Polymerase gewählt (Tabelle 2.1). Mit den Primern AbCP7 und AbCP8 (Tabelle 2.2) wird dabei das Kapsidprotein-Gen amplifiziert (759 bp). Die PCR-Konditionen wurden wie folgt gewählt:

<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>	<i>Zyklen</i>
94 °C / 3 min			x 1
94 °C / 1 min	43 °C / 1 min	72 °C / 1 min	x 30
72 °C / 10 min			x 1

- (c) Zur **Amplifikation** des Kapsidprotein-Gens. Dabei wurde Virus-DNA, die aus Weiße Fliegen-inokulierten Pflanzen (*target plants*) (2.8.2) isoliert wurde, als DNA-Matrize in der PCR eingesetzt. Das Amplifikat wurde nach einem Reinigungsschritt (Abtrennen der noch vorhandenen Nukleotide, Primer usw.; 2.12.6.3) als Template-DNA zum Sequenzieren eingesetzt. Mit Hilfe der Sequenz-Analyse wurde überprüft, ob die entsprechende(n) Punktmutation(en) im Kapsidprotein-Gen nach der Übertragung durch die Weiße Fliege noch im CP-Gen vorhanden waren und ob eventuell zusätzliche, nicht gesetzte Mutationen aufgetreten sind.

Mit Hilfe der Primer AbMV11, AbMV12 (im Fall von AbMV-CP-Mutanten) und SGMV1, SGMV2 (im Fall von SiGMV/CR und Konstrukt L) (Tabelle 2.2) wurde das Kapsidprotein-Gen mit seinen 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen (jeweils ca. 100 bp) amplifiziert. Es wurde jeweils der Standard-PCR-Ansatz der Qiagen-Taq-Polymerase (Tabelle 2.1) angesetzt. Als PCR-Konditionen wurden die folgenden gewählt:

<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>	<i>Zyklen</i>
94 °C / 3 min			x 1
94 °C / 1 min	50 °C / 1 min	72 °C / 1 min	x 30
72 °C / 10 min			x 1

Tabelle 2.2: PCR-Primer

Primer	Sequenz	Lokalisation
AbCP4	5'-ATT TGA ATT TTA TTG AAT GAT TT-3'	AbMV A nt 1118- 1140
AbCP7	5'-CAA AAT GCC TAA GCG CGA TCT CCC-3'	AbMV A nt 354-377
AbCP7s-FOR	5'-ACG <u>GAG CTC</u> CAA AAT GCC TAA GCG CGA TC-3'	AbMV A nt 354-373
AbCP8	5'-TTT ATT AAT TCA TGA GCG AAT C-3'	AbMV A nt 1117- 1096
AbCP13	5'-CTG GGC ACA TCG GCC GTC-3'	AbMV A nt 539-522
AbCP15	5'-GTG TGG TTC TTG AGC TTG AT-3'	AbMV A nt 737-718
AbCP16	5'-GAA CAG TGT CAT GTT CTG GT-3'	AbMV A nt 738-757
AbCP17	5'-CGT GCC ATA CGG TCT ACG GTC-3'	AbMV A nt 786-766
AbCP18	5'-CCC ATG GAT TTC GGT CAG GTG TTC AAC-3'	AbMV A nt 787-816
AbCP19	5'-CAC CTG TGA CCT TGG CAT AGA ACT TG-3'	AbMV A nt 907-882
AbCP20	5'-GAC AGT ATG CCA GCA ATG AAC-3'	AbMV A nt 908-928
AbCP21	5'-GGA GAT CGT TCT TCA CAG TGG C-3'	AbMV A nt 859-839
AbCP22	5'-GCG ATC GTT ACC AGG TCA TGC ACA AGT TCT-3'	AbMV A nt 860-889
AbCP23	5'-CTT GAC GAG TGC CTG TTC ATT G-3'	AbMV A nt 942-921
AbCP24	5'-CGT TTC TGG AAG GTC AAC AAT C-3'	AbMV A nt 943-964
AbCP25	5'-GGA TCT TCA AAG TTG CAT AAA CGG G-3'	AbMV A nt 1057- 1081
AbCP26	5'-GAA TCT ATT TCT ATG ATT CGC CTA TGA ATT-3'	AbMV A nt 1082- 1111
AbMV11	5'-CCG CTA TAA TAT TAC CGG ATG G-3'	AbMV A nt 145-166
AbMV12	5'-CCT GAA CTT CCA AGT TTG GAC G-3'	AbMV A nt 1314- 1293
SGCP1	5'-TTT ATT AAT TCA TTA TCG-3'	SiGMV/C A nt 1092- 1075
SGCP4	5'-AAA TAA AGA CAG TGG GCC GGG CC-3'	SiGMV/CR A nt 328-306
SGCP4s-REV	5'-TAC <u>GAG CTC</u> GAA ATA AAG ACA GTG GGC CG-3'	SiGMV/CR A nt 329-310
SGCP9	5'-AGG ATG TGA AGG CCC TTG-3'	SiGMV/CR A nt 515-532
SGMV1	5'-CAT ATG TAA ATT ATG TAC-3'	SiGMV/CR nt 1135- 1119
SGMV2	5'-CTG GGG ATA AGT GAG GAA-3'	SiGMC/CR nt 2557- 2574

Eingefügte Ssf I-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.
Mutierende Nukleotide sind fett gedruckt.

2.12 MODIFIZIERUNG UND REINIGUNG VON DNA

2.12.1 RESTRIKTION

Die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA bzw. von PCR-Amplifikaten mittels Restriktionsenzymen (Endonukleasen) wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

Zur Überprüfung der Vollständigkeit einer Restriktion wurde ein Aliquot (i. d. R. 1 % des Ansatzes) mittels Agarosegelelektrophorese (2.10.1) aufgetrennt und analysiert.

2.12.2 AUFFÜLLREAKTION MIT KLENOW-ENZYM

Um bei einer *blunt end*-Ligation Deletionen zu vermeiden, wurden die PCR-Produkte nach der Amplifikation einer Nukleotid-Auffüllreaktion mit dem Klenow-Enzym unterzogen. Dazu wurde 1 U Klenow-Enzym zum Amplifikat gegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Ansätze gefällt durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 4,8) und 2 Volumen Ethanol (absolut). Nach einem Inkubationsschritt von mehreren Stunden bei –20 °C wurde die gefällte DNA sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5417C, max. UpM, 20min, RT) und der Niederschlag anschließend mit 70 %-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 19,5 µl Wasser aufgenommen.

2.12.3 MODIFIKATION VON DNA MITTELS POLYNUKLEOTIDKINASE

Um die Ligationen von PCR-Fragmenten zu ermöglichen, wurden die 5'-Enden der amplifizierten DNA mittels der Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert. Die Behandlung mit 0,5 U PNK erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Die Polynukleotidkinase wurde inaktiviert durch Inkubation bei 72 °C für zehn Minuten.

2.12.4 MODIFIKATION VON DNA MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE

Um bei der Klonierung in singuläre Restriktionsschnittstellen eine Religation des AbMV-Rumpfkons (2.14) zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen des linearisierten Rumpfkons mittels Alkalischer Phosphatase (CIAP) entfernt. Die Behandlung mit Alkalischer Phosphatase erfolgte für 30 Minuten bei 37°C mit 1 U CIAP im vom Hersteller empfohlenen Puffer. Entweder durch Inkubation von zehn Minuten bei 72°C oder durch Zugabe von Stopp-/Ladepuffer wurde die CIAP inaktiviert.

2.12.5 LIGATION

Bei der Herstellung von Konstrukt L wurden 5 µl des DNA-Fragments, das für den variablen Kapsidprotein-Teil von AbMV kodiert, und 2 µl SiGMV/CR-Fragment eingesetzt (vgl. 2.14).

Zur Herstellung der Konstrukte N, O, P, Q, R, S, U, W, X, Z, A1 und A2 durch Religation wurden zwischen 10 µl und 15 µl Klenow-Enzym-behandeltes Amplifikat (vgl. 2.12.2) eingesetzt.

Bei der Bitmerklonierung der AbMV-CP-Mutanten DNA A wurden die in den AbMV-Rumpfklon zu ligierenden AbMV-CP-Mutanten-Monomere in unterschiedlichen Verhältnissen (in der Regel 1:3, 1:5 und 1:8) eingesetzt (vgl. Kapitel 2.14). Erfolgte die Bitmerklonierung der AbMV-CP-Mutanten DNA A durch Religation amplifizierter DNA, so wurden unterschiedliche Mengen an eluierter DNA eingesetzt (5 µl–15 µl) (vgl. Kapitel 2.14).

Die Ligation erfolgte stets in 20 µl Endvolumen im vom Hersteller empfohlenen Puffer durch Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase und 16 Stunden Inkubation bei 15°C. Anschließend wurde die DNA in chemisch-kompetente *E. coli* JM83 transformiert (2.9.3).

2.12.6 REINIGUNG VON DNA

2.12.6.1 Isolation aufgetrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Die Isolation von gewünschten DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen (2.10.1) erfolgte entweder mit Hilfe des *Prep-A-Gene Purification-Kits* von Bio-Rad oder des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification-Kits* von Amersham Pharmacia Biotech. Die Gelelution erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers.

2.12.6.2 Reinigung von zu sequenzierenden PCR-Amplifikaten

Die Reinigung von PCR-Produkten (Abtrennung von Primern, nicht eingebauten Nukleotiden usw.) erfolgte mittels des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification-Kits* von Amersham Pharmacia Biotech und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.12.6.3 Reinigung von aus Pflanzen isolierten Virus-Nukleinsäuren

Da isolierte Virus-Nukleinsäuren aus Pflanzen (vgl. 2.8.2) sehr oft noch Verunreinigungen aufweisen, die z.B. zur Inhibierung einer PCR führen können, wurde die isolierte Virus-DNA mit dem *DNeasy Plant Minikit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.13 DNA-SEQUENZ-ANALYSE

Doppelsträngige DNA wurde sequenziert nach dem Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1977).

Die Sequenzierung des Kapsidproteingens, der AbMV-Kapsidprotein-Mutanten und des SiGMV/CR-CP-Chimärs (Konstrukt L) erfolgte von beiden Seiten. Die Sequenzierprimer, bezogen von MWG Biotech, Ebersberg / Deutschland (Tabelle 2.3), paarten jeweils ca. 50-100bp 5' bzw. 3' vom Kapsidprotein-Gen entfernt.

Tabelle 2.3: Sequenzier-Primer

Primer	Sequenz	Lokalisierung
AbCP11L	5' -ATA ATG CGC CTG ACG AGT CAA T-3'	AbMV A nt 257-277
AbCP12L	5' -GTA CTT AGA TCA GTT AGG CGT G-3'	AbMV A nt 1233-1212
AbCP13L	5' -CTT CAC AGT GGC AGT ACT GGG CTC-3'	AbMV A nt 849-826; SiGMV/CR A nt 824-801
SGCP14L	5' -GAG GCG CTC CGC TTT CGT CTG-3'	SiGMV/CR A nt 200-220

Sequenziert wurde mit dem Li-Cor 4000L-Sequencer unter Verwendung IRD-markierter Primer (Tabelle 2.3), deren Fluoreszenz durch eine Laser-Scanner-Einheit detektiert wird.

Bei der Sequenzreaktion handelt es sich um eine »PCR-Sequenzierung« (*cycle sequencing*) unter Verwendung der oben erwähnten Primer und des *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kits* (Amersham Pharmacia Biotech). Sequenziert wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit leichten Modifikationen. Je nach Herkunft der DNA (aus Maxi- oder Minipräp (2.8) bzw. PCR (2.11)), wurden die Ansätze wie folgt in je einem 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt:

Minipräp-DNA		Maxipräp-DNA		PCR-Amplifikat (vgl. 2.11)	
Primer [2 pmol/μl]	1,0 μl	Primer [2 pmol/μl]	1,0 μl	Primer [2 pmol/μl]	1,0 μl
DNA	6,0 μl	DNA [μg/μl]	0,7 μl	DNA (Eluat)	7,0 μl
H ₂ O	17,0 μl	H ₂ O	22,3 μl	H ₂ O	16,0 μl
DMSO	1,0 μl	DMSO	1,0 μl	DMSO	1,0 μl

Pro Ansatz wurden vier verschiedenfarbige 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäße beschriftet (Probennummer und Base). In diese wurden jeweils 2 μl der betreffenden Reaktionsmische (A, C, G und T) aus dem Kit pipettiert. Je 6 μl Sequenzieransatz wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß (s.o.) überführt, gemischt und kurz zentrifugiert und im Thermocycler einer linearen PCR-Reaktion unterzogen. Für das *Cycle Sequencing* wurde das folgende Programm verwendet:

<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>	<i>Zyklen</i>
92 °C / 2 min	60 °C / 15 sec	70 °C / 30 sec	x 1
92 °C / 15 sec	60 °C / 15 sec	70 °C / 30 sec	x 30

Die Sequenzierreaktion wurde gestoppt nach dem Ende des *cycle sequencing* durch Zugabe von 4 µl 10xStop-/Loadingbuffer (Epicentre). Die Herstellung des 6%-igen Acrylamidgels sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Nach Beendigung des Gellaufs wurde die Sequenz automatisch mittels der mitgelieferten Software (BaselmagIR[®]) ausgewertet und gegebenenfalls anhand des Gelbildes manuell korrigiert. Die Sequenzanalyse (Homologievergleich) erfolgte mit Hilfe des DNASIS-Programms von Hitachi.

2.14 HERSTELLUNG INFEKTIÖSER KLONE VON SiGMV/CR-CP-CHIMÄR UND AbMV-CP-MUTANTEN

Im Konstrukt L sind die ersten 61 Aminosäuren (entspricht dem variablen Kapsidprotein-Anteil) zwischen AbMV und SiGMV/CR ausgetauscht (Abbildung 2-1). Das Konstrukt L wurde hergestellt, indem der variable Kapsidprotein-Teil von SiGMV/CR (Aminosäuren 1-61) ersetzt wurde durch den entsprechenden CP-Teil von AbMV. Das AbMV-Fragment wurde amplifiziert mit den Primern AbCP7s-FOR und AbCP13, wobei am 5'-Ende des Fragments eine *Sst* I-Restriktionsschnittstelle angehängt wurde (Tabelle 2.2). SiGMV/CR DNA A wurde amplifiziert mit den Primern SGCP4s-REV und SGCP9 (Tabelle 2.2). Die Lokalisierung und Orientierung der Primer wurde so gewählt, dass bei der Amplifikation von kloniertem SiGMV/CR die ersten 61 Aminosäuren des Kapsidproteins (genauer gesagt die Codons des entsprechenden Gens) deletiert wurden, aber gleichzeitig der pBluescript-Vektor, in dem SiGMV/CR kloniert vorlag, mitamplifiziert wurde. Darüber hinaus wurde am 3'-Ende des Fragments eine *Sst* I-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Die AbMV- und SiGMV/CR-Fragmente wurden zunächst einer Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym unterzogen (2.12.2), dann mit *Sst* I restringiert (2.12.1) und mit Polynukleotidkinase (PNK)

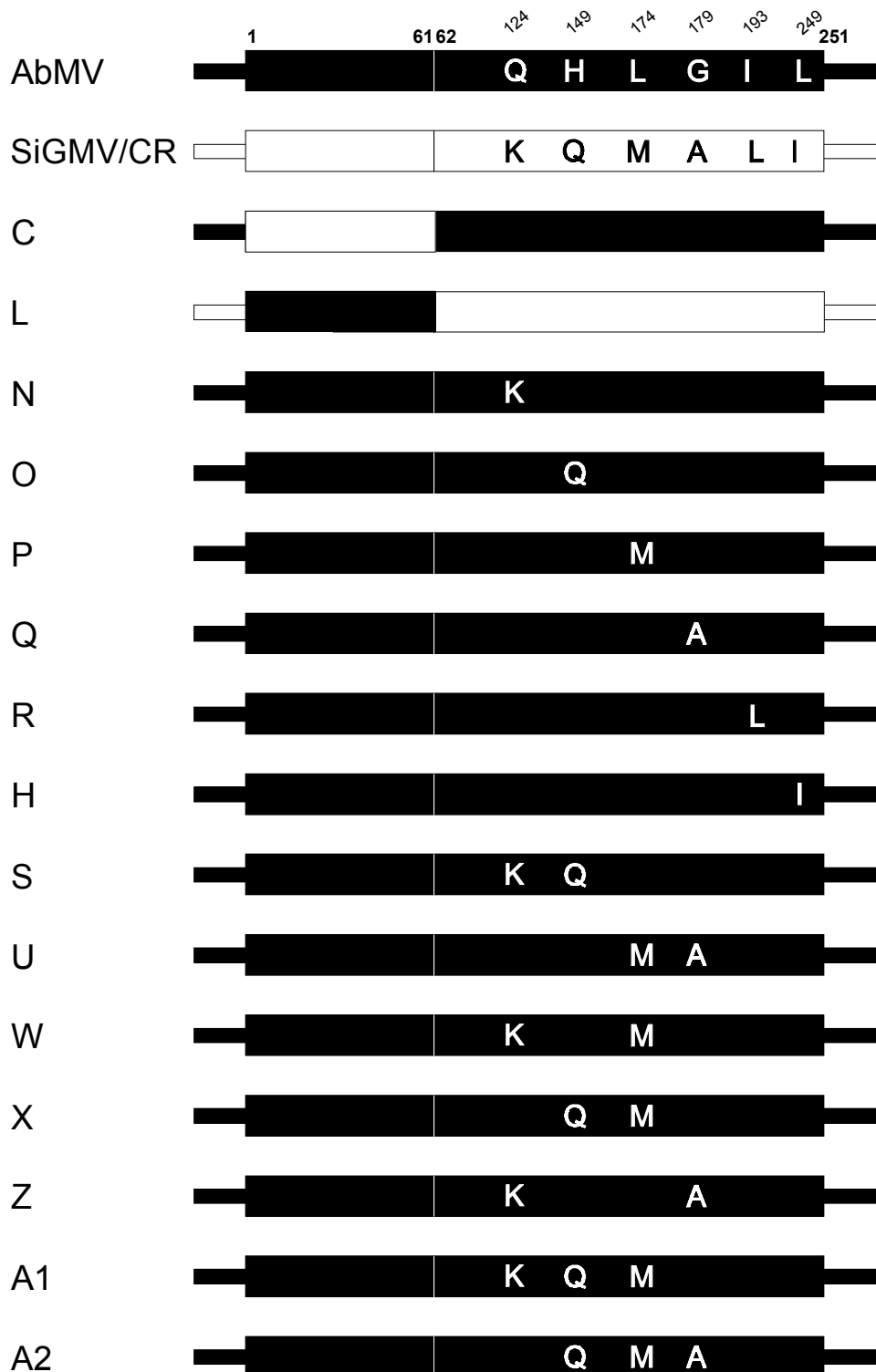


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der AbMV-CP-Mutanten.

■ = AbMV, □ = SiGMV/CR. Die sich zwischen AbMV und SiGMV/CR im konstanten Teil des Kapsidproteins (Aminosäuren 62-251) unterscheidenden Aminosäuren und deren Positionen sind angegeben.

phosphoryliert (2.12.3). Schließlich wurde das AbMV-Fragment in das SiGMV/CR-Fragment ligiert (2.12.5) und in chemisch-kompetente *E. coli* JM83 transformiert (2.9.3).

Alle AbMV-CP-Mutanten (N, O, P, Q, R, S, U, W, X, Z, A1 und A2, Abbildung 2-1) wurden mittels ortsspezifischer PCR-Mutagenese hergestellt. Die Primer für die Amplifikation waren gegenläufig orientiert und ermöglichten so eine Amplifikation der klonierten AbMV DNA A einschließlich des pBluescript-Vektors. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2, die eingesetzte Template-DNA sowie die jeweils verwendete DNA-Polymerase sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst. Aus Tabelle 2.1 lässt sich der jeweils verwendete PCR-Ansatz entnehmen. Die amplifizierte DNA wurde vor der Religation (2.12.5) zuerst mit dem Klenow-Enzym (2.12.2) und dann mit der PNK (2.12.3) behandelt. Die in das Kapsidprotein-Gen eingeführte(n) Punktmutation(en) sowie die Unversehrtheit des restlichen Kapsidprotein-Gens wurden durch eine Sequenzanalyse des Kapsidprotein-Gens bestimmt (2.13).

Die Herstellung von Bitmerklonen (da diese infektiöser sind) von den AbMV-CP-Mutanten wurde auf zwei Arten versucht. Zum einen wurde durch *Pst* I die AbMV-CP-Mutanten-Monomer-DNA aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten und in einen mit *Pst* I linearisierten AbMV-Rumpfklon ligiert. Der AbMV-Rumpfklon wurde mir freundlicherweise von P. Höfer zur Verfügung gestellt. Bei dem AbMV-Rumpfklon handelt es sich um ein *Pst* I (1549)-*Hinc* II (454)-Fragment von AbMV A, das in pBluescript kloniert wurde (Höfer *et al.*, 1997a), d.h. die Nukleotide 457 bis 1553 sind in dem Rumpfklon nicht mehr vorhanden (siehe dazu auch Abbildung 3-3). Vor der Ligation (2.12.5) wurde die *Pst* I-verdaute (2.12.1) AbMV-Rumpfklon-DNA dephosphoryliert (2.15.4) und anschließend wurden die *Pst* I-verdaute AbMV-CP-Mutanten-Monomer-DNA A und die Rumpfklon-DNA eluiert (*Prep-A-Gene Purification Kit* von Bio-Rad (2.12.6.1)). Zum anderen war geplant, durch Rückmutation des bereits vorliegenden und mir freundlicherweise von P. Höfer zur Verfügung gestellten Bitmerklonen von Konstrukt H (Abbildung 2-1) einen AbMV DNA A-Wildtyp-Bitmerklon zu erhalten. Dazu wurde das Konstrukt H mit den gegenläufig angeordneten Primern AbCP25 und AbCP26 (Tabelle 2.2) sowohl mit der

Tabelle 2.4: PCR-Bedingungen für die Herstellung der AbMV-CP-Mutanten

AbMV CP-Mutante	Primer	Polymerase	Template	PCR-Bedingungen	
N	AbCP15, AbCP16	Pfu	AbMV wt (Monomer)	95°C 1 min	x 1
				95°C 1 min/53°C 1 min/72°C 5 min	x 25
				72°C 10 min	x 1
O	AbCP17, AbCP18	Pfu	AbMV wt (Monomer)	95°C 1 min	x 1
				95°C 1 min/52°C 1 min/72°C 5min	x 25
				72°C 10 min	x 1
P	AbCP21, AbCP22	Pfu	AbMV wt (Monomer)	95°C 1 min	x 1
				95°C 1 min/52°C 1 min/72°C 5min	x 25
				72°C 10 min	x 1
Q	AbCP19, AbCP20	Pfu	AbMV wt (Monomer)	95°C 1 min	x 1
				95°C 1 min/47°C 1 min/72°C 5 min	x 25
				72°C 10 min	x 1
R	AbCP23, AbCP24	Pfu	AbMV wt (Monomer)	95°C 1min	x 1
				95°C 1 min/50°C 1 min/72°C 5 min	x 27
				72°C 10 min	x 1
S	AbCP15, AbCP16	Pfu	Konstrukt O	95°C 1 min	x 1
				95°C 1 min/53°C 1 min/72°C 5 min	x 25
				72°C 10 min	x 1
U	AbCP19, AbCP20	Pfu	Konstrukt P	95°C 1 min	x 1
				95°C 1 min/48°C 1 min/72°C 5 min	x 27
				72°C 10 min	x 1
W	AbCP17, AbCP18	Qiagen	Konstrukt R	94°C 3 min	x 1
				94°C 1 min/52°C 1 min/72°C 5 min	x 25
				72°C 10 min	x 1
X	AbCP17, AbCP18	Qiagen	Konstrukt P	94°C 3 min	x 1
				94°C 1 min/52°C 1 min/72°C 5 min	x 25
				72°C 10 min	x 1
Z	AbCP19, AbCP20	Qiagen	Konstrukt N	94°C 2min	x 1
				94°C 1 min/52°C 1 min/72°C 5 min	x 25
				72°C 10 min	x 1
A1	AbCP21, AbCP22	Qiagen	Konstrukt S	94°C 2 min	x 1
				94°C 1 min/52°C 1 min/72°C 5 min	x 25
				72°C 10 min	x 1
A2	AbCP17, AbCP18	Qiagen	Konstrukt U	95°C 3 min	x 1
				95°C 1 min/52°C 1 min/72°C 5 min	x 25
				72°C 10 min	x 1

wt = Wildtyp

PfuTurbo-DNA-Polymerase von Stratagene, als auch mit der *Taq*-Polymerase von Qiagen amplifiziert. Neben den Standard-PCR-Ansätzen (2.11) wurden zur Optimierung der PCR die Magnesiumchlorid-Konzentration in 1 mM-Schritten auf bis zu 4,0mM (*PfuTurbo*-DNA-Polymerase) bzw. 3,5mM (Qiagen *Taq*-Polymerase) erhöht. Desweiteren wurde die Annealing-Temperatur von 53 °C auf 54 °C und 56 °C erhöht. Unter folgenden Temperaturprofilen wurden die Amplifikationen durchgeführt:

***PfuTurbo*-DNA-Polymerase**

<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>	<i>Zyklen</i>
95 °C / 1 min			x 1
95 °C / 1 min	53 °C (54 °C, 56 °C)* / 1 min	72 °C / 7 min	x 27
72 °C / 10 min			x 1

Qiagen *Taq*-Polymerase

<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>	<i>Zyklen</i>
94 °C / 3 min			x 1
94 °C / 1 min	53 °C (54 °C, 56 °C)* / 1 min	72 °C / 7 min	x 27
72 °C / 10 min			x 1

Im Fall der Qiagen *Taq*-Polymerase wurde in einem weiteren Optimierungsschritt noch *Q-Solution* (ändert das Schmelzverhalten der DNA (*Taq* PCR Handbook for *Taq* DNA Polymerase, Qiagen)) zum Standard-PCR-Ansatz gegeben. Das Amplifikat wurde nach Behandlung mit Klenow-Enzym (2.12.2) und Polynukleotidkinase (2.12.3) und anschließender Elution religiert (2.12.5) und in kompetente *E. coli* JM83 transformiert (2.9.3).

* Annealing-Temperaturen in Klammern geben die Annealing-Temperatur in den einzelnen Optimierungsschritten wieder.

2.15 INFIZIEREN VON PFLANZEN

Pflanzen wurden mit den unten beschriebenen Methoden infiziert. Nach 14 Tagen wurden Blattproben entnommen, daraus Nukleinsäuren extrahiert (2.8.2) und die Proben auf das Vorhandensein von viraler DNA hin untersucht (Southern Blot-Analyse, 2.10.2)

2.15.1 INOKULUM-HERSTELLUNG

Um Pflanzen mit klonierter Virus-Monomer-DNA infizieren zu können, muss zuvor der Plasmid-Vektor, in dem das virale Genom kloniert wurde, entfernt werden. Das Virus-Genom wurde dazu mit folgenden Restriktionsenzymen aus dem Vektor herausgeschnitten: AbMV DNA A, AbMV-CP-Mutanten DNA A, sowie SiGMV/CR DNA A und SiGMV/Ho_{yy} DNA A wurden mit *Pst* I, AbMV DNA B und SiGMV/Ho_{yy} DNA B mit *Sst* I und SiGMV/CR DNA B mit *EcoR* V wie folgt restringiert:

DNA [1 µg/µl]	100 µl
10x Restriktionspuffer	20 µl
H ₂ O	75 µl
Restriktionsenzym	5 µl
Gesamtvolumen	200 µl

Nach einer Inkubation von drei Stunden bei 37°C wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform zur Entfernung des Restriktionsenzym ausgeschüttelt, d.h. es wurden 200 µl Phenol/Chloroform (1:1, v/v) zugegeben, kurz geschüttelt, zentrifugiert und die obere wässrige, DNA-haltige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Fällung der DNA mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 4,8) und 2 Volumen absoluten Ethanol über Nacht bei -20°C wurde die DNA sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5417C, max. UpM, 10 min, RT), gewaschen (70% Ethanol), getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen (die Konzentration an Virus-DNA betrug dann 1 µg/µl).

2.15.2 INFIZIEREN VON PFLANZEN DURCH MECHANISCHE INOKULATION

Vor dem Aufreiben (mechanische Inokulation) wurde die DNA A mit der DNA B gemischt. Jeweils 1 µg Inokulum-DNA A und 1 µg Inokulum-DNA B (in einem Volumen von 10 µl) wurden auf ein mit Carborundum bestäubtes Blatt aufgerieben. Beim Aufreiben befanden sich die Pflanzen (*N. tabacum* cv. Samsun bzw. *N. benthamiana*) gewöhnlich im Vier-Blatt-Stadium.

2.15.3 INFIZIEREN VON PFLANZEN DURCH AGROINOKULATION

Da Pflanzen mit AbMV weder durch Aufreiben von klonierter Virus-DNA, noch durch Pflanzensaft-Übertragung (*sap transmission*; 2.15.4) infizierbar sind, wurden *N. tabacum* cv. Samsun-Pflanzen im Vier-Blatt-Stadium agroinokuliert. Es lagen bereits entsprechende *Agrobacterium tumefaciens*-Klone vor, die die AbMV DNA A bzw. DNA B enthielten und mir freundlicherweise von T. Frischmuth und P. Höfer zur Verfügung gestellt wurden.

Die Agrobakterien wurden aus einer Gefrierdauerkultur auf LB-Platten mit Rifampicin-/Kanamycin-Zusatz (2.9.1) ausgestrichen und zwei Tage bei 28 °C bebrütet. Die Bakterien wurden mit jeweils 2 ml Wasser von den Platten geschwemmt und die Agrobakteriensuspensionen im Verhältnis 1:1 gemischt. Pro Pflanze wurden 10 µl Suspension auf ein mit Carborundum bestäubtes Blatt aufgerieben. Nach zehn Tagen wurden die inokulierten Pflanzen täglich auf Symptome hin untersucht.

2.15.4 INFIZIEREN VON PFLANZEN DURCH PFLANZENSAPFTÜBERTRAGUNG (SAP TRANSMISSION)

Für die Übertragung durch Pflanzensaft (*sap transmission*) von Pflanze auf Pflanze wurden *N. benthamiana*-Pflanzen durch Aufreiben (2.15.2) mit pseudo-rekombinanten Viren (AbMV CP-Mutante DNA A / SiGMV/Ho_{yv} DNA B) infiziert. Ein symptomatisches Blatt wurde dann in 500 µl Wasser zerrieben und 10 µl bzw. 20 µl davon jeweils auf ein mit Carborundum bestäubtes Blatt von *N. tabacum* cv. Samsun (Vier-Blatt-Stadium) aufgerieben.

2.15.5 INFIZIEREN VON PFLANZEN DURCH PARTIKELBESCHUSS

Keimlinge von *S. rhombifolia* und *L. esculentum* cv. Moneymaker sollten durch Beschuss von Virus-DNA-beschichteten Goldmikroprojektilen mit einer Partikelkanone (Biolistic® Particle Delivery System PDS-1000/He, Bio-Rad) infiziert werden. Zum Beschuss wurde der *500 Optimization Kit for PDS-1000/He Particle Delivery System* verwendet.

2.15.5.1 Vorbereiten der Goldmikroprojekteile

In einem 2 ml-*Safe-Lock*-Eppendorfgefäß wurden 60 mg Gold (1,0 µm Partikelgröße) eingewogen und zehn Minuten in 70 %-Ethanol durch wiederholtes Mischen gewaschen. Anschließend wurde die Goldsuspension kurz zentrifugiert (8-10 sec.) und das Sediment in sterilem Wasser aufgenommen, gemischt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurde der Gold-Niederschlag in 1 ml 50 % (v/v) Glycerin-Lösung (in H₂O, steril) aufgenommen, resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.15.5.2 Vorbereiten der Macrocarrier

Zuerst wurde die Goldsuspension (2.15.5.1) gut homogenisiert und 25 µl (50 µl) davon in ein 2 ml-*Safe-Lock*-Eppendorfgefäß pipettiert. Es wurden jeweils 2,5 µl (5,0 µl) Inokulum-DNA A und Inokulum-DNA B (jeweils 1 µg/µl) (2.15.1) bzw. 5 µg isolierte Virus-DNA aus Pflanzen (2.8.2) zugegeben, vier Minuten gut gemischt und danach kurz auf Eis gestellt. An den Rand des liegenden Eppendorf-Gefäß wurden 10 µl (20 µl) 0,1 M Spermidin und 25 µl (50 µl) 2,5 mM CaCl₂ pipettiert und anschließend drei Minuten lang gut mit dem Gold durchmischt. Durch kurzes Zentrifugieren (8-10 sec) wurde das Gold sedimentiert und zweimal mit 70 %-Ethanol gewaschen (Überstand abziehen, Sediment in 250 µl 70 %-Ethanol resuspendieren, kurz zentrifugieren). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Gold in 36 µl (72 µl) 98 %-Ethanol aufgenommen und gut resuspendiert. Pro Macrocarrier wurden 6 µl Suspension aufgetragen, gleichmäßig verteilt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die oben angegebenen Mengen reichten für 5 (10) Schuss.

2.15.5.3 Partikelbeschuss

S. rhombifolia-Keimlinge wurden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien beschossen. Zum einen wurden Keimlinge beschossen, bei denen die Kotyledonen und die Radicula gerade sichtbar waren, zum anderen Keimlinge, bei denen neben gut ausgebildeten Kotyledonen schon die ersten Folgeblätter vorhanden waren. *L. esculentum* cv. Moneymaker-Keimlinge wurden beschossen, sobald die Keimblätter und die Keimwurzel sichtbar waren. Es wurden mehrere Keimlinge (in der Regel drei Stück) gleichzeitig beschossen, wobei darauf geachtet wurde, dass vor allem die Kotyledonen und das Hypokotyl getroffen wurden. Der Beschuss erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers, wobei auf eine Sterilisation der Geräteteile verzichtet wurde. Die Pflanzen wurden mit unterschiedlichen Berstdrücken von 900, 1100 und 1350 PSI beschossen. Nach dem Beschuss wurden die Keimlinge in Erde gepflanzt und mindestens zweimal pro Woche auf die Ausbildung von Symptomen hin untersucht.

Beim Beschuss von *N. benthamiana*-Blättern wurde jeweils ein ca. 1 DM-Stück großes Blatt mit Goldmikroprojektilen beschossen. Der Beschuss erfolgte mit Inokulum-DNA A und B (2.15.5.2) beschichteten Goldmikroprojektilen. Die verwendeten Berstdrücke betragen 900 und 1100 PSI. Im Anschluss an den Beschuss wurden die Blätter in eine feuchte Kammer überführt und ein bis zwei Wochen im Lichtschrank inkubiert. Nach ca. einer und zwei Wochen wurden Nukleinsäuren aus den Blättern extrahiert (2.8.2) und auf das Vorhandensein von replikativen DNA-Formen hin untersucht (Southern Blot-Analyse, 2.10.2).

2.16 ÜBERTRAGUNGSVERSUCHE VON VIREN DURCH DIE WEIßE FLIEGE (*B. TABACI*)

Eine Kolonie des M-Biotyps von *B. tabaci*, die 1985 in der Türkei gesammelt wurde (Bedford *et al.*, 1994a), wurde auf *Hibiscus rosa-sinensis* L. in Plexiglas-Käfigen bei 25 °C Lufttemperatur und 16 Stunden Photoperiode gehalten. Um die Übertragbarkeit der einzelnen Viren durch die Weiße Fliege *B. tabaci* zu testen, wurden zu einer mit dem zu testenden Virus infizierten Pflanze (*source plant*) ca. 300 bis 400 Weiße Fliegen für drei bis vier Tage in einen Käfig gegeben (Akquisitionszeit (AAP)). Danach wurden entweder zu der infizierten Pflanze (*source plant*) in den selben Käfig ein bis drei nicht-infizierte *N. tabacum* cv. Samsun nn-Keimlinge und ein *L. esculentum* cv. Kondine Red-Keimling (*target plants*) für die Dauer von fünf bis sechs Tagen gestellt (Inokulationszeit (IAP)), oder aber die nicht-infizierten Pflanzen (*target plants*) wurden in einen kleinen Einzelkäfig aus Plexiglas gestellt und dazu wurden ungefähr 50 Weiße Fliegen, die zuvor auf der infizierten Pflanze (*source plant*) saugten, gegeben (sogenanntes *no choice*-Experiment). Nach fünf bis sechs Tagen IAP wurden die Weißen Fliegen abgetötet und die durch die Weißen Fliegen inokulierten Pflanzen (*target plants*) in insektensichere Plexiglaskäfige überführt und täglich auf die Ausbildung von Symptomen hin untersucht. Nach 14 Tagen wurden diese Pflanzen (*target plants*) auf das Vorhandensein von viraler DNA untersucht (Southern Blot-Analyse, 2.10.2). Ebenso wurde jede infizierte Ausgangs-Pflanze (*source plant*) analysiert.

Um die Aufrechterhaltung der gesetzten Mutation(en) im Kapsidprotein-Gen nach der Übertragung durch *B. tabaci* zu bestätigen, wurde das Kapsidprotein-Gen aus Nukleinsäure-Präparationen von Weiße Fliegen-inokulierten Pflanzen (*target plants*) amplifiziert (2.11 (c)) und anschließend sequenziert (2.13).

Proben von zehn bis 20 Weißen Fliegen, die nach drei bzw. sechs Tagen AAP genommen wurden, wurden auf Virus-Aufnahme (Akquisition) untersucht. Dazu wurden Gesamt-Nukleinsäuren aus den Weißen Fliegen isoliert (2.8.3) und entweder durch PCR-Analyse (2.11 (b)) oder Southern Blot-Hybridisierung (2.10.2) analysiert.

3 ERGEBNISSE

Das Ziel der Arbeit war es, die Kapsidproteindeterminanten zu bestimmen, die für die Übertragbarkeit des *Abutilon mosaic virus* durch die Weiße Fliege *B. tabaci* verantwortlich sind. Dies wurde anhand der durch die Weiße Fliege übertragbaren Viren SiGMV/CR und SiGMV/Ho_{yy} und dem nicht-übertragbaren Virus AbMV untersucht.

3.1 INFEKTIÖSITÄT UND ÜBERTRAGBARKEIT VON AbMV, SiGMV/CR, SiGMV/HO_{yy} UND DEREN PSEUDOREKOMBINATIONEN

Die Infektiösität von AbMV, SiGMV/CR, SiGMV/Ho_{yy} und deren pseudorekombinante Viren in verschiedenen Wirtspflanzen wurde bereits untersucht (Höfer *et al.*, 1997a,b,c; Unseld *et al.*, 2000) (Tabelle 3.1). In diesen Experimenten wurden verschiedene Wirtspflanzen durch Agroinokulation infiziert. Mit AbMV,

Tabelle 3.1: Infektiösität und Übertragbarkeit von AbMV, SiGMV/CR, SiGMV/Ho_{yy} und deren pseudorekombinanter Viren.

Nach Höfer *et al.*, 1997a,b,c; Unseld *et al.*, 2000; persönliche Mitteilung P. Höfer.

Virus	durch <i>B. tabaci</i>		Übertragungsrate
	infektiös	übertragbar	
AbMV A + B	ja	nein*	0 %
SiGMV/CR A + B	ja	ja	92 %
SiGMV/Ho _{yy} A + B	ja	ja	100 %
AbMV A / SiGMV/CR B	ja	nein*	0 %
SiGMV/CR A / AbMV B	nein	–	–
AbMV A / SiGMV/Ho _{yy} B	ja	nein*	0 %
SiGMV/Ho _{yy} A / AbMV B	ja	ja	30 %
AbMV-Chimär A / AbMV B	ja	ja	20 %

*: virale DNA in Weißen Fliegen nachweisbar

SiGMV/CR, SiGMV/Ho_{yv} und deren pseudorekombinanten Viren infizierte Pflanzen wurden für Übertragungsversuche mit der Weißen Fliege *B. tabaci* eingesetzt. Alle getesteten Viren wurden von der Weißen Fliege aus infizierten Tabak- (*N. tabacum*) und *S. rhombifolia*-Pflanzen aufgenommen (Höfer *et al.*, 1997a, persönliche Mitteilung P. Höfer) (Tabelle 3.1). Virale DNA konnte in Weißen Fliegen, die an SiGMV/CR-, SiGMV/Ho_{yv}- und AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B-infizierten Pflanzen saugten, durch Southern Blot-Hybridisierung nachgewiesen werden (Höfer *et al.*, 1997a, persönliche Mitteilung P. Höfer), dagegen konnte virale DNA in Weißen Fliegen, die auf AbMV- und SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B-infizierten Pflanzen saugten, nur durch PCR-Analyse detektiert werden (Höfer *et al.*, 1997a, persönliche Mitteilung P. Höfer). Das bedeutet, dass die Akkumulation von viraler DNA in Weißen Fliegen, die an SiGMV/CR-, SiGMV/Ho_{yv}- und AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B-inokulierten Pflanzen saugten, wesentlich höher war, als in Weißen Fliegen, die an AbMV- und SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B-infizierten Pflanzen saugten. Trotz der effizienten Aufnahme des pseudorekombinanten Virus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B durch die Weiße Fliege wurden nur SiGMV/CR, SiGMV/Ho_{yv} und SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B durch *B. tabaci* auf nicht-infizierte Pflanzen übertragen (Höfer *et al.*, 1997a, persönliche Mitteilung P. Höfer) (Tabelle 3.1). Da das pseudorekombinante Virus SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B Weiße Fliege-übertragbar war, bedeutet das, dass die DNA B von AbMV nicht in die Nicht-Übertragbarkeit von AbMV involviert ist. Die Akkumulation von viraler DNA in der Weißen Fliege ist kein Indikator dafür, ob ein Virus übertragen werden kann oder nicht. Das pseudorekombinante Virus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B wurde im Gegensatz zu SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B zwar wesentlich effizienter von der Weißen Fliege aufgenommen, aber nicht übertragen.

3.2 INFEKTIÖSITÄT UND ÜBERTRAGBARKEIT DER SiGMV/CR-KAPSIDPROTEIN-CHIMÄRE

Durch Übertragungsversuche mit dem AbMV-Chimär-Konstrukt, bei dem das Kapsidprotein von AbMV durch das des SiGMV/CR ersetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass der alleinige Austausch des Kapsidproteingens hinreichend ist, um aus dem nicht-übertragbaren AbMV ein übertragbares Virus zu machen (Höfer *et al.*, 1997a) (Tabelle 3.1). Übertragungsexperimente mit pseudo-rekombinanten Viren zeigten darüber hinaus, dass die DNA B keinen direkten Einfluss auf die Übertragung durch *B. tabaci* hat (vgl. 3.1). Das Kapsidprotein ist also das einzige Genprodukt, das (direkt) für die Übertragung durch die Weiße Fliege notwendig ist. Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Kapsidproteine von AbMV und SiGMV/CR zeigt, dass der N-terminale Teil (Aminosäuren 1-61) sehr heterolog ist (wird im Folgenden als variabler Teil bezeichnet), während der C-terminale Teil des Kapsidproteins (Aminosäuren 62-251) hoch homolog ist (wird im Folgenden als konstanter Teil bezeichnet) (Abbildung 3-1). Um die

	1			
AbMV/WI	MPKRDLPWRSMPGTSKTSRNANYSRARIIGPRVDKASEWVHRPMYRKPRI			
SiGMV/CR	MPKRDVPWRNIAGTSKVSRSNSDSPRAGSGPKFYKAARWVDRPMYRKPRI			
	51	61		
AbMV/WI	YRTLRTADVPRGCEGPKVQSYEQRHDI SHVGKVMCISDVTRGNGITHRV			
SiGMV/CR	YRILRTPDVPRGCEGPKVQSYEQRHDI SHVGKVMCISDVTRGNGITHRV			
	101	124	149	
AbMV/WI	GKRFCVKS SVYILGKI WMDENIKLQ	NHTNSVMFWLVRDRRPYGTPMDFGHV		
SiGMV/CR	GKRFCVKS SVYILGKI WMDENIKL	KNHTNSVMFWLVRDRRPYGTPMDFGQV		
	151	174	179	193
AbMV/WI	FNMFDNEPSTATVKNDLRDRYQV	LHKFYGKVTGGQYASNEQAI	VKRFWKV	
SiGMV/CR	FNMFDNEPSTATVKNDLRDRYQV	MHKFYAKVTGGQYASNEQAL	VKRFWKV	
	201		249	
AbMV/WI	NNHVVYNHQEAGKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSL MN			
SiGMV/CR	NNHVVYNHQEAGKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSI MN			

Abbildung 3-1: Aminosäure-Sequenzvergleich der Kapsidproteine von AbMV/WI und SiGMV/CR.

Im variablen, N-terminalen Teil des CP (Aminosäuren 1-61) sind die Aminosäuren kursiv dargestellt. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt. Zahlen kennzeichnen die betreffenden Aminosäure-Positionen. AbMV/WI: *Abutilon mosaic virus*/West Indies (diese Arbeit), SiGMV/CR: *Sida golden mosaic virus*/Costa Rica.

Lokalisierung der Determinante / der Determinanten, die für die Übertragbarkeit verantwortlich ist / sind, näher eingrenzen zu können, wurde in SiGMV/CR der variable Teil des Kapsidproteins durch den entsprechenden des AbMV ersetzt (Konstrukt L, Abbildung 2-1). Dieses SiGMV/CR-CP-chimäre Virus war infektiös (Tabelle 3.2), und virale DNA konnte in infizierten Pflanzen durch Southern Blot-Analyse nachgewiesen werden (Spur L in Abbildung 3.5). Desweiteren konnte dieses chimäre Virus von infizierten *S. rhombifolia*-Pflanzen auf nicht-infizierte Tabak-Pflanzen durch die Weiße Fliege übertragen werden (Tabelle 3.3). Virale DNA konnte in durch Weiße Fliegen infizierten Pflanzen durch Southern Blot-Analyse nachgewiesen werden (Spur L(t) in Abbildung 3-8). Wurde hingegen dieser CP-Abschnitt in AbMV durch den des SiGMV/CR ersetzt, konnte in Weißen Fliegen zwar virale DNA nachgewiesen werden, aber das chimäre Virus wurde nicht übertragen (Konstrukt C in Tabelle 3.3, Abbildung 2-1) (persönliche Mitteilung P. Höfer).

Tabelle 3.2: Mechanische Inokulation von *N. tabacum* mit AbMV, SiGMV/CR, SiGMV/Ho_{yv} und deren Pseudorekombinationen, sowie von SiGMV/CR-CP-Chimär (Konstrukt L) und AbMV-CP-Chimär (Konstrukt C).

Inokuliertes Virus bzw. pseudorekombinantes Virus	Infektiösität (infiziert / inokuliert)
AbMV A + AbMV B	5/30 ^a
SiGMV/CR A + SiGMV/CR B	5/9; 21/28; 28/30
SiGMV/Ho _{yv} A + SiGMV/Ho _{yv} B	8/9 ^{a, b, d} ; 5/5 ^{a, b, e}
AbMV A + SiGMV/Ho _{yv} B	2/10; 13/30
SiGMV/Ho _{yv} A + AbMV B	0/30; 0/30
C + AbMV B	9/10 ^{a, c}
L + SiGMV/CR B	17/23 ^b ; 34/40 ^b
N + SiGMV/Ho _{yv} B	3/10; 10/13
O + SiGMV/Ho _{yv} B	5/10; 9/16
P + SiGMV/Ho _{yv} B	1/10; 9/13
Q + SiGMV/Ho _{yv} B	2/10; 10/13
R + SiGMV/Ho _{yv} B	5/20; 12/14
H + AbMV B	10/10 ^{a, c}
S + SiGMV/Ho _{yv} B	5/15; 11/13; 13/30
U + SiGMV/Ho _{yv} B	5/20; 7/13
W + SiGMV/Ho _{yv} B	0/15; 1/13; 2/30
X + SiGMV/Ho _{yv} B	7/15; 10/13; 14/30; 8/15
Z + SiGMV/Ho _{yv} B	8/15; 7/13
A1 + SiGMV/Ho _{yv} B	5/13; 6/15; 9/30; 2/15
A2 + SiGMV/Ho _{yv} B	4/13; 3/13; 1/30

^a Pflanzen wurden inokuliert durch Agroinokulation

^b *N. benthamiana*

^c persönliche Mitteilung P. Höfer

^d Daten aus Frischmuth *et al.* (1997)

^e Daten aus Unseld *et al.* (2000)

Einzelexperimente sind durch Semikola getrennt.

Tabelle 3.3: Aufnahme und Übertragbarkeit von pseudorekombinanten Viren, AbMV, SiGMV/CR und SiGMV/Ho_{yv} durch *B. tabaci*

Virus	Infizierte Wirtspflanze	Aufnahme durch <i>B. tabaci</i> ^a	Übertragung auf ^b	
			<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	<i>Lycopersicon esculentum</i>
AbMV A + AbMV B	<i>Sida rhombifolia</i>	ja	0/6 ^{c,d} ; 0/4 ^{c,d}	–
SiGMV/CR A + SiGMV/CR B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	(2/3); 0/3; 2/2	(1/1); 0/1; 0/1
SiGMV/Ho _{yv} A + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>Sida rhombifolia</i>	ja	3/3 ^{c,e} ; 2/2 ^{c,e} ; 4/6 ^{c,e}	–
AbMV A + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	(0/3); 0/3; 0/2	(0/1); 0/1; 0/1
SiGMV/Ho _{yv} A + AbMV B	<i>Sida rhombifolia</i>	ja	0/6 ^e ; 0/2 ^e ; 0/6 ^e	–
C + AbMV B	<i>Sida rhombifolia</i>	ja	3/9 ^e ; 2/2 ^e ; 2/4 ^e	–
L + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>Sida rhombifolia</i>	ja	0/6 ^e	–
N + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>Sida rhombifolia</i>	ja	1/1	–
O + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	0/3; 0/2	0/1; 0/1
P + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	0/2	0/1
Q + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	0/2	0/1
R + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	0/1	0/1
H + AbMV B	<i>Sida rhombifolia</i>	ja	0/6 ^e	0/6 ^e ; 0/6 ^e
S + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	(0/1); 0/3; 1/2	(0/1); 0/1; 0/1
U + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	0/1	0/1
W + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	0/2	0/1
X + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	0/2; 0/3	0/1; 0/1
Z + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	0/1	0/1
A1 + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	(0/3); 2/3; 2/2	(0/1); 0/1; 1/1
A2 + SiGMV/Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	ja	(0/3); 0/3	(0/1); 0/1

^a Aufnahme wurde bestimmt durch PCR - und Southern Blot-Analyse

^b Übertragung wurde bestimmt durch Symptom -Entwicklung und Southern Blot-Analyse; angegeben sind jeweils infizierte / *B. tabaci*-inokulierte Pflanzen; Zahlen in Klammern () deuten auf andere Versuchsbedingungen hin; hier wurden die Pflanzen nicht wie bei den restl. Übertragungsexperimenten unter Einzelkäfige gestellt, sondern zu den Wirtspflanzen in denselben Käfig (vgl. 2.16)

^c Übertragung auf *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi

^d Daten aus Höfer et al., 1997a

^e Mündliche Mitteilung P. Höfer

– Experiment wurde nicht durchgeführt; einzelne Experimente sind durch Semikola voneinander getrennt.

3.3 INFEKTIÖSITÄT UND ÜBERTRAGBARKEIT VON PSEUDO-REKOMBINANTEN AbMV-CP-MUTANTEN

Aus den Übertragungsversuchen mit dem AbMV-CP-chimären (Konstrukt C) und SiGMV/CR-CP-chimären (Konstrukt L) Virus kann geschlossen werden, dass sich die Determinanten für die Übertragung durch die Weiße Fliege im konstanten Teil des Kapsidproteins befinden müssen, da nur Konstrukt L übertragen wurde (Tabelle 3.3). Der konstante Kapsidprotein-Teil ist hoch konserviert zwischen AbMV und SiGMV/CR. Nur an sechs Positionen weicht hier die Aminosäuresequenz voneinander ab, nämlich an den Positionen 124, 149, 174, 179, 193 und 249 (Abbildung 3-1). Alle sechs Aminosäuren in AbMV wurden gegen diejenigen, die an entsprechender Stelle in SiGMV/CR gefunden werden, einzeln ausgetauscht (Abbildung 2-1, Konstrukte N, O, P, Q, R und H; zur Herstellung siehe Kapitel 2.14; Konstrukt H lag bereits als Bitmerklon vor, persönliche Mitteilung P. Höfer). Obwohl die Konstrukte N, O, P, Q und R nur als Monomere vorlagen, wurde zunächst auf die aufwendige Bitmerklonierung verzichtet und versucht, durch Partikelbeschuss (2.15.5) mit Monomer-DNA der CP-mutierten AbMV DNA A in Kombination mit der DNA B von AbMV *Sida*- oder Tomaten-Keimlinge zu infizieren (Tabelle 3.4, Konstrukte N, O, P, Q). Zur Kontrolle wurden *Sida*-Keimlinge sowohl mit Monomer-, als auch mit Bitmer-DNA von AbMV beschossen. Der Beschuss der Pflanzen erfolgte mit jeweils unterschiedlichen Berstdrücken (900, 1100 und 1350 PSI). Dabei gelang es nur, eine Kontrollpflanze mit AbMV (Bitmer-DNA) zu infizieren (Tabelle 3.4). Daraufhin wurde die zum Beschuss eingesetzte DNA auf ihre Infektiosität getestet. Dazu wurden kleine Blätter von *N. benthamiana* nach der gleichen Methode wie die *Sida*- und Tomaten-Keimlinge beschossen (2.15.5). Nach ein bis zwei Wochen wurden aus den Blättern Nukleinsäuren extrahiert und auf das Vorkommen von replikativen DNA-Formen durch Southern Blot-Hybridisierung analysiert. Die Inokulum-DNA war in den meisten Fällen noch gut erkennbar (mit »lin« bezeichnete Banden in den Spuren 1, 3–10 in Abbildung 3-2) und nur in den seltensten Fällen konnten replikative DNA-Formen (*open circle*-, *supercoiled*-DNA und *ssDNA*) nachgewiesen werden (Spuren 1 und 6 in Abbildung 3-2). Anscheinend haftet die zu inokulierende DNA so gut an den Goldmikroprojekten,

Tabelle 3.4: Partikelbeschuss von *S. rhombifolia* und *L. esculentum* mit Monomer DNA von AbMV-CP-Mutanten DNA A / AbMV DNA B.

Zur Kontrolle wurden Pflanzen sowohl mit der Monomer-, wie auch Bitmer-DNA von AbMV (Wildtyp) beschossen.

Virus	Berstdruck (PSI)	Beschuss von ^a	
		<i>S. rhombifolia</i>	<i>L. esculentum</i>
N + AbMV B (Monomere)	900	0/9; 0/6; 0/6; 0/6	0/2
	1 100	0/6; 0/6; 0/6; 0/6	0/2
	1 350	0/6; 0/3; 0/3; 0/2	0/2
O + AbMV B (Monomere)	900	0/9; 0/6; 0/6; 0/6	0/2
	1 100	0/6; 0/6; 0/6; 0/6	0/2
	1 350	0/6; 0/3; 0/3; 0/2	0/2
P + AbMV B (Monomere)	900	–	0/2
	1 100	–	0/2
	1 350	–	0/2
Q + AbMV B (Monomere)	900	–	0/2
	1 100	–	0/2
	1 350	–	0/2
AbMV A+B (Monomere)	900	0/6; 0/6	0/2
	1 100	0/6; 0/2	0/2
	1 350	0/3; 0/2	0/2
AbMV A+B (Bitmere)	900	1/3	–
	1 100	0/3	–

^a Anzahl infizierter / inokulierter (beschossener) Pflanzen

–: Experiment nicht durchgeführt

Einzelne Experimente sind durch Semikola getrennt

dass sie sich kaum von ihnen ablöst und somit repliziert werden kann. Dies könnte eine Erklärung für die schlechten Infektionsraten durch Partikelbeschuss sein. Parallel zu diesen Versuchen wurde versucht, von den als Monomer-Klonen vorliegenden Konstrukten N, O, P, Q und R Bitmer-Klone, die ein Vielfaches des Virusgenoms enthalten, herzustellen. Zur Herstellung der Bitmerklone wurde der Rumpfklon des AbMV, der mir freundlicherweise von P. Höfer zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Der Rumpfklon enthält bereits ein Teilstück (sog. »Bit-Stück«) des AbMV-Genoms (Persönliche Mitteilung P. Höfer) (Abbildung 3-3).

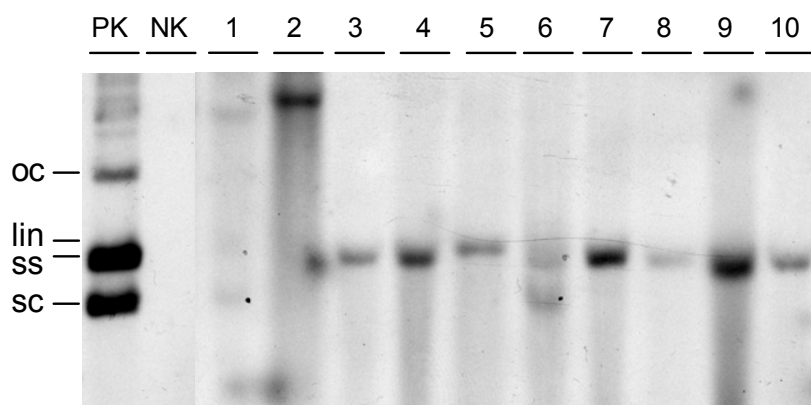


Abbildung 3-2: Southern Blot-Analyse von *N. benthamiana*-Blättchen transfiziert durch Partikelbeschuss.

N. benthamiana-Blättchen wurden mit Monomeren der DNA A der AbMV-CP-Mutanten P (Spuren 3-6) und Q (Spuren 7-10) jeweils in Kombination mit AbMV DNA B beschossen. Als Kontrolle wurden Bitmere von AbMV DNA A und B geschossen (Spuren 1, 2). Der Beschuss erfolgte mit 900 PSI (Spuren 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10) bzw. 1 100 PSI (Spuren 2, 5, 9). Blätter wurden nach dem Beschuss im Lichtschrank inkubiert und nach 7 (Spuren 1, 3, 4, 7, 8) bzw. 14 Tagen (Spuren 2, 5, 6, 9, 10) analysiert. Es wurden jeweils 10 µg der isolierten Nukleinsäuren aufgetragen. PK: 3 µg DNA isoliert aus einer AbMV-infizierten Pflanze. NK: Extrakt aus einer nicht-infizierten Pflanze. Der Blot wurde mit einer AbMV A-spezifischen Sonde hybridisiert. oc: *open circle* DNA, lin: lineare, doppelsträngige DNA, ss: Einzelstrang-DNA, sc: *supercoiled* DNA.

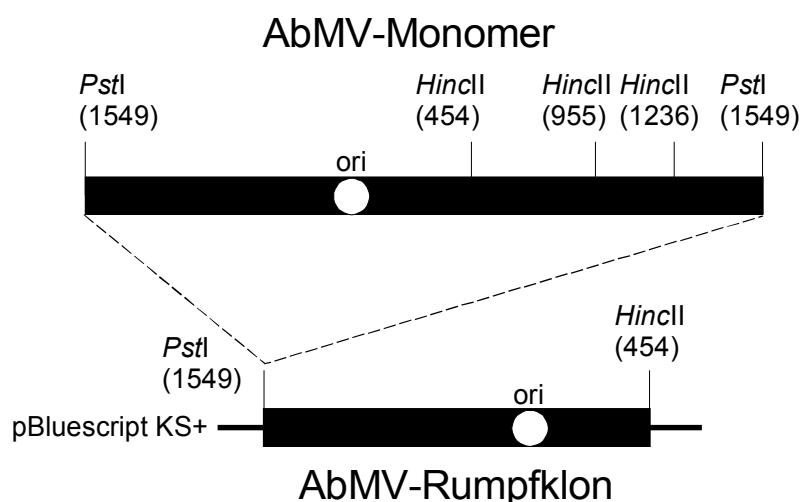


Abbildung 3-3: Strategie zur Herstellung des AbMV-Bitmerkklons.

Die Klonierungsstrategie ist im Text detailliert beschrieben. ori = Replikationsursprung.

Diesem Rumpfklon fehlt die AbMV-Sequenz zwischen den Restriktionsschnittstellen *Hinc* II (454) und *Pst* I (1549) und somit größtenteils die Sequenz des Kapsidproteingens (Nukleotide 457-1553) (Abbildung 3-3). In diesen, durch *Pst* I linearisierten AbMV-Rumpfklon sollten die durch *Pst* I aus ihrem pBluescript-Vektor herausgeschnittenen AbMV-Monomere der Konstrukte N, O, P, Q und R ligiert werden (Abbildung 3-3; Kapitel 2.14). Da diese Methode nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde ein anderer Weg beschritten, um an Bitmerklone der betreffenden Konstrukte zu kommen. Da Konstrukt H (Abbildung 2-1), wie oben beschrieben, als Bitmer-Klon vorlag (persönliche Mitteilung P. Höfer), wurde versucht, mittels ortsspezifischer PCR-Mutagenese die in diesem Konstrukt gesetzte Mutation (Austausch von Lysin an Position 249 gegen Isoleucin) wieder rückgängig zu machen, um so einen AbMV DNA A-Wildtyp-Bitmerklon zu erhalten (vgl. Kapitel 2.14). Für die PCR wurde die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase von Stratagene eingesetzt, die laut Hersteller Fragmente bis zu 10kb amplifizieren soll; der zu amplifizierende Bitmerklon hat eine Größe von ungefähr 7 kb. Auch nach mehreren Optimierungsversuchen der PCR konnte keine hinreichende Ausbeute an gewünschtem Amplifikat erhalten werden. Eine etwas größere Ausbeute an gewünschtem Amplifikat ließ sich zwar mit Hilfe der Qiagen *Taq*-Polymerase und *Q-Solution*-Zusatz erhalten. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Amplifikat sich nicht klonieren ließ.

Wie von M. Ringel herausgefunden, lassen sich *N. benthamiana*-Keimlinge durch Aufreiben mit AbMV DNA A in Kombination mit der DNA B des SiGMV/Ho_{yv}* infizieren (persönliche Mitteilung M. Ringel). Daraufhin wurden *N. benthamiana*-Keimlinge mit den pseudorekombinanten Viren bestehend aus der mutierten AbMV-DNA A (Konstrukte N, O, P, Q und R) und SiGMV/Ho_{yv} DNA B mechanisch inokuliert (2.15.2). Nach ca. zwölf Tagen zeigten mehr als 50% der inokulierten Pflanzen Symptome. Die pseudorekombinanten Viren ließen sich durch Pflanzensaft-Übertragung (*sap transmission*) auf nicht-infizierte *N. tabacum* cv. Samsun-Keimlinge übertragen. Nach ungefähr zwei Wochen zeigte etwa die Hälfte der Pflanzensaft-inokulierten Tabak-Pflanzen Symptome und virale DNA

* Es gibt insgesamt zwei verschiedene DNA B von SiGMV/Ho_{yv} (Frischmuth *et al.* 1997); in diesem Fall und in dieser Arbeit wurde SiGMV/Ho_{yv} DNA B₁ verwendet.

konnte durch Southern Blot-Analyse in diesen Pflanzen nachgewiesen werden, wie beispielhaft für die pseudorekombinanten Viren, bestehend aus N, O bzw. P und SiGMV/Ho_{yv} DNA B, in Abbildung 3-4 (Spuren N, O, P) dargestellt ist. Weitere Versuche ergaben, dass *N. tabacum*-Keimlinge direkt infiziert werden können durch mechanische Inokulation mit den pseudorekombinanten Viren bestehend aus der DNA A der AbMV-CP-Mutanten (Konstrukte N, O, P, Q bzw. R; Abbildung 2-1) in Kombination mit SiGMV/Ho_{yv} DNA B (Tabelle 3.2). Virale DNA konnte durch Southern Blot-Analyse in infizierten Pflanzen nachgewiesen werden (Spuren N bis R in Abbildung 3-5). Die Symptome, die diese pseudorekombinanten Viren in den infizierten Pflanzen hervorrufen, entsprechen eher denen von SiGMV/Ho_{yv}, d.h. sie sind im Vergleich zu AbMV, das nur sehr milde Symptome in *N. tabacum* erzeugt, deutlich stärker. So zeigen die mit den pseudorekombinanten Viren infizierten Pflanzen eine deutliche Stauchung im Wuchs, sowie ein deutliches Einrollen der Blätter. Auch sind die Blattadern im Gegensatz zu AbMV-infizierten Tabak-Pflanzen angeschwollen (Abbildung 3-6). Diese Ergebnisse sind nicht weiter verwunderlich, da die DNA B für die Symptomausprägung verantwortlich ist (von Arnim & Stanley, 1992; Pascal *et al.*, 1993).

Pflanzen, die mit den oben erwähnten pseudorekombinanten Viren infiziert wurden, wurden für Übertragungsversuche mit der Weißen Fliege *B. tabaci* eingesetzt. Nach drei bzw. vier Tagen Akquisitionszeit (AAP) wurden die Weißen Fliegen auf nicht-infizierte *N. tabacum*- und *L. esculentum*-Keimlinge transferiert. Jeweils zehn bis 20 Weiße Fliegen wurden auf die Aufnahme von viraler DNA hin untersucht. Es zeigte sich, dass alle fünf pseudorekombinanten Viren aufgenommen wurden (Tabelle 3.3). Virale DNA ließ sich durch Southern Blot-Hybridisierung in Weißen Fliegen, wie beispielhaft für das Konstrukt Q in Abbildung 3-7A (Spuren Q 3d, Q 6d) dargestellt und durch PCR-Analyse (Amplifikation des CP-Gens; Spuren N, O, P, Q und R in Abbildung 3-7B) nachweisen. Jedoch wurden diese Viren nicht übertragen (Tabelle 3.3). Keine virale DNA ließ sich in Weiße Fliegen-inokulierten Pflanzen durch Southern Blot-Hybridisierung nachweisen (Spuren N (e), N (t), O (e), O (t), P (e), P (t), Q (e), Q (t), R (e) und R (t) in Abbildung 3-8). In entsprechenden Übertragungsversuchen konnte P. Höfer (persönliche Mitteilung) zeigen, dass Konstrukt H zwar ebenfalls

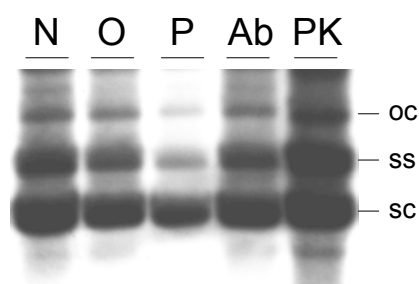


Abbildung 3-4: Southern Blot-Analyse von Pflanzensaft-infizierten *N. tabacum*.

N. tabacum cv. Samsun-Keimlinge wurden infiziert mit Pflanzensaft aus Pflanzen, die mit dem pseudorekombinanten Virus, bestehend aus der DNA A der AbMV-CP-Mutante N, O, P bzw. des AbMV-Wildtyps (Ab) und der DNA B des SiGMV/Ho_{yy}, infiziert wurden. Es wurden jeweils 10 µg isolierte Nukleinsäuren aufgetragen. PK: 3 µg einer AbMV-infizierten Pflanze. Der Blot wurde mit einer AbMV A-spezifischen Sonde hybridisiert. Virale *open circle* (oc), *single stranded* (ss) und *supercoiled* (sc) DNA-Formen sind angezeigt.

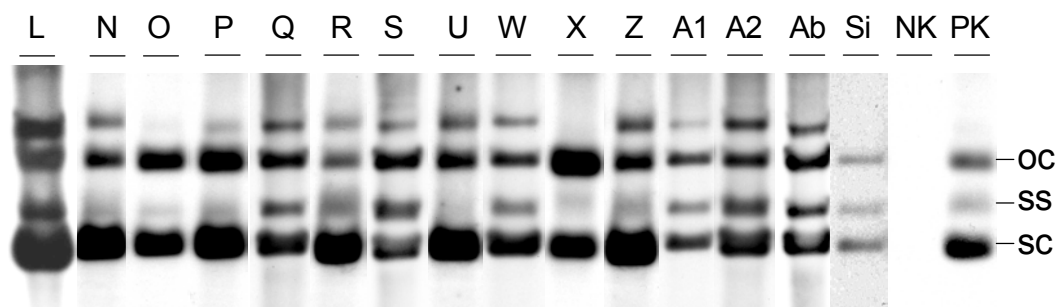


Abbildung 3-5: Southern Blot-Analyse von DNA-inokulierten Tabak-Pflanzen.

N. tabacum cv. Samsun-Pflanzen wurden mit SiGMV-CP-Chimär (L), den pseudorekombinanten Viren, bestehend aus der DNA A von AbMV (Ab) bzw. den AbMV-CP-Mutanten (N, O, P, Q, R, S, U, W, X, Z, A1, A2) und der DNA B des SiGMV/Ho_{yy} sowie SiGMV/CR (Si), infiziert. Aus symptomatischen Blättern wurden Nukleinsäuren isoliert und jeweils 10 µg davon aufgetragen. NK: Extrakt aus einer nicht-infizierten Pflanze. PK: 4 µg einer AbMV-infizierten Pflanze. Der Blot wurde mit einer AbMV DNA A-spezifischen Sonde hybridisiert, die mit SiGMV kreuz-hybridisiert. Virale *open circle* (oc), *single stranded* (ss) und *supercoiled* (sc) DNA-Formen sind gekennzeichnet.

von *B. tabaci* aufgenommen, aber nicht übertragen wurde.

Da der Austausch einzelner Aminosäuren im AbMV-Kapsidprotein nicht zu einer Übertragbarkeit durch *B. tabaci* führte, wurden nun zwei bzw. drei Aminosäuren im AbMV-Kapsidprotein gegen die, die an entsprechender Stelle des SiGMV/CR-Kapsidproteins vorkommen, gleichzeitig ausgetauscht (Konstrukte S, U, W, X, Z, A1 und A2; Abbildung 2-1). Alle Kapsidprotein-Mutanten waren infektiös, wenn sie zusammen mit SiGMV/Ho_{yv} DNA B mechanisch inokuliert wurden (Tabelle 3.2). Virale DNA ließ sich in infizierten Pflanzen durch Southern Blot-Analyse nachweisen (Spuren S, U, W, X, Z, A1 und A2 in Abbildung 3-5). Mit diesen infizierten Tabak-Pflanzen wurden Übertragungsexperimente durchgeführt. Nachdem drei bis vier Tage lang Weiße Fliegen an diesen Pflanzen saugen konnten, wurden sie auf nicht-infizierte Tabak- und Tomaten-Keimlinge transferiert. Alle pseudorekombinanten Viren wurden von *B. tabaci* auf-

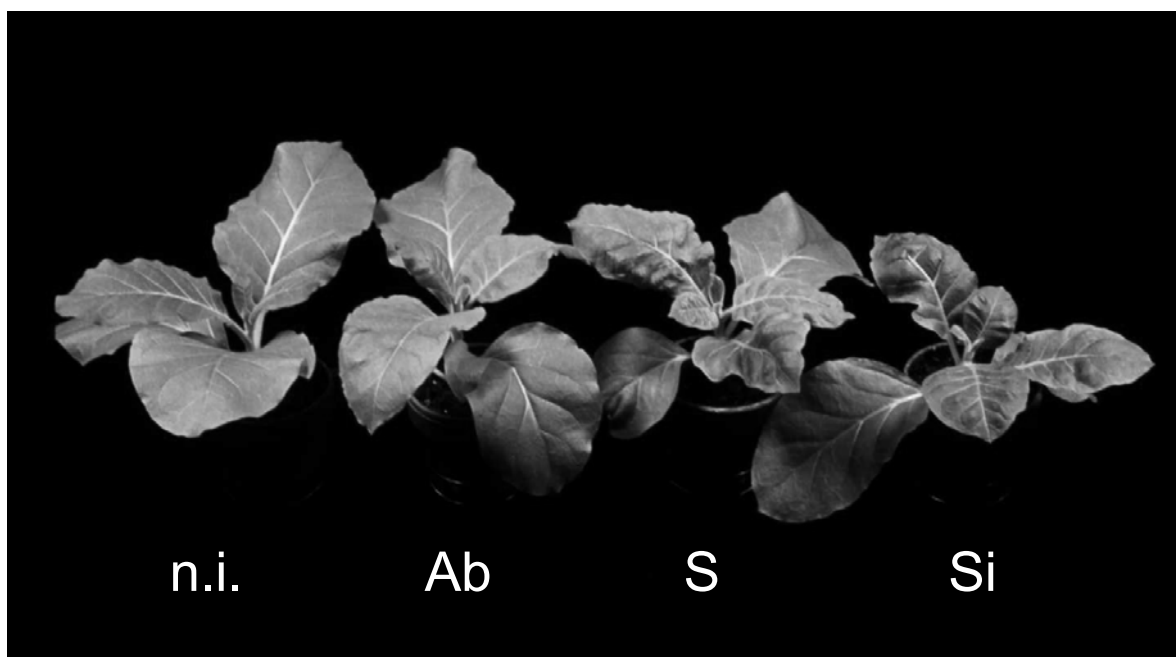


Abbildung 3-6: Symptome infizierter Tabak-Pflanzen

N. tabacum cv. Samsun-Pflanzen wurden mit AbMV (Ab), SiGMV/CR (Si) und dem pseudorekombinanten Virus AbMV-CP-Mutante S / SiGMV/Ho_{yv} B infiziert. Pflanzen wurden entweder mechanisch (S, Si) oder durch Agroiinokulation (Ab) infiziert; n.i.= nicht infizierte Pflanze.

genommen. Dies konnte durch Detektion von viraler DNA in Weißen Fliegen durch Southern Blot-Hybridisierung, wie beispielhaft dargestellt für die Konstrukte S, X, A1 und A2 in Abbildung 3-7A (Spuren S 3d, S 6d, X 3d, X 6d, A1 3d, A1 6d, A2 3d und A2 6d), und durch PCR-Analyse (Spuren S, U, W, X, Z, A1 und A2 in Abbildung 3-7B) gezeigt werden. Die beiden pseudorekombinanten Viren, bestehend aus dem Konstrukt S (Austausch von Glutamin gegen Lysin an Position 124 und Histidin gegen Glutamin an Position 149) bzw. Konstrukt A1 (Austausch von Glutamin gegen Lysin an Position 124, Histidin gegen Glutamin an Position 149 und Leucin gegen Methionin an Position 174) und SiGMV/Ho_{yv} DNA B, wurden von der Weißen Fliege auf nicht-infizierte Pflanzen übertragen (Tabelle 3.3). Virale DNA dieser Viren konnte in Weiße Fliegen-inokulierten Pflanzen nachgewiesen werden (Spuren S (t), A1 (t) und A1 (e) in Abbildung 3-8). Alle übrigen pseudorekombinanten Viren wurden dagegen nicht übertragen (Tabelle 3.3). Keine virale DNA war hier in Weiße Fliegen-inokulierten Pflanzen durch Southern Blot-Analyse detektierbar (Abbildung 3-8; Spuren U (t), U (e), W (t), W (e), X (t), X (e), Z (t), Z (e), A2 (t) und A2 (e)).

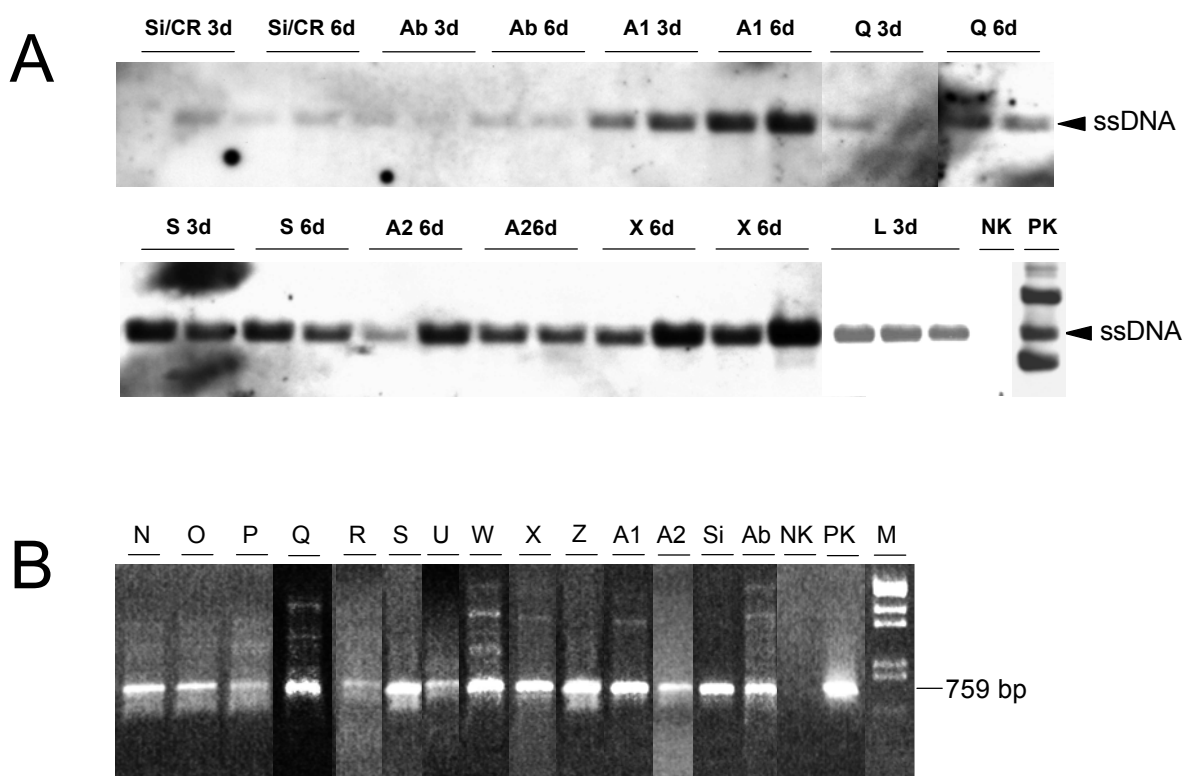


Abbildung 3-7: Aufnahme von viraler DNA durch *B. tabaci*.

Die Aufnahme viraler DNA wurde durch Southern Blot- (A) und PCR-Analyse (B) untersucht. Die Insekten saugten an *N. tabacum*-Pflanzen, infiziert mit den pseudorekombinanten Viren, bestehend aus der DNA A der AbMV-CP-Mutanten N, O, P, Q, R, S, U, W, X, Z, A1 bzw. A2 und der DNA B des SiGMV/Ho_{yv}, sowie AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B (Ab) und SiGMV/CR (Si). Nach 3 (3d) und 6 (6d) Akquisitionszeit auf diesen infizierten Pflanzen wurden jeweils 10-20 Weiße Fliegen gesammelt und daraus Nucleinsäuren isoliert. NK: Nucleinsäurenisolat von Weißen Fliegen, gehalten auf einer nicht-infizierten Tabak-Pflanze. **A:** Southern Blot wurde hybridisiert mit einer AbMV A-spezifischen Sonde, die mit SiGMV/CR kreuz-hybridisiert. PK: 3 µg DNA einer AbMV-infizierten Pflanze. Virale Einzelstrang-DNA (ssDNA) ist gekennzeichnet. **B:** Mit dem Primerpaar AbCP7/AbCP8 (vgl. Tabelle 2.2) wurde jeweils das CP-Gen (759 bp) aus Nucleinsäure-Isolaten (3 Tage Akquisitionszeit) amplifiziert. PK: Als Template wurde hier klonierte AbMV DNA A eingesetzt (Kontrolle für PCR). M: DNA-Größenstandard-Marker (vgl. 2.10.1).

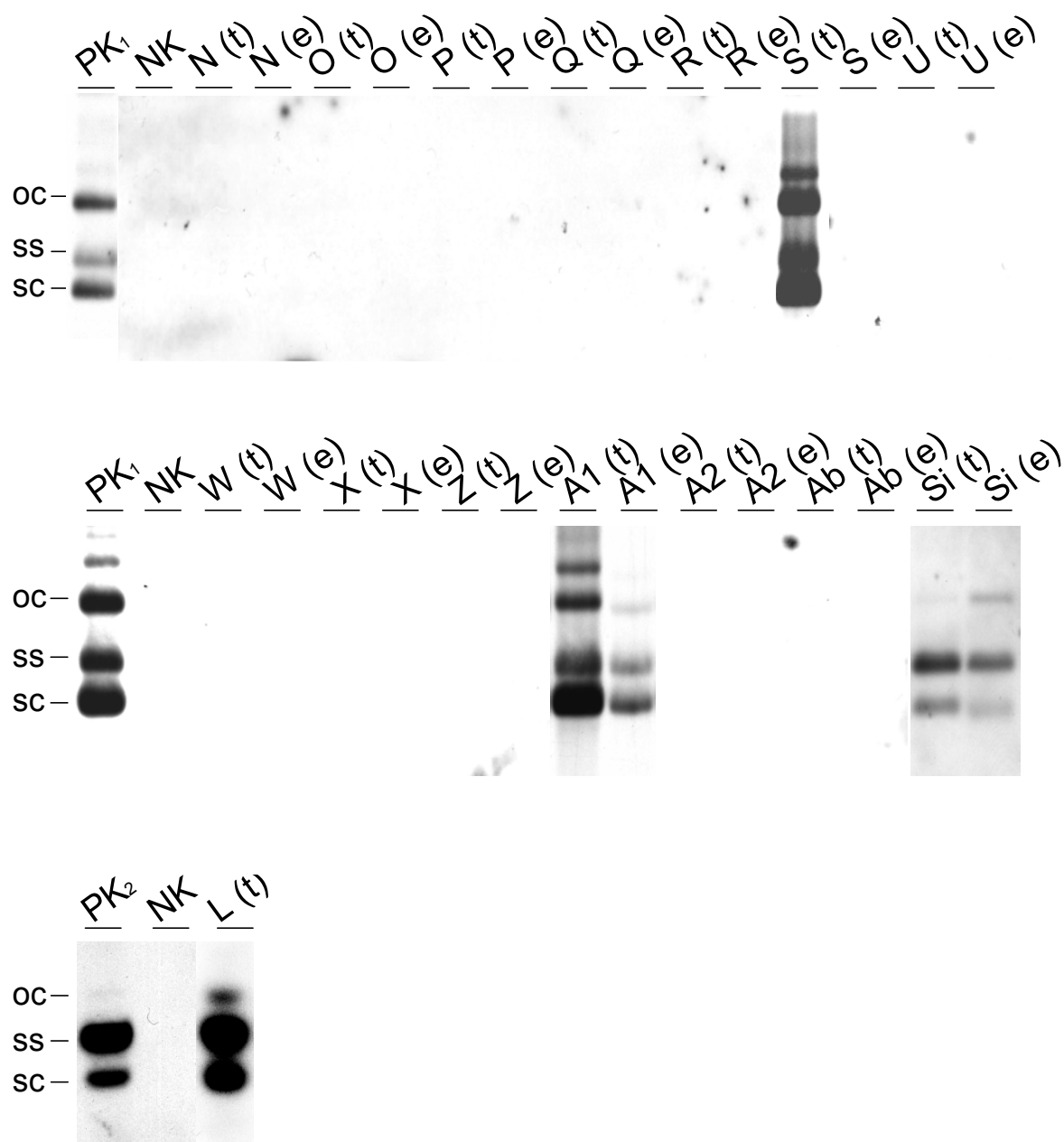


Abbildung 3-8: Southern Blot-Analyse von Weiße Fliegen-inokulierten Tabak- und Tomaten-Pflanzen.

N. tabacum- (t) und *L. esculentum*- (e) Keimlinge wurden durch Weiße Fliegen inokuliert, die zuvor an Pflanzen saugten, die mit den pseudorekombinanten Viren, bestehend aus der DNA A der AbMV-CP-Mutanten N, O, P, Q, R, S, U, W, X, Z, A1 bzw. A2 und der DNA B des SiGMV/Ho_{yv}, AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B, sowie mit dem SiGMV/CR-CP-Chimär (L) und SiGMV/CR (Si) infiziert waren. Jeweils 10 µg aus den Weiße-Fliegen-inokulierten Pflanzen isolierten Nukleinsäuren wurden aufgetragen. PK₁: 4 µg einer AbMV-infizierten Pflanze; PK₂: 4 µg einer SiGMV/CR-infizierten Pflanze. NK: nicht-infizierte Pflanze. Der Blot wurde mit einer AbMV DNA A-spezifischen Sonde hybridisiert, die mit SiGMV kreuz-hybridisiert. Virale *open circle* (oc), *single stranded* (ss) und *supercoiled* (sc) DNA-Formen sind angegeben.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden die eng verwandten ‚Neue Welt‘-Begomoviren AbMV, SiGMV/CR und SIGMV/Ho_{yv} verwendet, um die Übertragung durch ihren Insekten-Vektor, die Weiße Fliege *B. tabaci*, zu untersuchen. Der Klon des AbMV wurde aus der Zierpflanze *Abutilon sellovianum* (REGEL) isoliert, die in Europa über ein Jahrhundert durch Stecklinge vermehrt wurde (Regel, 1875). Während dieser langen Passage in *A. sellovianum* hat AbMV die Fähigkeit verloren, von der Weißen Fliege *B. tabaci* übertragen zu werden. Der Verlust der Insekten-Übertragbarkeit von Geminiviren, wenn sie längere Zeit nicht durch Übertragung durch den Vektor vermehrt wurden, ist keine Seltenheit, wie Berichte über Virus-Isolate von *Abutilon mosaic virus* aus Hawaii (AbMV/Hi) (Wu *et al.*, 1996) und *Honeysuckle yellow vein virus* (Bedford *et al.*, 1994a) zeigen. Liu *et al.* (1997) demonstrierten für ein ACMV-Isolat aus Nigeria (ACMV-NOg), dass wiederholte mechanische Inokulationen auf *N. benthamiana* zum Verlust der Übertragbarkeit durch die Weiße Fliege nach 20 bzw. 25 Passagen führte. Der in dieser Arbeit verwendete AbMV-Klon (AbMV/WI) wurde von Frischmuth *et al.* (1990) kloniert und sequenziert. Die Viren SiGMV/CR und SiGMV/Ho_{yv} wurden direkt aus in freier Wildbahn gesammelten Pflanzen isoliert und kloniert (Höfer *et al.*, 1997b; Frischmuth *et al.*, 1997). Nach Inokulation von Pflanzen war das klonierte AbMV ebenfalls nicht-übertragbar, während SiGMV/CR und SiGMV/Ho_{yv} sehr effektiv von *B. tabaci* übertragen wurden (Höfer *et al.*, 1997a; persönliche Mitteilung P. Höfer). Höfer und Kollegen (1997a) haben mittels eines Kapsidprotein-chimären AbMV gezeigt, dass die Ursache der Nicht-Übertragbarkeit im Kapsidprotein liegt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, im Vergleich mit den beiden Weiße Fliegen-übertragbaren Viren (SiGMV/CR und SiGMV/Ho_{yv}) die Determinanten im Kapsidprotein von AbMV zu bestimmen, die zu der Nicht-Übertragbarkeit führten bzw.

festzustellen, wie diese Determinanten geändert werden müssen, damit AbMV wieder durch die Weiße Fliege übertragbar wird.

Mit diesen drei Viren können pseudorekombinante Viren gebildet werden. AbMV und SiGMV/Ho_{yv} sind in der Lage, infektiöse Pseudorekombinationen auszubilden (Tabelle 3.1) (Unseld *et al.*, 2000). Im Fall von AbMV und SiGMV/CR ist nur das pseudorekombinante Virus, bestehend aus AbMV DNA A und SiGMV/CR DNA B, infektiös (Tabelle 3.1) (Höfer *et al.*, 1997c), obwohl die DNA A von SiGMV/CR in der Lage ist, die heterogene DNA B von AbMV zu *trans*-replizieren (Höfer *et al.*, 1997c). In allen diesen beschriebenen Experimenten wurden die Pflanzen mittels der sogenannten *Agrobacterium*-Inokulationstechnik infiziert. Mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten AbMV-Kapsidprotein-Mutanten mussten Pflanzen infiziert werden, die als Grundlage für Übertragungsversuche mit der Weißen Fliege dienen sollten. Da AbMV weder als klonierte DNA aufreibbar ist, noch sich durch Pflanzensaft von Pflanze zu Pflanze übertragen lässt (Frischmuth *et al.*, 1990), wurde versucht, *S. rhombifolia*-Keimlinge mittels Partikelbeschuss zu infizieren. Durch Beschuss der *Sida*-Pflanzen mit Monomer-DNA ließ sich keine Pflanze infizieren (Tabelle 3.4). AbMV ist in Pflanzengewebe auf das Phloem beschränkt (Abouzid *et al.*, 1988; Horns & Jeske, 1991). Diese Limitierung auf ein bestimmtes Gewebe kann Teil der Ursache für die Nicht-Infizierbarkeit durch den Partikelbeschuss sein, da das gezielte Treffen von bestimmten Gewebetypen, wie in diesem Fall das Phloem, eher unwahrscheinlich ist. Die Phloem-Limitierung gilt auch als Grund für die Tatsache, dass AbMV nicht durch mechanische Inokulation (Aufreiben) übertragbar ist (Wege *et al.*, 2000). Erschwerend kam weiterhin hinzu, dass für den Beschuss Monomer-DNA statt Bitmer-DNA, die eine Sequenzwiederholung des Virusgenoms enthält, verwendet wurde. Alle Versuche, von den Monomer-Klonen Bitmer-Klone herzustellen, schlugen fehl. Wie M. Ringel (persönliche Mitteilung) herausgefunden hat, lassen sich *N. benthamiana*-Keimlinge infizieren, wenn sie mit der AbMV DNA A in Kombination mit der DNA B von SiGMV/Ho_{yv} mechanisch inokuliert werden. Daraufhin wurden *N. tabacum*-Pflanzen mit pseudorekombinanten Viren, bestehend aus der DNA A der AbMV-CP-Mutanten und der DNA B von SiGMV/Ho_{yv}, inokuliert (Tabelle 3.2). Diese pseudorekombinanten Viren ließen

sich auch durch Pflanzensaft (*sap transmission*) von Pflanze zu Pflanze übertragen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Unfähigkeit von AbMV, mechanisch inokulierbar bzw. durch Pflanzensaft übertragbar zu sein, auf der DNA B lokalisiert ist, da das pseudorekombinante Virus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B in Pflanzen infektiös ist, wenn klonierte DNA mechanisch inokuliert (Tabelle 3.2) bzw. wenn es durch Pflanzensaft-Übertragung übertragen wurde.

Pflanzen, die mit den pseudorekombinanten Viren infiziert wurden, wurden für Übertragungsexperimente mit der Weißen Fliege *B. tabaci* eingesetzt. Die Aufnahme viraler DNA durch *B. tabaci* aus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B-infizierten Pflanzen ist im Vergleich zu AbMV- oder SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B-infizierten Pflanzen deutlich erhöht (Höfer *et al.*, 1997a; persönliche Mitteilung P. Höfer; diese Arbeit). Eine Aufnahme viraler DNA war weder aus AbMV- noch aus SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B-infizierten Pflanzen durch Southern Blot-Analyse nachweisbar (Höfer *et al.*, 1997a; persönliche Mitteilung P. Höfer), wohingegen in Weißen Fliegen, die an AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B-infizierten Pflanzen saugten, virale DNA gut im Southern Blot nachweisbar war (Abbildung 3-7). In SiGMV/CR-, SiGMV/Ho_{yv}- und AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B-infizierten Pflanzen ist der Gehalt an viraler DNA höher als in AbMV- und SiGMV/Ho_{yv} A / AbMV B-infizierten Pflanzen (Höfer *et al.*, 1997a; persönliche Mitteilung P. Höfer; diese Arbeit). Höfer *et al.* (1997a) schlugen deshalb vor, dass der Gehalt an Virus-DNA in infizierten Pflanzen einen Einfluss auf die Effizienz der Virusaufnahme durch die Weiße Fliege hat. Die effiziente Aufnahme des pseudorekombinanten Virus AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B bestätigt diese Korrelation zwischen Virus-Gehalt in der infizierten Pflanze und der Aufnahme durch den Vektor. Jedoch sagt ein hoher Virus-Titer im Insekt nichts darüber aus, ob das Virus übertragen werden kann oder nicht, da AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B zwar stark in der Weißen Fliege akkumuliert, aber nicht übertragen wird (Tabelle 3.3). Die Effizienz der Aufnahme hat also keinen Einfluss auf die Übertragbarkeit. In dieser Arbeit wurden für die einzelnen Übertragungsversuche in der Regel 50 Weiße Fliegen pro zu inokulierender Pflanze eingesetzt. So wurden beispielsweise die pseudorekombinanten Viren, bestehend aus der AbMV DNA A-Mutante N, S bzw. A1 und

der DNA B des SiGMV/Ho_{yv} B, alle gleich effizient durch *B. tabaci* aufgenommen (Abbildung 3-7A). Das pseudorekombinante Virus N / SiGMV/Ho_{yv} B wurde überhaupt nicht übertragen, während die Übertragungsrate von S / SiGMV/Ho_{yv} B 17% und von A1 / SiGMV/Ho_{yv} B 72% betrug. Dies bedeutet, dass die Effizienz der Übertragung von der Präsentation bestimmter Domänen im Kapsidprotein abhängt. P. Höfer (persönliche Mitteilung) konnte mit einer einzigen Weißen Fliege SiGMV/CR von einer infizierten auf eine nicht-infizierte Pflanze übertragen. Eine entsprechende effiziente Übertragungsrate findet man bei Ghanim *et al.* (2001). Ihnen gelang es, mit Hilfe einer einzigen weiblichen Weißen Fliege TYLCV/Is auf nicht-infizierte Tomaten zu übertragen. Liu *et al.* (1997) gelang es dagegen nicht, aus zwei verschiedenen ACMV-Isolaten produzierte pseudorekombinante Viren durch *B. tabaci* zu übertragen, auch wenn sie mehr als 1000 Weiße Fliegen einsetzten. Die Ergebnisse der Übertragungsversuche mit AbMV, SiGMV/CR, SiGMV/Ho_{yv} sowie den daraus gebildeten pseudorekombinanten Viren und des AbMV-Chimärs, bei dem das CP-Gen des AbMV durch das des SiGMV/CR ersetzt wurde (Höfer *et al.*, 1997a) (Tabelle 3.1), lassen den Schluss zu, dass die DNA B (oder deren Genprodukte) keinen direkten Einfluss auf den Übertragungsprozess hat. Gleichgültig, in welcher Kombination die AbMV DNA A vorliegt, das betreffende Virus wurde nie übertragen, auch wenn es wie im Fall von AbMV A / SiGMV/Ho_{yv} B sehr effizient von *B. tabaci* aufgenommen wurde. Dagegen ist die DNA B des AbMV in Kombination mit der DNA A des SiGMV/Ho_{yv} übertragbar. Dies scheint im Gegensatz zu Untersuchungen mit dem *African cassava mosaic virus* (ACMV) zu stehen. Übertragungsexperimente mit pseudorekombinanten Viren bestehend aus dem Weiße Fliege-übertragbaren ACMV aus Nigeria und dem nicht-übertragbaren ACMV aus Kenia haben gezeigt, dass beide DNA-Komponenten für die Übertragung gebraucht werden (Liu *et al.*, 1997, 1998). Für die in dieser Arbeit untersuchten Begomoviren aus Mittelamerika hat die DNA B-Komponente dennoch einen gewissen indirekten Einfluss auf die Übertragbarkeit, da die DNA B für die Ausbreitung der Viren innerhalb der Pflanze verantwortlich ist (von Arnim *et al.*, 1993; Frischmuth, 1999, Lazarowitz 1999, Lazarowitz & Beachy, 1999). Viren können nur dann von *B. tabaci* aufgenommen und – sofern sie übertragbar sind – übertragen werden, wenn sie sich in den

Pflanzengewebe befinden, in denen die Weiße Fliege saugt (Liu *et al.*, 1997).

Der Austausch des Kapsidproteingens von AbMV durch das entsprechende Gen des SiGMV/CR hatte zur Folge, dass die AbMV-CP-Chimäre durch die Weiße Fliege übertragen werden konnte (Höfer *et al.*, 1997a). Das bedeutet, dass die Domänen für die Übertragbarkeit im Kapsidprotein liegen. Um diese Domänen näher eingrenzen zu können, wurde das Kapsidprotein in zwei Teile unterteilt. In einen heterogenen, variablen aminoterminalen Teil (Aminosäuren 1-61) und in einen homologen, konstanten carboxyterminalen Teil (Aminosäuren 62-251) (Abbildung 3-1 und 4-1). Diese Aufteilung des Kapsidproteins in einen variablen N-terminalen und einen konstanten C-terminalen Teil, trifft auch für weitere Begomoviren zu, wie ein Vergleich der CP-Aminosäuresequenz nach der *best fit*-Methode zeigt (Abbildung 4-1). Übertragungsversuche mit einem chimären AbMV, bei dem der variable Kapsidprotein-Teil durch den des SiGMV/CR ersetzt wurde (Konstrukt C, Abbildung 2-1), zeigten, dass das Virus nicht-übertragbar blieb, während nach dem reziproken Austausch zwischen AbMV und SiGMV/CR (Konstrukt L, Abbildung 2-1) das chimäre SiGMV/CR übertragen wurde (Tabelle 3.3). Damit konnte die für die Übertragbarkeit verantwortliche Domäne im konstanten carboxyterminalen Teil des Kapsidproteins lokalisiert werden. Die Aminosäuresequenz der Kapsidproteine von AbMV und SiGMV/CR unterscheidet sich im konstanten Teil nur an sechs Positionen (Abbildung 3-1 und 4-1). AbMV besitzt an Position 124 ein ungeladenes Glutamin (Q) und an Position 149 ein geladenes Histidin (H). Bei SiGMV/CR ist die Verteilung der Ladung der beiden Aminosäuren an diesen zwei Positionen gerade umgekehrt. Es besitzt an Position 124 ein geladenes Lysin (L) und an Position 149 ein ungeladenes Glutamin (Q). Die Unterschiede an den weiteren vier Positionen (174, 179, 193 und 249) sind weniger gravierend, zumal der Austausch an den Positionen 193 und 249 konservativer Natur ist.

Der Austausch einzelner Aminosäuren im AbMV-Kapsidprotein gegen die an entsprechender Stelle im SiGMV/CR-Kapsidprotein, stellte die Übertragbarkeit von AbMV nicht wieder her (Tabelle 3.3). Wurde in AbMV an Position 124 Glutamin gegen Lysin und an Position 149 Histidin gegen Glutamin ausgetauscht, so wurde diese Virus-Mutante (Konstrukt S, Abbildung 2-1) durch *B. tabaci* übertragen

DISKUSSION

AbMV/Hi	(1)	MPRRDLPWRSMPTGTSKISRANANYSRARI-----GPRSDKASEWVHSPMYR
AbMV/WI	(1)	MPKRDLPWRSMPTGTSKTSRANANYSRARI-----GPRVDKASEWVHRPMYR
Konstr.S	(1)	MPKRDLPWRSMPTGTSKTSRANANYSRARI-----GPRVDKASEWVHRPMYR
SiGMV/CR	(1)	MPKRDPVWRNIAGTSKVSRSNDSPRAGS-----GPKFYKAARWVDRPMYR
SiGMV/Hoyv	(1)	MPKRDLPWRSIAGTSKVSRSNANDSPRAGS-----GPGVYKASEWVNRPMYR
WmCSV/Ir	(1)	MAKRTGDILISTPVSQVRRKLNFDSPYMSRALAPTVLVTSKRRQWANRPMYR
TYLCV/Sar	(1)	MPKRRTGDILISTPVSQVRRRLNFDSPYTSRAAAPTVQGI-KRRSWTYRPMYR
AbMV/Hi	(47)	KPRIYRTLRTADVPRGCEGPCKVQSYEHRHDI SHVGKVMCISDVTRNGING
AbMV/WI	(47)	KPRIYRTLRTADVPRGCEGPCKVQSYEQRHDI SHVGKVMCISDVTRNGINGITH
Konstr.S	(47)	KPRIYRTLRTADVPRGCEGPCKVQSYEQRHDI SHVGKVMCISDVTRNGINGITH
SiGMV/CR	(47)	KPRIYRILRTPDVPRGCEGPCKVQSYEQRHDI SHVGKVMCISDVTRNGINGITH
SiGMV/Hoyv	(47)	KPRIYRTLKTPGVPRGCEGPCKVQSYEQRHDI SHVGKVMCISDVTRNGINGITH
WmCSV/Ir	(53)	KPRMYRMYRSPDVPKGCEGPCKVQSYEQRDDVKHTGIVRCVSDVTRGSGITH
TYLCV/Sar	(52)	KPRMYRMYRSPDVPKGCEGPCKVQSYEQRDDVKHTGVVRCVSDVTRGSGITH
AbMV/Hi	(99)	RVGKRFCVKSIVYILGKIWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPF [*] G-T [↓] PMDFGQ [*]
AbMV/WI	(99)	RVGKRFCVKSIVYILGKIWMDENIKLQNHNTNSVMFWLVRDRRPFY [*] G-T [↓] PMDFGH [*]
Konstr.S	(99)	RVGKRFCVKSIVYILGKIWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPFY [*] G-T [↓] PMDFGQ [*]
SiGMV/CR	(99)	RVGKRFCVKSIVYILGKIWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPFY [*] G-T [↓] PMDFGQ [*]
SiGMV/Hoyv	(99)	RVGKRFCVKSIVYILGKIWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPFY [*] G-T [↓] PMDFGQ [*]
WmCSV/Ir	(105)	RVGKRFCVKSIIYILGKIWMDENIKKQNHNTNQVMFFLVRDRRPFY [*] GSSPMDFGQ [*]
TYLCV/Sar	(104)	RVGKRFCIKSIYILGKIWMDENIKKQNHNTNQVMFFLVRDRRPFY [*] GTS [↓] PMDFGQ [*]
AbMV/Hi	(150)	VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVMHKFYGKVTGGQYASNEQ [*] SIVKRFW [*] KVN
AbMV/WI	(150)	VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVLHKFYGKVTGGQYASNEQ [*] AIVKRFW [*] KVN
Konstr.S	(150)	VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVLHKFYGKVTGGQYASNEQ [*] AIVKRFW [*] KVN
SiGMV/CR	(150)	VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVMHKFYAKVTGGQYASNEQ [*] ALVKRFW [*] KVN
SiGMV/Hoyv	(150)	VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVMHKFYGKVTGGQYASNEQ [*] AIVKRFW [*] KVY
WmCSV/Ir	(157)	VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRFQVMRKFHATVVGGP [*] SGMKEQ [*] ALVKRFY [*] RVY
TYLCV/Sar	(156)	VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVMRKFHATVVGGP [*] SGMKEQ [*] CLLKR [*] FFKIN
AbMV/Hi	(202)	NHV [*] VYNHQEAGNYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSL [*] MN
AbMV/WI	(202)	NHV [*] VYNHQEAGKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSL [*] MN
Konstr.S	(202)	NHV [*] VYNHQEAGKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSL [*] MN
SiGMV/CR	(202)	NHV [*] VYNHQEAGKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSL [*] IMN
SiGMV/Hoyv	(202)	NHV [*] VYNHQEAGKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSL [*] IMN
WmCSV/Ir	(209)	NHV [*] VYNHQETAKYENHTENAMLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSVT [*] N
TYLCV/Sar	(208)	THV [*] VYNHQEQAKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDAVT [*] N

Abbildung 4-1: Aminosäure-Sequenzvergleich der Kapsidproteine verschiedener Begomoviren nach der *best-fit*-Methode.

Identische Aminosäuren sind grau unterlegt. Aus der ‚Neuen Welt‘ stammende Viren sind: *Abutilon mosaic virus/Hawaii* (AbMV/Hi), *Abutilon mosaic virus/West Indies* (AbMV/WI), *Sida golden mosaic virus/Costa Rica* (SiGMV/CR), *Sida golden mosaic virus/Honduras yellow vein-strain* (SiGMV/Hoyv), aus der ‚Alten Welt‘ stammen: *Watermelon chlorotic stunt virus/Iran* (WmCSV/Ir) und *Tomato yellow leaf curl virus/Sardinien* (TYLCV/Sar). Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt für jedes Virus nach der veröffentlichten Sequenz. Aminosäuren, die die Übertragbarkeit von AbMV wiederherstellten (Konstrukt S), sind schwarz unterlegt. Die drei Aminosäuren, die eine effiziente Übertragung der AbMV-Mutante A1 ermöglichten, sind durch Sterne (*) gekennzeichnet. Der Aminosäuresequenz-Unterschied zwischen den Isolaten von AbMV/Hi und ▶

(Tabelle 3.3), allerdings mit einer sehr geringen Übertragungsrate. Wurde zusätzlich zu diesen beiden Aminosäuren im AbMV-CP noch das Leucin an Position 174 durch Methionin ersetzt (Konstrukt A1, Abbildung 2-1), so wurde eine wesentlich effizientere Übertragbarkeit beobachtet (Tabelle 3.3). Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass der Austausch der beiden Aminosäuren an den Positionen 124 und 149 in AbMV gegen die Aminosäuren an entsprechender Stelle im SiGMV/CR-Kapsidprotein zwar ausreichend ist, um die Übertragbarkeit von AbMV wieder herzustellen, für eine effiziente Übertragung muss jedoch das Leucin an Position 174 im AbMV-CP gegen Methionin, das man an dieser Position im SiGMV/CR-Kapsidprotein findet, ausgetauscht werden.

Übertragungsversuche mit zwei TYLCV-Isolaten aus Italien und davon hergestellten Mutanten haben gezeigt, dass ein Glutamin an Position 129 (TYLCV-Nummerierung) für die Übertragbarkeit durch die Weiße Fliege notwendig ist (Noris *et al.*, 1998) (Abbildung 4-1). Wie ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Kapsidproteine zeigt, findet man an entsprechender Stelle in AbMV (Position 124) auch ein Glutamin und im übertragbaren SiGMV/CR ein Lysin (Abbildung 4-1). Ein übertragbares Isolat von *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV/Ir) aus dem Iran (Kheyr-Pour *et al.* 2000) besitzt an dieser Stelle ebenfalls ein Glutamin (Abbildung 4-1). Wird im AbMV-Kapsidprotein das Glutamin an Position 124 gegen Lysin, das man an dieser Position im Weiße Fliege-übertragbaren SiGMV/CR findet, ausgetauscht (Konstrukt N, Abbildung 2-1), so reichte dieser Austausch nicht aus, um die Übertragbarkeit von AbMV wieder herzustellen (Tabelle 3.3). An Position 149 (AbMV Nummerierung) besitzen alle hier untersuchten Begomoviren eine ungeladene Aminosäure (Glutamin), während der in dieser Arbeit untersuchte AbMV-Klon von den Westindischen Inseln (AbMV/WI) an dieser Stelle ein positiv geladenes Histidin besitzt. Wurde dieses Histidin nun gegen Glutamin ausgetauscht (Konstrukt Q, Abbildung 2-1), hatte dies keinen Einfluss auf die Übertragbarkeit (Tabelle 3.3). Ebenfalls keinen Einfluss auf die Wiederherstellung der Übertragbarkeit von AbMV hatte der Austausch des

AbMV/WI in der Region 123 bis 174 ist durch einen Pfeil markiert (↓). Aminosäuren, die essentiell für die Übertragbarkeit von TYLCV/Sar (Noris *et al.*, 1998) und WmCSV/Ir (Kheyr-Pour *et al.*, 2000) sind, sind fett dargestellt.

Leucins an Position 174 gegen Methionin (Konstrukt P, Abbildung 2-1; Tabelle 3.3), das man bei allen anderen übertragbaren Begomoviren an dieser Stelle findet (Abbildung 4-1). Damit AbMV übertragen werden kann, muss erstens das Glutamin an Position 124 gegen Lysin und zweitens das Histidin an Position 149 gegen Glutamin ausgetauscht werden (Konstrukt S, Abbildung 2-1; Tabelle 3.3). Offenbar bedarf es einer »Vertauschung« der Ladung an den Positionen 124 und 149 im AbMV-Kapsidprotein: Eine positive Ladung an Position 124 und keine Ladung an Position 149, so wie im Konstrukt S (Abbildung 2-1) und im übertragbaren SiGMV/CR (Abbildung 4-1). Offensichtlich wirkt sich die positive Ladung des Histidins an Position 149 im AbMV-Kapsidprotein, wie man es im Wildtyp und Konstrukt N (Austausch von Glutamin gegen Lysin an Position 124; Abbildung 2-1) findet, negativ auf die Übertragbarkeit aus, da alle übertragbaren Viren an dieser Stelle ein ungeladenes Glutamin besitzen (Abbildung 4-1). Für eine effiziente Übertragung von AbMV ist desweiteren noch ein Austausch des Leucins an Position 174 gegen Methionin notwendig (Konstrukt A1, Abbildung 2-1; Tabelle 3.3). Ein übertragbares TYLCV-Isolat aus Sardinien (Noris *et al.*, 1998) und das WmCSV aus dem Iran (Kheyr-Pour *et al.* 2000) besitzen beide an den beiden letztgenannten entsprechenden Positionen ebenfalls ein Glutamin (Position 155 in TYLCV/Sar bzw. 156 in WmCSV/Ir) und ein Methionin (Position 180 in TYLCV/Sar bzw. 181 in WmCSV/Ir) (Abbildung 4-1).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Kapsidproteins an den Positionen 124, 149 und 174 (AbMV Nummerierung) zwischen den übertragbaren Isolaten (SiGMV/CR, SiGMV/Ho_{yy}, WmCSV/Ir, TYLCV/Sar und den übertragbaren Konstrukten S und A1) zeigt, dass an Position 124 (AbMV Nummerierung) die ‚Alte Welt‘-Viren WmCSV/Ir und TYLCV/Sar ein Glutamin besitzen, während die ‚Neue Welt‘-Viren (SiGMC/CR, SiGMV/Ho_{yy}, und übertragbare AbMV-CP-Mutanten S und A1) dort ein Lysin haben (Abbildung 4-1). N-terminal von diesem Glutamin (Position 124 in AbMV) besitzen die Viren aus der ‚Neuen Welt‘ ein Leucin (Position 123, AbMV-Nummerierung), wohingegen die ‚Alte Welt‘-Viren an entsprechender Stelle ein Lysin besitzen (Abbildung 4-1), was darauf hindeutet, dass die Position des positiv-geladenen Lysins zwischen den Positionen 123 und 124 variieren kann, zumal die Region der Aminosäuren 122 bis 126 reich an

positiv geladenen Aminosäuren ist (^{122}K , ^{124}K , ^{126}H (AbMV-Nummerierung); Abbildung 4-1).

Kheyr-Pour *et al.* (2000) beschrieben zwei Isolate von WmCSV, einen Weiße Fliegen-übertragbaren aus dem Iran und einen nicht-übertragbaren aus dem Sudan. Der Unterschied zwischen beiden Isolaten bestand darin, dass das nicht-übertragbare Isolat im Kapsidprotein an Position 131 anstelle eines Asparagins ein Aspartat besaß. Dieses Asparagin an Position 131 (125 in AbMV, SiGMV und 130 in TYLCV/Sar, Abbildung 4-1) ist hochkonserviert und bei allen hier betrachteten (übertragbaren) Begomoviren vorhanden (Abbildung 4-1).

Ein AbMV Isolat aus Hawaii (Wu *et al.*, 1996), ist ebenfalls nicht durch die Weiße Fliege übertragbar, obwohl es an den Positionen 124, 149 und 174 genau die Aminosäuren besitzt, die den in dieser Arbeit untersuchten AbMV-Stamm übertragbar gemacht haben (Konstrukt A1) (Abbildung 4-1). Ein Aminosäure-Vergleich der Kapsidprotein-Domäne 123 bis 174 der ‚Neue Welt‘-Viren SiGMV/CR, SiGMV/Ho_{yy} und AbMV-CP-Mutante A1 mit dem nicht-übertragbaren AbMV/Hi-Isolat zeigt, dass sich die Aminosäuresequenz an genau einer Stelle, nämlich an Position 141, unterscheidet. In AbMV/Hi befindet sich hier ein Phenylalanin, während alle anderen ‚Neue‘- aber auch die ‚Alte Welt‘-Viren hier ein Tyrosin haben (Abbildung 4-1). Tyrosin unterscheidet sich von Phenylalanin in dem Vorhandensein einer Hydroxylgruppe am aromatischen Ring. Diese Hydroxylgruppe kann an Wasserstoff-Brückenbindungen teilnehmen und so eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung oder der Stabilisierung der Tertiärstruktur des Kapsidproteins bzw. der Viruspartikel spielen. So könnte das Phenylalanin an dieser Position zu instabilen Partikeln führen. Eine Mutation der Aminosäure an Position 129 (Austausch von Glutamin gegen Prolin) in TYLCV/Sar verhinderte die Bildung von Virus-Partikeln (Noris *et al.*, 1998). Da Viruspartikel von dem in dieser Arbeit untersuchten AbMV in infizierten Pflanzengewebe nachweisbar sind (Abouzid & Jeske, 1985), kann die Ursache der Nicht-Übertragbarkeit von AbMV nicht an nicht gebildeten bzw. instabilen Partikeln liegen. Ob das AbMV-Isolat aus Hawaii (Wu *et al.* 1996) Partikel bildet oder nicht und deswegen nicht-übertragbar ist, wurde bisher nicht gezeigt. Bis jetzt ist nur sehr wenig bekannt, ob Begomoviren in ihrem Vektor als Virionen zirkulieren. Das Kapsidprotein der

bipartiten Begomoviren *Tomato mottle virus* (ToMoV) und *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) konnte im Mitteldarm und in der Speicheldrüse von *B. tabaci* detektiert werden (Hunter *et al.*, 1998). Ghanim *et al.* (2001) konnten mit Hilfe der *immunocapture-PCR*-Technik virale DNA und das Kapsidprotein im Kopf, im Darm, in der Haemolymphe und in den Speicheldrüsen von *B. tabaci* nachweisen. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass in diesen Geweben Virionen präsent sind. Das Milieu (pH-Wert, Ionenstärke, usw.) im Verdauungssystem oder in der Haemolymphe im Insekt unterscheidet sich wahrscheinlich mehr oder weniger deutlich von dem in der Pflanzenzelle. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Kapside der Viren feinen Konformationsänderungen im Insekten-Vektor unterliegen, die kaum nachweisbar sind. Aufgrund dessen könnte das biochemische Milieu im Vektor die Partikelstruktur der Viren so ändern, dass bestimmte Proteindomänen für Interaktionen mit möglichen Rezeptoren im Vektor zugänglich werden (Gray, 1996).

Für Potyviren konnte gezeigt werden, dass ein hochkonserviertes Aminosäure-Triplett, nämlich Aspartat-Alanin-Glycin (DAG), im Aminoterminal des Kapsidproteins für die Übertragbarkeit durch Aphiden unerlässlich ist (Atreya *et al.*, 1990, 1995; Gal-On *et al.*, 1992). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit und die bereits veröffentlichten Resultate zur Übertragbarkeit von Begomoviren wie TYLCV/Sar (Noris *et al.*, 1998) und WmCSV/Ir (Kheyr-Pour *et al.* 2000) näher, so fällt auf, dass es sich bei der Domäne, die für die Übertragbarkeit verantwortlich ist, nicht wie etwa bei den Potyviren um ein kurzes Aminosäure-Triplett handelt (Atreya *et al.*, 1990, 1995; Gal-On *et al.*, 1992), sondern bei den Begomoviren scheint eher die Zusammensetzung der Domäne eine Rolle zu spielen. Die Aminosäuren 123 bis 149 im zentralen Bereich des Kapsidproteins sind ausreichend, um eine Übertragung durch die Weiße Fliege zu ermöglichen (minimale Übertragungsdomäne), für eine effiziente Übertragung jedoch sind die Aminosäuren 123 bis 174 von entscheidender Bedeutung.

Für das *Maize streak virus* (MSV), ein Vertreter der Mastreviren (Palmer & Rybicki, 1998), wurde kürzlich ein Modell für die dreidimensionale Struktur des Kapsidproteins aufgestellt (Zhang *et al.*, 2001). Obwohl die Primärstruktur (Aminosäure-Sequenz) der Kapsidproteine zwischen Mastre- und Begomoviren

sehr verschieden ist, bilden sie alle die eigentümliche »Zwillingspartikel«-Struktur. Versucht man nun, die Aminosäuren, die die Übertragbarkeit von AbMV wiederherstellen auf dieses Modell zu übertragen, so befinden sich die Aminosäuren der Positionen 124 und 149 in einer Schleife (*loop*) und die Aminosäure 174 in einer anderen. Ein Modell könnte daher sein, dass die Domäne, bestehend aus den Aminosäuren 124 und 149, essentiell für eine spezifische Erkennung (und Bindung) eines möglichen Rezeptors in der Weißen Fliege wäre. Die Domäne um Aminosäure 174 könnte für die korrekte Ausbildung der Tertiärstruktur des CP verantwortlich sein und somit in die Bildung von Viruspartikeln eingreifen. Ferner könnte diese Domäne für die korrekte Präsentation bzw. Positionierung der Schleife, die die Aminosäuren 124 und 149 enthält, verantwortlich sein. Dieses Modell würde mit den beobachteten Übertragungsraten der AbMV-Kapsidprotein-Mutanten S und A1 übereinstimmen. Der Austausch der Aminosäuren an den Positionen 124 und 149 ist zwar hinreichend, um die Übertragbarkeit von AbMV wiederherzustellen, für eine effiziente Übertragung ist aber noch zusätzlich der Austausch der Aminosäure an Position 174 notwendig.

Die Übertragung der Begomoviren ist zirkulativ (Harrison, 1985), d.h. es erfolgt eine Aufnahme des Virus in das Haemocoel des Vektors. Für Luteoviren, die zirkulativ durch Aphiden übertragen werden, wurde vorgeschlagen, dass die Viruspartikel mit einem dem *E. coli* GroEL homologen Protein (MpB GroEL) assoziieren, um so der proteolytischen Degradierung der Viruspartikel in der Haemolymphe der Aphiden zu entgehen (van den Heuvel *et al.*, 1994, 1997). Für TYLCV wurde gezeigt, dass ein GroEL homologes Protein, das von Endosymbionten in *B. tabaci* gebildet wird, eine wichtige Rolle bei der Übertragung durch die Weiße Fliege spielt (Morin *et al.*, 1999). Jedoch hat sich in Bindungsstudien gezeigt, dass sowohl das Weiße Fliegen-übertragbare TYLCV (aus Israel), als auch ein nicht-übertragbares AbMV-Isolat aus Israel an dieses GroEL homologe Protein bindet. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein rascher Abbau der Viruspartikel in der Haemolymphe, hervorgerufen durch eine nicht korrekte Interaktion zwischen Kapsidprotein und GroEL, nicht die Ursache für die Nicht-Übertragbarkeit von AbMV sein kann (Morin *et al.*, 2000).

Zusammenfassende Aussage:

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass aus dem nicht-übertragbaren *Abutilon mosaic virus* ein übertragbares Virus wird, wenn die Aminosäuren an den Positionen 124 und 149 gegen die, die man an dieser Stelle im Kapsidprotein des übertragbaren SiGMV/CR findet, austauscht. Die Übertragung durch die Weiße Fliege *B. tabaci* war dabei jedoch relativ ineffizient. Eine sehr effiziente Übertragungsrate wurde erzielt, wenn zusätzlich noch im AbMV-Kapsidprotein das Leucin an Position 174 durch ein Methionin ersetzt wurde. Die Übertragung von Geminiviren beruht auf einer starken Interaktion zwischen exponierten Domänen des Kapsidproteins und bestimmten Rezeptoren im Überträgerinsekt. Bis jetzt gibt es keine Hinweise darauf, dass bei der Übertragung weitere Virus-kodierte Proteine eine Rolle spielen, so wie zum Beispiel die Helfer-Komponente (*helper component* (HC)) im Fall der Übertragung von Potyviren durch Aphiden (Pirone & Blanc, 1996) oder das *read-through*-Protein bei der Übertragung von Luteoviren durch Aphiden (Brault, *et al.*, 1995, 2000).

CHEMIKALIENLISTE

<i>α</i> -D(+)-Glucose	Glycerin
Agar	Hefe-Extrakt
Agarose	Isopropanol
Ammoniumperoxodisulfat	Kaliumchlorid
Ampicillin	Kanamycin
Bacto-Trypton	Lithiumchlorid
Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim)	Magnesiumsulfat
Borsäure	Maleinsäure
Bromphenolblau	Natriumacetat
Calciumchlorid	Natriumchlorid
Cäsiumchlorid	Natriumcitrat
CDP-Star (Boehringer Mannheim)	Natriumhydroxid
Chloroform	N-Lauroylsarkosin
CSPD-Substrat (Boehringer Mannheim)	Phenol (Tris-gesättigt)
DMSO, Dimethylformamid	Rifampicin
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Saccharose
Ethanol	Salzsäure (HCl)
Ethidiumbromid	SDS, Natriumdodecylsulfat
Ficoll	Spermidin
	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
	Tween-20

SYMBOLE FÜR AMINOSÄUREN

A	Ala	Alanin ^a
C	Cys	Cystein ^b
D	Asp	Asparaginsäure ^c
E	Glu	Glutaminsäure ^c
F	Phe	Phenylalanin ^a
G	Gly	Glycin ^b
H	His	Histidin ^d
I	Ile	Isoleucin ^a
K	Lys	Lysin ^d
L	Leu	Leucin ^a
M	Met	Methionin ^a
N	Asn	Asparagin ^b
P	Pro	Prolin ^a
Q	Gln	Glutamin ^b
R	Arg	Arginin ^d
S	Ser	Serin ^b
T	Thr	Threonin ^b
V	Val	Valin ^a
W	Trp	Tryptophan ^a
Y	Tyr	Tyrosin ^b

Aminosäure mit: ^a apolarer; ^b polarer, ungeladener; ^c polarer, negativ geladener (saurer); ^d polarer positiv geladener (basischer) Seitenkette.
Nach Schlee & Kleber (1991).

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

(a) Publikation:

Höhnle, M., Höfer, P., Bedford, I. D., Briddon, R. W., Markham, P. G., and Frischmuth, T. (2001). Exchange of three amino acids in the coat protein result in efficient whitefly-transmission of a non-transmissible Abutilon mosaic virus isolate. *Virology* im Druck; *siehe Seiten 92-103!*

Daneben wurden verwandte Themen bearbeitet und veröffentlicht:

Unsel, S., Höhnle, M., Ringel, M. & Frischmuth, T. (2001). The coat protein of *African cassava mosaic geminivirus* is a nuclear shuttle protein. *Virology*, im Druck.

Unsel, S., Ringel, M., Höfer, P., Höhnle, M., Bedford, I. D., Markham, P. G. & Frischmuth, T. (2000). Host range and symptom variation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Arch. Virol.* 145, 1449-1454.

(b) Vortrag:

»Coat protein gene replacement results in whitefly-transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate«

M. Höhnle, P. Höfer, I. D. Bedford, P. G. Markham, R. W. Briddon & T. Frischmuth

bei folgenden Kongressen bzw. Tagungen:

European Whitefly Symposium, Ragusa / Sizilien, Italien; 27.02.-03.03.2001.

Joint meeting of the DPG Arbeitskreis Viruskrankheiten der Pflanzen and the Nederlandse Kring voor Plantevirologie, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln; 29.-30.03.2001.

(c) Posterpräsentation:

»Coat protein gene replacement results in whitefly-transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate«

M. Höhnle, P. Höfer, I. D. Bedford, P. G. Markham & T. Frischmuth

auf dem Kongress:

ISPMB - 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Québec, Kanada; 18.-24.06.2000.

Exchange of three amino acids in the coat protein result in efficient whitefly-transmission of a non-transmissible Abutilon mosaic virus isolate

Martin Höhnle*, Petra Höfer*, Ian D. Bedford[§], Rob W. Briddon[§], Peter G. Markham[§], and Thomas Frischmuth^{*,1}

* *Biologisches Institut, Lehrstuhl für Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70569 Stuttgart, Germany*

[§] *Department of Disease and Stress Biology, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK*

Geminiviruses are transmitted in a circulative manner by whiteflies, leafhoppers, or treehoppers. The whitefly species *Bemisia tabaci* (GENN.) is the vector for members of the genus *Begomovirus*. The closely related bipartite Central American begomoviruses Abutilon mosaic virus (AbMV), Sida golden mosaic virus originating from Costa Rica (SiGMV-CR) and Sida golden mosaic virus originating from Honduras (SiGMV-Ho_{yy}) were used to study transmission by their insect vector. The AbMV isolate is defective in transmission whereas the two *Sida*-infecting viruses are readily transmitted by *B. tabaci*. These three viruses are able to form pseudorecombinant viruses by exchange of genomic components. The pseudorecombinant virus SiGMV-Ho_{yy} A/AbMV B was transmissible whereas the reciprocal pseudorecombinant virus AbMV A/SiGMV-Ho_{yy} B was not transmitted, indicating that DNA B is not involved in the transmission defect. However, the uptake of the pseudorecombinant virus AbMV A/SiGMV-Ho_{yy} B was much better than AbMV itself, indicating that DNA B or DNA B gene products enhance uptake of viral DNA. Exchange of AbMV coat protein with that of SiGMV-CR resulted in a transmissible chimeric AbMV. Mutagenesis of the AbMV coat protein showed that the exchange of two amino acids, at position 124 and 149, was sufficient to obtain a whitefly-transmissible AbMV mutant. However, when amino acid 174 was altered in addition to amino acids 124 and 149 AbMV was readily transmitted by *B. tabaci*. From this we conclude that it is not a concise motif, such as the amino acid triplet, aspartate-alanine-glycine (DAG), involved in aphid transmission of potyviruses, that determines transmissibility of begomoviruses by *B. tabaci*. Instead it is the composition of the coat protein domain from amino acid 123 to 149, as minimal transmission domain, with the contribution of amino acids 149 to 174 for efficient transmission.

INTRODUCTION

Geminiviruses are small plant viruses with circular single-stranded DNA (ssDNA) genomes encapsidated in twinned particles (Harrison, 1985). They cause severe disease problems in crops throughout the world (Brown and Bird, 1992; Thresh *et al.*, 1994; Polston and Anderson, 1997; Moffat, 1999). Members of the genus *Begomovirus*

infect dicotyledonous plants, are transmitted by the whitefly species *Bemisia tabaci* and usually have bipartite genomes (DNA A and B).

Begomoviruses are transmitted in a circulative (Harrison, 1985) and non-propagative (Boulton and Markham, 1986) manner. This mode of transmission involves acquisition of virus particles along with the phloem sap of infected plants through the stylets, and translocation into the gut via the esophagus and filter chamber. In the mid-gut virus passes through the gut wall into the hemolymph and is transported to the salivary glands.

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: +49-711-6855096. Email: thomas.frischmuth@po.uni-stuttgart.de.

TABLE 1:

Inoculation of *N. tabacum* with SiGMV-CR, SiGMV-Ho_{yv}, AbMV and their pseudorecombinant viruses

Inoculated virus ^a	Infectivity ^b (infected/ inoculated)
AbMV A + SiGMV-Ho _{yv} B	13/30; 8/10
SiGMV-Ho _{yv} A + AbMV B	0/30; 0/30
AbMV A + AbMV B	0/30
SiGMV-Ho _{yv} A + SiGMV-Ho _{yv} B	8/9; 5/5
SiGMV-CR ^{1-61AbMV} + SiGMV-CR B	17/23; 34/40
AbMV ^{1-61SiGMV-CR} + AbMV B	9/10 ^c
AbMV ^{249I} + AbMV B	10/10 ^c
AbMV ^{124K} + SiGMV-Ho _{yv} B	9/13; 8/10
AbMV ^{149Q} + SiGMV-Ho _{yv} B	9/16; 7/10
AbMV ^{174M} + SiGMV-Ho _{yv} B	9/13; 8/10
AbMV ^{179A} + SiGMV-Ho _{yv} B	10/13
AbMV ^{193L} + SiGMV-Ho _{yv} B	5/20; 12/14
AbMV ^{124K,149Q} + SiGMV-Ho _{yv} B	11/13; 13/30
AbMV ^{174M,179A} + SiGMV-Ho _{yv} B	5/20; 7/13
AbMV ^{124K,174M} + SiGMV-Ho _{yv} B	0/15; 1/13; 2/30; 14/20
AbMV ^{149Q,174M} + SiGMV-Ho _{yv} B	7/15; 10/13; 14/30; 8/15; 7/10
AbMV ^{124K,179A} + SiGMV-Ho _{yv} B	7/13
AbMV ^{124K,149Q,174M} + SiGMV-Ho _{yv} B	6/15; 9/30; 2/15; 7/10

^a SiGMV-CR and AbMV mutants are described in Fig. 2

^b individual experiments are separated by semicolons

^c plants were agroinoculated

Here it passes through salivary gland membranes and is secreted with the saliva during feeding (Hunter *et al.*, 1998). For begomoviruses, the completion of this pathway takes about 8 hours (Polston *et al.*, 1990; Ghanim *et al.*, 2001). The GroEL homologue, produced by endosymbionts in *B. tabaci*, has been suggested to play an important role in the transmission process of TYLCV (Morin *et al.*, 1999). However, binding of GroEL seems not to be the limiting factor for the transmission deficiency of AbMV because the GroEL homologue binds the non-transmissible AbMV as efficiently as the transmissible TYLCV (Morin *et al.*, 2000).

The coat protein (CP) of begomoviruses is essential for transmission and determines insect specificity. Exchange of the African cassava mosaic virus (ACMV) CP with that of Beet curly top virus (BCTV) altered the insect specificity from whiteflies to leafhoppers (Briddon *et al.*, 1990). Mutations in the CP of Bean golden mosaic

virus (BGMV) resulted in the loss of acquisition and transmission by *B. tabaci* (Azzam *et al.*, 1994). Some begomoviruses infecting ornamental plants, such as Abutilon mosaic virus (AbMV) or Honeysuckle yellow vein virus, are no longer insect-transmissible, although some are still acquired by *B. tabaci* (Bedford *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996; Höfer *et al.*, 1997a). Replacement of the CP of the non-transmissible AbMV with that of the transmissible Sida golden mosaic virus (SiGMV-CR, previously SiGMV-Co) produced a whitefly-transmissible chimeric AbMV (Höfer *et al.*, 1997a). Alteration of two amino acids in the CP of two Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-Sar) isolates resulted in transmissibility (Noris *et al.*, 1998) while the alteration of only one amino acid in the CP of a non-transmissible isolate of Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) restored whitefly transmission (Kheyr-Pour *et al.*, 2000).

TABLE 2
Acquisition and transmission of AbMV, SiGMV-CR, SiGMV-Ho_{yv} and pseudorecombinant viruses by *Bemisia tabaci*

Virus	Source host plant	Detection in <i>B. tabaci</i> ^a	Transmission ^b	
			<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	<i>L. esculentum</i>
AbMV A + AbMV B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun <i>S. rhombifolia</i>	yes	0/3; 0/3 0/6; 0/4	-
SiGMV-CR A + SiGMV-CR B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	2/3; 0/3; 2/2	-
SiGMV-Ho _{yv} A + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>S. rhombifolia</i>	yes	3/3; 2/2; 4/6	-
AbMV A + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun <i>S. rhombifolia</i>	yes	0/3; 0/3 0/6; 0/2; 0/6	-
SiGMV-Ho _{yv} A + AbMV B	<i>S. rhombifolia</i>	yes	3/9; 2/2; 2/4	-
AbMV ¹⁻⁶¹ SiGMV-CR + AbMV B	<i>S. rhombifolia</i>	yes	0/6	0/2
SiGMV-CR ¹⁻⁶¹ AbMV + SiGMV-CR B	<i>S. rhombifolia</i>	yes	1/1	-
AbMV ^{124K} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/2; 0/3; 0/4	0/1; 0/1
AbMV ^{149Q} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/2; 0/4	0/1; 0/1
AbMV ^{174M} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/2; 0/3	0/1; 0/1
AbMV ^{179A} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/2; 0/4	0/1; 0/1
AbMV ^{193L} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/1; 0/3	0/1; 0/1
AbMV ^{249I} + AbMV B	<i>S. rhombifolia</i>	yes	0/6	0/6; 0/6
AbMV ^{124K,149Q} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/3; 1/2; 1/5	0/1; 0/1
AbMV ^{174M,179A} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/1; 0/4	0/1; 0/1
AbMV ^{124K,174M} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/2; 0/4	0/1; 0/1
AbMV ^{149Q,174M} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/3; 0/2; 0/4; 0/5	0/1; 0/1
AbMV ^{124K,179A} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/1; 0/3	0/1; 0/1
AbMV ^{124K,149Q,174M} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	2/3; 2/2; 3/4	1/1; 1/1
AbMV ^{149Q,174M,179A} + SiGMV-Ho _{yv} B	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	yes	0/3; 0/3; 0/4	0/1; 0/1

^a Detection of virus uptake by PCR and Southern blot analysis.

^b Transmission was determined by symptom production and Southern blot analysis. Individual experiments are separated by semicolons; - = not done.

^c Detection of virus uptake only by PCR.

Pseudorecombination of bipartite begomoviruses describes a mixed infection of a DNA A component of one begomovirus and the DNA B component of a second one. Initially it was thought that the production of viable pseudorecombinant viruses was only possible between closely related strains of a single virus species due to the requirement for DNA A-mediated *trans*-replication of the heterologous DNA B component (Frischmuth *et al.*, 1993; Sung and Coutts, 1995). However, in recent years, examples of pseudorecombination between two distinct geminiviruses have been described (Gilbertson *et al.*, 1993; Höfer *et al.*, 1997b; Frischmuth *et al.*, 1997; Unseld *et al.*, 2000).

In this paper we describe the transmission by *B. tabaci* of a pseudorecombinant virus produced by exchanging components of non-transmissible AbMV and transmissible

SiGMV-Ho_{yv}. Furthermore, we demonstrate that the replacement of two amino acids in the CP results in restoration of the ability of AbMV to be transmitted.

RESULTS

Infectivity of SiGMV-Ho_{yv}, AbMV, AbMV-CP mutants and their pseudorecombinants

The infectivity of SiGMV-Ho_{yv}, AbMV and their respective pseudorecombinant viruses in various host plants when introduced by agroinoculation has been demonstrated previously (Unseld *et al.*, 2000). AbMV is not sap-transmissible and cloned DNA was only infectious after agroinoculation (Frischmuth *et al.*, 1990). However, mechanical inoculation of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun with cloned DNA of the pseudorecombinant virus

AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B resulted in systemically infected plants (Table 1). Furthermore, the pseudorecombinant AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B as well as AbMV DNA A CP mutants co-inoculated with SiGMV-Ho_{yv} B were sap-transmissible (data not shown).

Whitefly-transmission of SiGMV-Ho_{yv} A/AbMV B pseudorecombinant virus

Plants infected with AbMV, SiGMV-Ho_{yv} and their pseudorecombinant viruses were used for transmission experiments with *B. tabaci*. Several hundred whiteflies were fed on infected plants for 3 to 6 days and approximately 50 insects were transferred to uninfected *N. tabacum* and *Lycopersicon esculentum* (Kondine Red) seedlings. Uptake of virus was determined after 3 and 6 days access to infected plants. AbMV, SiGMV-Ho_{yv} as well as their pseudorecombinants were acquired from infected tobacco as well as *Sida rhombifolia* by *B. tabaci*. Viral DNA was detected by Southern blotting of whitefly extracts after they had fed on plants infected with SiGMV-Ho_{yv} (data not shown) and the pseudorecombinant virus AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B (Table 2) whereas in whiteflies fed on AbMV- or SiGMV-Ho_{yv} A/AbMV B-infected plants uptake was only detectable by PCR as described in Höfer *et al.* (1997a). Although the pseudorecombinant virus AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B was acquired only SiGMV-Ho_{yv} and the pseudorecombinant virus SiGMV-Ho_{yv} A/AbMV B were transmitted (Table 2), indicating that AbMV DNA B is not involved in the inability of *B. tabaci* to transmit AbMV.

Whitefly-transmissibility of AbMV and SiGMV-CR mutants and AbMVA CP-mutant / SiGMV-Ho_{yv} B pseudorecombinants

In earlier experiments we demonstrated that the exchange of the AbMV CP with that of SiGMV-CR was sufficient to produce a transmissible chimeric AbMV (Höfer *et al.*, 1997a). Comparison of CP amino acid sequences of whitefly-

transmitted begomoviruses showed a heterogeneous N-terminus (approx. 70 amino acids) and a highly homologous C-terminus (Fig. 1). The exchange of the first 61 amino acids of the AbMV CP with those of SiGMV-CR did not result in a transmissible chimeric AbMV (Fig. 2; construct AbMV^{1-61SiGMV-CR}). When this CP part of SiGMV-CR was exchanged with the corresponding AbMV part (Fig. 2; construct SiGMV-CR^{1-61AbMV}), the chimeric virus was acquired and remained transmissible (Table 2). From these results we concluded that the determinants for transmission by *B. tabaci* are located within the C-terminal part of the CP. This CP part is highly conserved between AbMV and SiGMV-CR, with only six amino acids differing between the viruses (Fig. 1). All six AbMV amino acids were exchanged individually with those of SiGMV-CR (Fig. 2; constructs AbMV^{124K}, AbMV^{149Q}, AbMV^{174M}, AbMV^{179A}, AbMV^{193L} and AbMV^{249I}). Insects were fed on infected *N. tabacum* or *S. rhombifolia* and transferred to uninfected *N. tabacum* and *L. esculentum* seedlings. Groups of 10–20 whiteflies were analyzed and uptake of viral DNA was observed for all six AbMV mutants (data not shown). However, none of these AbMV mutants were transmitted plants (Table 2).

Since single exchange of amino acids did not result in whitefly-transmission of mutant viruses, combinations of double and triple mutations were introduced into the AbMV CP sequence (Fig. 2; constructs AbMV^{124K,149Q}, AbMV^{174M,179A}, AbMV^{124K,174M}, AbMV^{149Q,174M}, AbMV^{124K,179A}, AbMV^{124K,149Q,174M} and AbMV^{149Q,174M,179A}). All CP mutants were infectious in *N. tabacum* when inoculated together with SiGMV-Ho_{yv} DNA B (Table 1). After feeding of whiteflies on plants infected with construct AbMV^{124K,149Q} (exchange of glutamine with lysine at position 124 and histidine with glutamine at position 149) and AbMV^{149Q,174M,179A} (exchange of glutamine with lysine at position 124, histidine with glutamine at position 149 and leucine with methionine at position 174) uptake of viral DNA was observed and mutant viruses were

ANHANG

AbMV-Hi	(1)	MPRRDLPWRSMPGTSKISRANANYSRARI-----GPRSDKASEWVHSPM
AbMV-WI	(1)	MPKRDLPWRSMPGTSKISRANANYSRARI-----GPRVDKASEWVHRPM
AbMV-M	(1)	MPKRDLPWRSMPGTSKISRANANYSRARI-----GPRVDKASEWVHRPM
SiGMV-CR	(1)	MPKRDVPWRNIAGTSKVSRSNDSPRAGS-----GPKFYKAARWVDRPM
SiGMV-Hoyv	(1)	MPKRDLPWRSIAGTSKVSRRNANDSPRAGS-----GPGVYKASEWVNRPM
WmCSV-Ir	(1)	MAKRTGDILISTPVSQVRRKLNFDSPYMSRALAPTVLVTSKRRQWANRPM
TYLCV-Sar	(1)	MPKRTGDILISTPVSQVRRRLNFDSPYTSRAAAAPTVOGI-KRRSWTYRPM
AbMV-Hi	(45)	YRKPRIYR ^{124K,149Q} TLRTADVPRGCEGPCKVQSYEHRHDI [*] SHVGKVMCISDVTRGN
AbMV-WI	(45)	YRKPRIYR ^{124K,149Q} TLRTADVPRGCEGPCKVQSYEQR [*] HDI [*] SHVGKVMCISDVTRGN
AbMV-M	(45)	YRKPRIYR ^{124K,149Q} TLRTADVPRGCEGPCKVQSYEQR [*] HDI [*] SHVGKVMCISDVTRGN
SiGMV-CR	(45)	YRKPRIYR ^{124K,149Q} TLRTADVPRGCEGPCKVQSYEQR [*] HDI [*] SHVGKVMCISDVTRGN
SiGMV-Hoyv	(45)	YRKPRIYR ^{124K,149Q} TLKTPGVPRGCEGPCKVQSYEQR [*] HDI [*] SHVGKVMCISDVTRGN
WmCSV-Ir	(51)	YRKPRMYRMYRSPDVPKGCCEGPCKVQSYEQR [*] DDVKHTGIVRCVSDVTRGS
TYLCV-Sar	(50)	YRKPRMYRMYRSPDVPKGCCEGPCKVQSYEQR [*] DDVKHTGVVRCVSDVTRGS
AbMV-Hi	(95)	GINQRVGKRF [*] CVKSVYILGKIWMDENIKLKNHTNSVMF [*] WLVDRRRPFG-T
AbMV-WI	(95)	GITHRVGKRF [*] CVKSVYILGKIWMDENIKL [*] QNHNTNSVMF [*] WLVDRRRPYG-T
AbMV-M	(95)	GITHRVGKRF [*] CVKSVYILGKIWMDENIKL [*] KNHTNSVMF [*] WLVDRRRPYG-T
SiGMV-CR	(95)	GITHRVGKRF [*] CVKSVYILGKIWMDENIKLKNHTNSVMF [*] WLVDRRRPYG-T
SiGMV-Hoyv	(95)	GITHRVGKRF [*] CVKSVYILGKIWMDENIKLKNHTNSVMF [*] WLVDRRRPYG-T
WmCSV-Ir	(101)	GITHRVGKRF [*] CVKSIYILGKIWMDENIKK [*] QNHNTNQVMF [*] FLVDRRRPYGSS
TYLCV-Sar	(100)	GITHRVGKRF [*] CIKSIYILGKIWMDENIKK [*] QNHNTNQVMF [*] FLVDRRRPYGTS
AbMV-Hi	(144)	PMDFGQ [*] VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVMH [*] KFYGKVTGGQYASNEQ [*] SI
AbMV-WI	(144)	PMDFGH [*] VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVLH [*] KFYGKVTGGQYASNEQ [*] AI
AbMV-M	(144)	PMDFGQ [*] VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVLH [*] KFYGKVTGGQYASNEQ [*] AI
SiGMV-CR	(144)	PMDFGQ [*] VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVMH [*] KFYAKVTGGQYASNEQ [*] AL
SiGMV-Hoyv	(144)	PMDFGQ [*] VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVMH [*] KFYGKVTGGQYASNEQ [*] AI
WmCSV-Ir	(151)	PMDFGQ [*] VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRFQVMR [*] KFHATVVGGPSGMKEQ [*] AL
TYLCV-Sar	(150)	PMDFGQ [*] VFNMF [*] DNEPSTATVKNDLRDRYQVMR [*] KFHATVVGGPSGMKEQ [*] CL
AbMV-Hi	(194)	VKRFW [*] KVNNHVVYNH [*] QEA [*] GN [*] YENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRI
AbMV-WI	(194)	VKRFW [*] KVNNHVVYNH [*] QEA [*] GN [*] YENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRI
AbMV-M	(194)	VKRFW [*] KVNNHVVYNH [*] QEA [*] GN [*] YENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRI
SiGMV-CR	(194)	VKRFW [*] KVNNHVVYNH [*] QEA [*] GN [*] YENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRI
SiGMV-Hoyv	(194)	VKRFW [*] KVNNHVVYNH [*] QEA [*] GN [*] YENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRI
WmCSV-Ir	(201)	VKRFYRV [*] YNNHVVYNH [*] QETAK [*] YENHTENAMLLLYMACTHASNPVYATLKIRI
TYLCV-Sar	(200)	LKRF [*] FKINTHVVYNH [*] QEA [*] QAK [*] YENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRI
AbMV-Hi	(244)	YFYDSL [*] MLN
AbMV-WI	(244)	YFYDSL [*] MLN
AbMV-M	(244)	YFYDSL [*] MLN
SiGMV-CR	(244)	YFYDSL [*] IMN
SiGMV-Hoyv	(244)	YFYDSL [*] IMN
WmCSV-Ir	(251)	YFYDSV [*] TN
TYLCV-Sar	(250)	YFYDAV [*] TN

FIG 1. Best fit alignment of amino acid sequences of selected begomovirus coat proteins. New World begomoviruses are Abutilon mosaic virus from Hawaii (AbMV-Hi), the West Indies (AbMV-WI = AbMV in the text) and its mutant AbMV^{124K,149Q} (AbMV-M), Sida golden mosaic virus from Costa Rica (SiGMV-CR) and the yellow vein strain from Honduras (SiGMV-Hoyv). Old World begomoviruses are Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia (TYLCV-Sar) and Watermelon chlorotic stunt virus from Iran (WmCSV-Ir). The numbering is according to the published sequence of each individual virus. Identical amino acids are shaded grey. Amino acids essential for a whitefly-transmissible AbMV mutant are indicated in reverse colour. The three amino acids required to produce an efficiently transmissible AbMV mutant are indicated by asterisks. The additional amino acid sequence difference between AbMV-WI and AbMV-Hi within region 123 and 174 is indicated by an arrow. Amino acids determined to be essential for transmissibility of TYLCV-Sar (Noris *et al.*, 1998) and WmCSV-Ir (Kheyr-Pour *et al.*, 2000) are indicated in bold letters.

transmitted to uninfected tobacco seedlings (Table 2). The maintenance of the mutations was verified by amplification and subsequent sequencing of the CP gene. All other mutation combinations did not result in transmission of the mutant virus (Table 2).

From these results we conclude that the exchange of the two amino acids at positions 124 and 149 in AbMV CP with those of the SiGMV-CR CP are sufficient to change the non-transmissible AbMV into a transmissible AbMV mutant although transmission was only observed in a single experiment (Table 2). Efficient transmission of AbMV was only achieved when additionally the leucine at position 174 was exchanged with methionine (Table 2).

DISCUSSION

The closely related bipartite Central American begomoviruses AbMV, SiGMV-CR and SiGMV-Ho_{yv} were used to study the transmission by their insect vector *Bemisia tabaci*. These three viruses are able to form pseudorecombinant viruses. Exchanging of either component of AbMV and SiGMV-Ho_{yv} produces a viable pseudorecombinant, whereas only AbMV DNA A and SiGMV-CR DNA B was able to form a viable pseudorecombinant virus even though SiGMV-CR DNA A is able to *trans-replicate* AbMV DNA B (Höfer *et al.*, 1997b, Unseld *et al.*, 2000). In all these experiments, plants were infected using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated inoculation to overcome the inability of AbMV to be either sap-transmitted or inoculated as cloned DNA (Frischmuth *et al.*, 1990). Here we show that this deficiency of AbMV is located on DNA B because the pseudorecombinant virus AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B is infectious in plants when applied as cloned DNA (Table 1) and sap-transmissible from plant-to-plant.

Uptake by *B. tabaci* of viral DNA from AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B-infected plants is enhanced compared to AbMV A/AbMV B- or SiGMV-Ho_{yv} A/AbMV B-infected plants.

Uptake from AbMV A/AbMV B- and SiGMV-Ho_{yv} A/AbMV B-infected plants was not detectable by Southern blotting (Höfer *et al.*, 1997a, this study) whereas uptake was easily detectable in whiteflies fed on AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B-infected plants. In plants infected with SiGMV-Ho_{yv}, SiGMV-CR and AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B, the levels of viral DNA were elevated compared to AbMV infected plants (data not shown). Elevated viral DNA content in infected plants has been suggested to play a role in uptake efficiency by *B. tabaci* (Höfer *et al.*, 1997a). The elevated uptake of the pseudorecombinant virus AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B is consistent with the correlation between virus content and virus uptake. However, high levels of viral DNA in the insect is not necessarily correlated with transmission ability because the pseudorecombinant virus AbMV A/SiGMV-Ho_{yv} B accumulated to high levels in the insect but was not transmitted (Table 2). Exchange of the CP sequence of AbMV with the CP sequence of SiGMV-CR resulted in transmission of the chimeric virus (Höfer *et al.*, 1997a). To investigate which amino acids are involved in the transmission deficiency of AbMV a number of AbMV CP mutants were produced (Fig. 2). The CP amino acid sequence can be divided into two parts, a rather heterogeneous N-terminal part and conserved C-terminal part. SiGMV-CR remained transmissible after exchange of its N-terminal 61 amino acids with those of AbMV (SiGMV-CR^{1-61AbMV}) whereas the reciprocal exchange in AbMV (AbMV^{1-61SiGMV-CR}) did not produce transmissible AbMV. From these experiments we concluded that the domain responsible for transmission must be located within the C-terminal part of the CP. Only six amino acids are different between AbMV and SiGMV-CR in this part of the CP (Fig. 1). Single exchange of all six amino acids in the AbMV CP sequence did not restore transmissibility. After exchange of the glutamine with lysine at position 124 and the histidine with glutamine at position 149, transmission of this AbMV mutant was observed. However, only when in addition to these exchanges

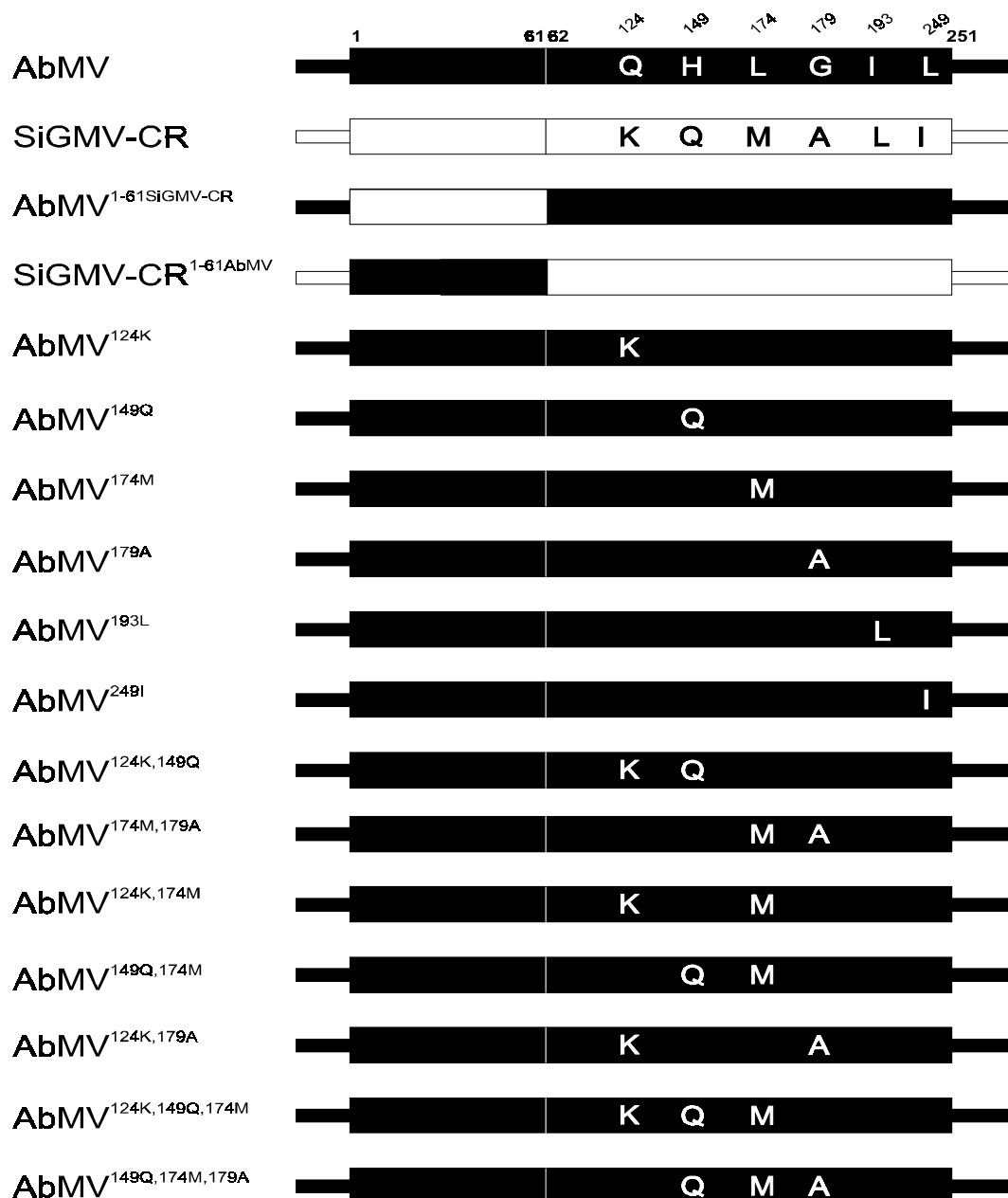


FIG. 2: Schematic representation of coat protein amino acid sequences used for transmission experiments. Closed bars indicate AbMV CP parts and open bars SiGMV-CR CP parts. The position and amino acids differing between AbMV and SiGMV-CR in the CP C-terminus are indicated.

the leucine at position 174 was exchanged with methionine was AbMV readily transmitted (Table 2).

Transmission experiments with TYLCV strains from Italy showed that the glutamine at position 129 (124 in AbMV) plays an important role (Noris *et al.*, 1998). However, a glutamine is also present at the

corresponding position in the CP sequence of the non-transmissible AbMV (Fig. 1). Two WmCSV isolates, one from Iran that is transmissible, the other from the Sudan that is non-transmissible, have been characterized (Kheyr-Pour *et al.*, 2000). The difference between these isolates within the CP sequence is at position 131,

namely a substitution of an asparagine by aspartic acid. Only the isolate containing asparagine at position 131 was insect-transmissible. Sequence comparison shows that asparagine is present at the same position in the transmissible TYLCV, SiGMV-CR and the transmissible AbMV mutants (Fig. 1). Comparison of the CP sequence at position 124, 149 and 174 (AbMV numbering) between transmissible isolates of SiGMV-CR, SiGMV-Ho_{yv}, WmCSV, TYLCV and the transmissible AbMV CP mutants reveals that the Old World viruses WmCSV and TYLCV possess a glutamine at position 124 whereas the New World viruses SiGMV-CR, SiGMV-Ho_{yv} and AbMV CP mutants possess a lysine (Fig. 1). The New World viruses possess a leucine (position 123 according to the AbMV numbering) adjacent to the lysine at position 124 whereas the Old World viruses possess a lysine at the corresponding position (Fig. 1), indicating that the position of the positively charged lysine can vary in transmissible viruses. Wu *et al.* (1996) characterized a non-transmissible AbMV isolate originated from Hawaii. CP amino acid sequence comparison shows that this isolate carries identical amino acids at position 124, 149 and 174 as the transmissible AbMV^{124K,149Q,174M}. Comparison of the whole CP domain 123 to 174 reveals one amino acid difference between the transmissible New World viruses SiGMV-CR, SiGMV-Ho_{yv} and AbMV CP mutants and the non-transmissible AbMV Hawaii isolate, a phenylalanine instead of a tyrosine at position 141 (Fig. 1). It may be that this substitution in the CP of the non-transmissible AbMV Hawaii isolate leads to defective particle formation. Substitution of an amino acid at position 152 in the TYLCV CP prevented particle formation (Noris *et al.*, 1998).

Taken together we conclude from our results and those published on TYLCV and WmCSV that a short motif, such as the amino acid triplet, aspartate-alanine-glycine (DAG), involved in aphid transmission of potyviruses (Harrison and Robinson, 1988, Atreya *et al.*, 1990, Gal-

On *et al.*, 1992), does not determine transmissibility of begomoviruses by *B. tabaci*. Rather, the composition of the CP from amino acid 123 to 149 determines transmission with amino acids 149 to 174 contributing to efficient transmission.

For the Maize streak virus (MSV), a member of the *Mastrevirus* genus, a structure model for the CP has been suggested (Zhang *et al.*, 2001). Although the CP amino acid sequences between mastreviruses and begomoviruses are very distinct, they form the same distinctive geminate particle structure and therefore probably share common structural features. Overlaying the mutations that confer transmissibility to AbMV onto the MSV CP model suggests that amino acids 124 and 149 are localized in one loop and amino acid 174 in a second loop (Zhang *et al.* 2001). Thus amino acids 124 and 149 may be essential for specific recognition by a putative receptor within the whitefly with amino acid 174 may be responsible either for particle stability, although geminate particles can be purified from infected plants (Abouzid and Jeske, 1985), or for correct presentation of the loop, containing amino acids 124 and 149. This model would fit with the observation that the exchange of amino acids 124 and 149 is sufficient to produce a transmissible AbMV mutant but only the exchange of amino acids 124, 149 and 174 restores high transmissibility.

Begomoviruses are transmitted in a circulative manner, therefore, the virus passes several membranes and has to survive in various compartments within the insect. Probably non-recognition of receptor molecules in the gut wall or salivary gland membranes is responsible for the transmission deficiency of AbMV.

MATERIALS AND METHODS

Construction of infectious clones

Infectious clones of AbMV (Frischmuth *et al.*, 1990, Frischmuth *et al.*, 1993), SiGMV-CR (formerly SiGMV-Co; Höfer *et al.*, 1997c) and SiGMV-Ho_{yv} (Frischmuth *et*

TABLE 3:
Primers used for cloning, amplification and sequencing

Primer	Sequence ^a	Location ^b
AbCP3	5'-GGT TAA AGC TCG TGG GCC-3'	AbMV A nt 359-336
AbCP4	5'-ATT TGA ATT TTA TTG AAT GAT TT-3'	AbMV A nt 1118-1140
AbCP7	5'-CAA AAT GCC TAA GCG CGA TCT CCC-3'	AbMV A nt 354-377
AbCP7s-FOR	5'-ACG <u>GAG CTC</u> CAA AAT GCC TAA GCG CGA TC-3'	AbMV A nt 354-373
AbCP8	5'-TTT ATT AAT TCA TGA GCG AAT C-3'	AbMV A nt 1117-1096
AbCP10	5'-AGG CTG TGA AGG GCC TTG-3'	AbMV A nt 540-557
AbCP13	5'-CTG GGC ACA TCG GCC GTC-3'	AbMV A nt 539-522
AbCP15	5'-GTG TGG TTC TTG AGC TTG AT-3'	AbMV A nt 737-718
AbCP16	5'-GAA CAG TGT CAT GTT CTG GT-3'	AbMV A nt 738-757
AbCP17	5'-CGT GCC ATA CGG TCT ACG GTC-3'	AbMV A nt 786-766
AbCP18	5'-CCC ATG GAT TTC GGT CAG GTG TTC AAC-3'	AbMV A nt 787-816
AbCP19	5'-CAC CTG TGA CCT TGG CAT AGA ACT TG-3'	AbMV A nt 907-882
AbCP20	5'-GAC AGT ATG CCA GCA ATG AAC-3'	AbMV A nt 908-928
AbCP21	5'-GGA GAT CGT TCT TCA CAG TGG C-3'	AbMV A nt 859-839
AbCP22	5'-GCG ATC GTT ACC AGG TCA TGC ACA AGT TCT-3'	AbMV A nt 860-889
AbCP23	5'-CTT GAC GAG TGC CTG TTC ATT G-3'	AbMV A nt 942-921
AbCP24	5'-CGT TTC TGG AAG GTC AAC AAT C-3'	AbMV A nt 943-964
AbMu1	5'-CTA TGA TTC GAT CAT GAA TTA-31'	AbMV A nt 1092-1112
AbMV11	5'-CCG CTA TAA TAT TAC CGG ATG G-3'	AbMV A nt 145-166
AbMV12	5'-CCT GAA CTT CCA AGT TTG GAC G-3'	AbMV A nt 1314-1293
SGCP1	5'-TTT ATT AAT TCA TTA TCG-3'	SiGMV-CR A nt 1092-1075
SGCP2	5'-CAA AAT GCC TAA GCG CGA-3'	SiGMV-CR A nt 329-346
SGCP4	5'-AAA TAA AGA CAG TGG GCC GGG CC-3'	SiGMV-CR A nt 328-306
SGCP6	5'-CTG GGA ACG TCG GGC GTG-3'	SiGMV-CR A nt 514-497
SGCP4s-REV	5'-TAC <u>GAG CTC</u> GAA ATA AAG ACA GTG GGC CG -3'	SiGMV-CR A nt 329-310
SGCP9	5'-AGG ATG TGA AGG CCC TTG-3'	SiGMV-CR A nt 515-532
SGMV1	5'-CAT ATG TAA ATT ATG TAC-3'	SiGMV-CR nt 1135-1119
SGMV2	5'-CTG GGG ATA AGT GAG GAA-3'	SiGMV-CR nt 2557-2574
<i>AbCP11L</i>	5'-ATA ATG CGC CTG ACG AGT CAA T-3'	<i>AbMV A nt 257-277</i>
<i>AbCP12L</i>	5'-GTA CTT AGA TCA GTT AGG CGT G-3'	<i>AbMV A nt 1233-1212</i>
<i>SGCP14L</i>	5'-GAG GCG CTC CGC TTT CGT CTG-3'	<i>SiGMV-CR A nt 200-220</i>

^a Added *Sst* I restriction sites are underlined. Nucleotides which differ to the AbMV sequence are indicated in bold.

^b Primers used for sequencing are indicated in italics.

al., 1997) have been described.

CP mutants are shown schematically in Fig. 2, and primers used for PCR amplification are summarized in Table 3. Conventional recombinant DNA techniques were performed essentially as described

by Sambrook *et al.* (1989) and restriction enzymes and DNA-modifying enzymes were used as recommended by the manufacturers.

In constructs AbMV¹⁻⁶¹SiGMV-CR and SiGMV-CR¹⁻⁶¹AbMV, the first 61 amino acids

(representing the variable CP region) were exchanged between AbMV and SiGMV-CR (Fig. 2). To produce construct SiGMV-CR^{1-61AbMV} the variable part of the AbMV CP (amino acids 1-61) was introduced into SiGMV-CR. The AbMV fragment was PCR-amplified with primers AbCP7s-FOR and AbCP13, introducing at the 5'-end of the fragment an additional *Sst* I restriction site (Table 3). The pBluescript vector and SiGMV-CR DNA A excluding a region encompassing the first 61 amino acids of the CP was PCR-amplified with primers SiCP4s-REV and SGCP9 (Table 3). Furthermore, an *Sst* I restriction site was introduced at the 3'-end of the fragment. The AbMV and SiGMV-CR fragments were treated with Klenow enzyme, polynucleotide kinase (PNK) and *Sst* I before re-ligation. In construct AbMV^{1-61SiGMV-CR}, the first 61 amino acids of AbMV were replaced by those of SiGMV-CR (Fig. 2). Construct AbMV^{1-61SiGMV-CR} was essentially produced as described for construct SiGMV-CR^{1-61AbMV}, using primers SGCP2 and SGCP6 to amplify the SiGMV-CR CP variable part, and AbCP3 and AbCP10 for amplification of a fragment of AbMV lacking this region (Table 3).

Construct AbMV^{249I} was produced using Primer AbMu1 and the Seamless™ Cloning kit (Stratagene, Heidelberg/Germany), essentially as described by the manufacturer. All other constructs (Fig. 2; AbMV^{124K}, AbMV^{149Q}, AbMV^{174M}, AbMV^{179A}, AbMV^{193L}, AbMV^{249I}, AbMV^{124K,149Q}, AbMV^{174M,179A}, AbMV^{124K,174M}, AbMV^{149Q,174M}, AbMV^{124K,179A}, AbMV^{124K,149Q,174M} and AbMV^{149Q,174M,179A}) were produced by site-directed PCR mutagenesis. The primers were orientated in opposite direction to allow amplification of cloned AbMV DNA A including the pBluescript vector. Amplified DNA was treated with Klenow enzyme and PNK before re-ligation. The introduction of the mutation(s) and the nucleotide integrity of the CP gene was confirmed by automatic sequence analysis with the Li-Cor system according to the manufacturer's instructions with IRD-labelled primers (Table 3; MWG AG, Ebersberg, Germany).

Inoculation of plants and characterization of viral DNA forms

The plant species *S. rhombifolia* was agroinoculated as described previously (Höfer *et al.*, 1997c). *N. tabacum* cv. Samsun seedlings (4-5 leaf stage) were either mechanically inoculated when SiGMV CR DNA B or SiGMV-Ho_{yy} DNA B was used or agroinoculated when AbMV DNA B was used. Cloned AbMV DNA A and its mutants were released by *Pst* I, SiGMV-Ho_{yy} DNA B by *Sst* I, SiGMV-CR DNA A by *Pst* I and SiGMV-CR DNA B by *Eco* RV treatment. Released viral DNA A was mixed with DNA B (1 µg of each component) and rubbed onto carborundum-dusted leaves. Sap-transmission of virus was performed by grinding a symptomatic leaf in 500 µl water and application of 10 µl plant extract onto carborundum dusted leaves.

Total nucleic acids were extracted 14 days post-inoculation from systemically-infected leaves as described by Frischmuth and Stanley (1991). Samples were analyzed by agarose gel electrophoresis and blotted onto nylon membranes as described previously (Höfer *et al.*, 1997c). Viral DNA was detected by hybridization with digoxigenin- (Boehringer Mannheim) or [α -³²P]dCTP-labelled AbMV or SiGMV probes. Because of the close relationship between AbMV, and SiGMV-CR and SiGMV-Ho_{yy} the labelled probes cross-hybridize.

Transmission of viruses by *B. tabaci*

A colony of the M-biotype of *B. tabaci*, collected in 1985 in Turkey (Bedford *et al.*, 1994) was maintained on *Hibiscus rosa-sinensis* in perspex cages at 25 °C with a 16 h light photoperiod. Between 300 to 400 whiteflies were fed on infected plants for 3 to 6 days (acquisition access period (AAP)) and transferred to uninfected plant seedlings (*N. tabacum* cv. Samsun nn, *L. esculentum* Kondine Red). Approximately 50 whiteflies were caged together with one target plant in a small perspex cage. After 5 to 6 days (inoculation access period (IAP)), insects were killed by spraying with

an approved insecticide. Target plants were transferred to insect-proof perspex cages and checked daily for symptom development. Symptomatic plants were analyzed for the presence of viral DNA by Southern blotting as described above.

To confirm the maintenance of mutations within the CP gene after whitefly transmission, the CP gene was amplified from nucleic acid extracts of whitefly-inoculated plants using primer pairs AbMV11/AbMV12 or SGMV1/SGMV2 (Table 3). The PCR products were directly sequenced with IRD-labelled primers AbCP11L, AbCP12L, and SGCP14L (Table 3).

Samples of 10 to 20 whiteflies were collected after either 3 or 6 days AAP and analyzed for virus acquisition. Total nucleic acids were extracted and analyzed as described in Höfer *et al.* (1997a).

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Sigrid Kober and Diether Gotthardt for the excellent care of our greenhouse plants and Mr. Dan Nelson for maintaining the whitefly colonies under MAFF licence PHL 11D/3818. Our thanks also to Prof. H. Jeske for helpful discussion. Virus clones were held according the Gentechnik Gesetz (License nos. 76-14/8829.02/ Uni.S.01.01-5 and 76-14/8829.02/Uni.S.01.04-2). The work was supported by a DFG grant to T. F.

REFERENCES

- Abouzid, A. and Jeske, H. (1985). The purification and characterization of gemini particles from *Abutilon* mosaic virus infected *Malvaceae*. *J. Phytopathology* **115**, 344-353.
- Atreya, C. D., Raccach, B., and Pirone, T. P. (1990). A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* **178**, 161-165.
- Azzam, O., Frazer, J., De La Rosa, D., Beaver, J. S., Ahlquist, P., and Maxwell, D. P. (1994). Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **204**, 289-296.
- Bedford, I. D., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C., and Markham, P. G. (1994). Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (GENNADIUS) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* **125**, 311-325.
- Boulton, M. I., Markham, P. G. (1986). The use of squash blotting to detect plant pathogens in insect vectors. In "Development in Applied Biology" (R. A. C. Jones and L. Torrance, Eds) Vol.1, pp 55-69.
- Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J., and Markham, P. G. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, **177**, 85-94.
- Brown, J.K., and Bird, J. (1992). Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Dis.* **76**, 220-225.
- Frischmuth, T., Engel, M., Lauster, S., and Jeske, H., (1997). Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *J. Gen. Virol.* **78**, 2675-2682.
- Frischmuth, T., Roberts, S., von Arnim, A., and Stanley, J. (1993). Specificity of bipartite geminivirus movement proteins. *Virology* **196**, 666-673.
- Frischmuth, T., and Stanley, J. (1991). African cassava mosaic DI DNA interferes with the replication of both genomic components. *Virology* **178**, 539-544.
- Frischmuth, T., Zimmat, G., and Jeske, H., (1990). The nucleotide sequence of *Abutilon* mosaic virus reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. *Virology* **178**, 461-468.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., and Raccach, B. (1992). A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *J. Gen. Virol.* **73**, 2183-2187.
- Ghanim, M., Morin, S., and Czosnek, H. (2001). Rate of Tomato yellow leaf curl virus Translocation in the Circulative Transmission Pathway of its Vector, the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* **91**, 188-196.
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Paplomatas, E. J., Rojas, M., Hou, Y.-M., and Maxwell, D. P. (1993). Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* **74**, 23-31.
- Harrison, B. D. (1985). Advances in Geminivirus research. *Ann. Rev. Phytopathol.* **23**, 55-82.
- Harrison, B. D. and Robinson, D. J. (1988). Molecular variation in vector-borne plant viruses: Epidemiological significance. *Philos.*

- Trans. R. Soc. London B* **321**, 447-462.
- Höfer, P., Bedford, I. D., Markham, P. G., Jeske, H. and Frischmuth, T. (1997a). Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* **236**, 288-295.
- Höfer, P., Engel, M., Jeske, H., and Frischmuth, T. (1997b). Host range limitation of a pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *MPMI* **10**, 1019-1022.
- Höfer, P., Engel, M., Jeske, H., and Frischmuth, T. (1997c). Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *J. Gen. Virol.* **78**, 1785-1790.
- Hunter, W. B., Hiebert, E., Webb, S. E., Tsai, J. H., and Polston, J. E. (1998). Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease* **82**, 1147-1151.
- Khey-Pour, A., Bananej, K., Dafalla, G. A., Caciagli, P., Noris, E., Ahoonmanesh, A., Lecoq, H., and Gronenborn, B. (2000). Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence comparison and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology* **90**, 629-635.
- Moffat, A. S. (1999). Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science* **286**, 1835
- Morin, S., Ghanim, M., Sobol, I., and Czosnek, H. (2000). The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and non-transmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology* **276**, 404-416.
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., and van den Heuvel, J. F. J. M. (1999). A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **256**, 75-84.
- Noris, E., Vaira, A. M., Caciagli, P., Masenga, V., Gronenborn, B., and Accotto, G. P. (1998). Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J. Virol.* **72**, 10050-10057.
- Polston, J. E., Al-Musa, A., Perring, T. M., and Dodds, J. A. (1990). Association of the nucleic of squash leaf curl virus with the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* **80**, 850-856.
- Polston, J. E., and Anderson, P. K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis.* **81**, 1358-1369.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sung, Y. K., and Coutts, R. H. A (1995). Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* **76**, 2809-2815.
- Thresh, J. M., Fargette, D., and Otim-Nape, W. G. (1994). Effects of African cassava mosaic geminivirus on the yield of cassava. *Trop. Sci.* **34**, 26-42.
- Unsold, S., Ringel, M., Höfer, P., Höhnle, M., Jeske, H., Bedford, I. D., Markham P. G., and Frischmuth, T., (2000). Host range and symptom variation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Arch. Virol.* **145**, 1449-1454.
- Wu, Z. C., Hu, J. S., Polston, J. E., Ullman, D. E., and Hiebert, E. (1996). Complete nucleotide sequence of a nonvector-transmissible strain of Abutilon mosaic virus in Hawaii. *Phytopathology* **86**, 608-613.
- Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W., and McKenna, R. (2001). Structure of the maize streak geminate particle. *Virology* **279**, 471-477.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Genomorganisation des bipartiten Begomovirus SiGMV/CR.....	17
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Pseudorekombination bestehend aus den Genomkomponenten von AbMV und SiGMV/Ho _{yv}	19
Abbildung 1-3: Weiße Fliege <i>Bemisia tabaci</i> (GENN.).	20
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der AbMV-CP -Mutanten.....	51
Abbildung 3-1: Aminosäure-Sequenzvergleich der Kapsidproteine von AbMV/WI und SiGMV/CR.	63
Abbildung 3-2: Southern Blot-Analyse von <i>N. benthamiana</i> -Blättchen transfiziert durch Partikelbeschuss.....	69
Abbildung 3-3: Strategie zur Herstellung des AbMV-Bitmerkklons.....	69
Abbildung 3-4: Southern Blot-Analyse von Pflanzensaft-infizierten <i>N. tabacum</i> ...	72
Abbildung 3-5: Southern Blot-Analyse von DNA-inokulierten Tabak-Pflanzen.	72
Abbildung 3-6: Symptome infizierter Tabak-Pflanzen.....	73
Abbildung 3-7: Aufnahme von viraler DNA durch <i>B. tabaci</i>	75
Abbildung 3-8: Southern Blot-Analyse von Weiße Fliegen-inokulierten Tabak- und Tomaten-Pflanzen.	76
Abbildung 4-1: Aminosäure-Sequenzvergleich der Kapsidproteine verschiedener Begomoviren nach der <i>best-fit</i> -Methode.	82

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Einteilung der Geminiviren.....	16
Tabelle 2.1: Verwendete DNA-Polymerasen und dazugehörige Standard-PCR-Ansätze.....	43
Tabelle 2.2: PCR-Primer	45
Tabelle 2.3: Sequenzier-Primer.....	49
Tabelle 2.4: PCR-Bedingungen für die Herstellung der AbMV-CP-Mutanten.....	53
Tabelle 3.1: Infektiösität und Übertragbarkeit von AbMV, SiGMV/CR, SiGMV/Ho _{yv} und deren pseudorekombinanter Viren.	61
Tabelle 3.2: Mechanische Inokulation von <i>N. tabacum</i> mit AbMV, SiGMV/CR, SiGMV/Ho _{yv} und deren Pseudorekombinationen, sowie von SiGMV/CR-CP-Chimär (Konstrukt L) und AbMV-CP-Chimär (Konstrukt C).	65
Tabelle 3.3: Aufnahme und Übertragung von pseudorekombinanten Viren, AbMV, SiGMV/Cund SiGMV/Hoyv durch <i>B. tabaci</i>	66
Tabelle 3.4: Partikelbeschuss von <i>S. rhombifolia</i> und <i>L. esculentum</i> mit Monomer DNA von AbMV-CP-Mutanten DNA A / AbMV DNA B.....	68

LITERATURVERZEICHNIS

- Abouزيد, A. & Jeske, H. (1985).** The purification and characterization of gemini particles from *Abutilon* mosaic virus infected *Malvaceae*. *J. Phytopathology* **115**, 344-353.
- Abouزيد, A. M., Barth, A. & Jeske, H. (1988).** Immunogold labeling of the *Abutilon* mosaic virus in ultrathin sections of epoxy resin embedded leaf tissue. *J. Ultrastruct. Res.* **99**, 39-47.
- Atreya, C. D., Raccah, B. & Pirone, T. P. (1990).** A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* **178**, 161-165.
- Atreya, P. L., López-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1995).** Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids residues involved in potyvirus transmission by aphids. *J. Gen. Virol.* **76**, 265-270.
- Azzam, O., Frazer, J., De La Rosa, D., Beaver, J. S., Ahlquist, P. & Maxwell, D. P. (1994).** Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **204**, 289-296.
- Bedford, I. D., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C. & Markham, P. G. (1994a).** Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (GENNADIUS) biotypes from different geographic regions. *Ann. appl. Biol.* **125**, 311-325.
- Bedford, I. D., Kelly, A., Banks, G. K., Briddon, R. W., Cenis, J. L. & Markham, P. G. (1998).** *Solanum nigrum*: An indigenous weed reservoir for tomato yellow leaf curl geminivirus in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 221-222.
- Bedford, I. D., Pinner, M. S., Liu, S. & Markham, P. G. (1994b).** *Bemisia tabaci* – Potential infestation, phytotoxicity and virus transmission within European agriculture. *Proceedings of British Crop Protection Conference – Pests and*

Diseases **3**, 911-916.

- Birnboim H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513.
- Blanc, S., Cerutti, M., Usmany, M., Vlak, J. M., & Hull, R. (1993).** Biological activity of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor in a heterologous system. *Virology* **192**, 643-650.
- Blanc, S., López-Moya, J.-J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. (1997).** A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**, 141-147.
- Boulton, M. I. & Markham. P. G. (1986).** The use of squash blotting to detect plant pathogens in insect vectors. In *Development in Applied Biology*, Vol.1, Edited by R. A. C. Jones and L. Torrance, pp 55-69.
- Bourtzis, K., Banks, G. K., Bedford, I. D., Markham, P. G., Frohlich, D. & Beitia, F. (2001).** *Wolbachia* infections in whiteflies. In: *European Whitefly Symposium, Ragusa, Sicily / Italy*, pp 61-62.
- Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Richards, K. & Ziegler-Graff, V. (2000).** Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J. Virol.* **74**, 1140-1148.
- Brault, V., van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J.-C., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1995).** Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J.* **14**, 650-659.
- Briddon, R. W., Bedford, I. D., Tsai, J. H. & 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. & Markham, P. G. (1990).** Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* **177**, 85-94.
- Briddon, R. W., Watts, J., Markham, P. G. & Stanley, J. (1989).** The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* **172**, 628-633.

- Brown, J. K. & Bird, J. (1992).** Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Dis.* **76**, 220-225.
- Brown, J. K., Caballero, R., Rogan, D., & Bird, J. (2001).** Evidence for a *Bemisia tabaci* species-complex: Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequence analysis confers one group comprising all *B. tabaci*, and mating between AZ A, AZ B, and *Jatropha* biotypes corroborate a single biological species. In: *European Whitefly Symposium, Ragusa, Sicily / Italy*, pp 23-24.
- Brown, J. K., Coats, S. A., Bedford, I. D., Markham, P. G., Bird, J. & Frohlich, D. R. (1995b).** Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemical Genetics* **33**, 205-214.
- Brown, J. K., Frohlich, D. R. & Rosell, R. C. (1995a).** The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu. Rev. Entomol.* **40**, 511-534.
- Buchner, P. (1965).** Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience, New York, 1965.
- Costa, H. S. & Brown, J. K. (1991).** Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* (Genn.) and the association of one population with silverleaf symptom induction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **61**, 211-219.
- Czosnek, H., Ber, R., Antignus, Y., Cohen, S., Navot, N. & Zamir, D. (1988).** Isolation of tomato yellow leaf curl virus, a geminivirus. *Phytopathology* **78**, 508-512.
- Dettner, K. & Peters, W. (1999).** Übersicht über die Vielfalt der Insekten. In: *Lehrbuch der Entomologie*, 1.Auflage. Hrsg.: Dettner, K. & Peters, W., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1999.
- Dry, I. B., Rigden, J. E., Krake, L. R., Mullineaux, P. M. & Rezaian, M. A. (1993).** Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. *J. Gen. Virol.* **74**, 147-151.
- Dubern, J. (1994).** Transmission of African cassava mosaic geminivirus by the whitefly (*Bemisia tabaci*). *Trop. Sci.* **34**, 82-91.
- Ellsworth, P. C. & Gerling, D. (2001).** Practice and challenges in whitefly IPM. In:

European Whitefly Symposium, Ragusa, Sicily / Italy, p 75.

- Espinoza, A. M., Medina, V., Hull, R. & Markham, P. G. (1991).** Cauliflower mosaic virus gene II product forms distinct inclusion bodies in infected cells. *Virology* **185**, 337-344.
- Frischmuth, T. & Stanley, J. (1991).** African cassava mosaic virus DI DNA interferes with the replication of both genomic components. *Virology* **183**, 539-544.
- Frischmuth, T. (1999).** Genome of DNA viruses. In: *Molecular biology of plant viruses*. Edited by C. L. Mandahar. Kluwer Academic Publishers, Boston / Dordrecht / London, pp 29-46.
- Frischmuth, T., Engel, M., Lauster, S. & Jeske, H. (1997).** Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *J. Gen. Virol.* **78**, 2675-2682.
- Frischmuth, T., Roberts, S., von Arnim, A. & Stanley, J. (1993).** Specificity of bipartite geminivirus movement proteins. *Virology* **196**, 666-673.
- Frischmuth, T., Zimmat, G. & Jeske, H. (1990).** The nucleotide sequence of Abutilon mosaic virus reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. *Virology* **178**, 461-468.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. & Raccach, B. (1992).** A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *J. Gen. Virol.* **73**, 2183-2187.
- Gardiner, W. E., Sunter, G., Brand, L., Elmer, J. S., Rogers, S. G. & Bisaro, D. M. (1988).** Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO J.* **7**, 899-904.
- Ghanim, M., Morin, S. & Czosnek, H. (2001).** Rate of *tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* **91**, 188-196.
- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M. & Czosnek, H. (1998).** Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* **240**, 295-303.
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Paplomatas, E. J., Rojas, M., Hou, Y.-M. &**

- Maxwell, D. P. (1993).** Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* **74**, 23-31.
- Gildow, F. E. & Gray, S. M. (1993).** The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of Barley yellow dwarf luteovirus. *Phytopathology* **83**, 1293-1302.
- Gildow, F. E. (1987).** Virus-membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids. *Curr. Top. Vector Res.* **4**, 93-120.
- Gildow, F. E. (1993).** Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology* **83**, 270-277.
- Gray, S. M. (1996).** Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends Microbiol.* **4**, 259-264.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S. & Robertson, D. (1999).** Geminiviruses: Models for plant replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 71-106.
- Harrison, B. D. (1985).** Advances in Geminivirus research. *Ann. Rev. Phytopathol.* **23**, 55-82.
- Hennig, W. (1968).** Wirbellose II (Gliedertiere), Taschenbuch der Zoologie, Band 3; 3., durchges. Auflage, VEB Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1968.
- Höfer, P., Bedford, I. D., Markham, P. G., Jeske, H. & Frischmuth, T. (1997a).** Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an Insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* **236**, 288-295.
- Höfer, P., Engel, M., Jeske, H. & Frischmuth, T. (1997b).** Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *J. Gen. Virol.* **78**, 1785-1790.
- Höfer, P., Engel, M., Jeske, H. & Frischmuth, T. (1997c).** Host Range Limitation of a pseudorecombinant Virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *MPMI* **10**, 1019-1022.
- Hoffmann, G. M., Nienhaus, F., Poehling, H.-M., Schönbeck, F., Weltzien, H. C. & Wilbert, H. (1994).** Lehrbuch der Phytomedizin, 3. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 1994.
- Hogenhout, S. A., van der Wilk, F., Verbeek, M., Goldbach, R. & van den**

- Heuvel, J. F. J. M. (1998).** Potato leafroll virus binds to the equatorial Domain of the aphid endosymbiotic GroEL homolog. *J. Virol.* **72**, 358-365.
- Horns, T. & Jeske, H. (1991).** Localization of Abutilon mosaic virus DNA within leaf tissue by in-situ hybridization. *Virology* **181**, 580-588.
- Howarth, A. J., Caton, J., Bossert, M. & Goodman, R. M. (1985).** Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3572-3576.
- Hunter, W. B., Hiebert, E., Webb, S. E., Tsai, J. H. & Polston, J. E. (1998).** Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Dis.* **82**, 1147-1151.
- Kheyr-Pour, A., Bananej, K., Dafalla, G. A., Caciagli, P., Noris, E., Ahoonmanesh, A., Lecoq, H. & Gronenborn, B. (2000).** Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence comparison and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology* **90**, 629-635.
- Kirk, A. A., Lacey, L. A., Brown, J. K., Ciomperlik, M. A., Goolsby, J. A., Vacek, D. C., Wendel, L. E. & Napompeth, B. (2000).** Variation in the *Bemisia tabaci* s.l. species complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies leading to successful biological control of *Bemisia* biotype B in the USA. *Bull. Entomol. Res.* **90**, 317-327.
- Lazarowitz, S. G. & Beachy, R. N. (1999).** Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* **11**, 535-548.
- Lazarowitz, S. G. (1992).** Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Crit. Rev. Plant Sci.* **11**, 327-349.
- Lazarowitz, S. G. (1999).** Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 332-338.
- Liu, L., Davis, J. W. & Stanley, J. (1998).** Mutational analysis of bean yellow dwarf, a geminivirus of the genus *Mastrevirus* that is adapted to dicotyledonous plants. *J. Gen. Virol.* **79**, 2265-2274.
- Liu, S., Bedford, I. D., Briddon, R. W. & Markham, P. G. (1997).** Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *J. Gen. Virol.* **78**, 1791-1794.
- Liu, S., Briddon, R. W., Bedford, I. D., Pinner, M. S. & Markham, P. G. (1998).**

- Identification of genes directly and indirectly involved in the insect transmission of African cassava mosaic geminivirus by *Bemisia tabaci*. *Virus Genes* **18**, 5-11.
- López-Moya, J. J., Wang, R. Y. & Pirone, T. P. (1999)**. Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J. Virol.* **80**, 3281-3288.
- Markham, P. G., Bedford, I. D., Liu, S. & Pinner, M. S. (1994)**. The transmission of geminiviruses by *Bemisia tabaci*. *Pestic. Sci.* **42**, 123-128.
- Martin, J. H., Mifsud, D. & Rapisarda, C. (2000)**. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean Basin. *Bull. Entomol. Res.* **90**, 407-448.
- Martin, R. R., Keese, P. K., Young, M. J., Waterhouse, P. M., & Gerlach, W. L. (1990)**. Evolution and molecular biology of luteoviruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **28**, 341-363.
- Mathew, A. V. & Muniyappa, V. (1992)**. Purification and characterisation of Indian cassava mosaic virus. *J. Phytopathol.* **135**, 299-308.
- Matthews, R. E. F. (1991)**. Plant virology, 3rd edition, Academic Press Inc., San Diego.
- Moffat, A. S. (1999)**. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science* **286**, 1835.
- Morin, S., Ghanim, M., Sobol, I. & Czosnek, H. (2000)**. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology* **276**, 404-416.
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M. & van den Heuvel, J. F. J. M. (1999)**. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **256**, 75-84.
- Moriones, E., Accotto, G. P., Noris, E. & Cavallarin, L. (1993)**. First report of tomato yellow leaf curl virus in Spain. *Plant Dis.* **77**, 953.
- Morozov, S. & Solovyev, S. (1999)**. Genome organization in RNA viruses. In: *Molecular biology of plant viruses*. Edited by C. L. Mandahar. Kluwer Academic Publishers, Boston / Dordrecht / London, pp 47-98.

- Morris-Krsinich, B. A. M., Mullineaux, P. M., Donson, J., Boulton, M. I., Markham, P. G., Short, M. N. & Davies, J. W. (1985).** Bidirectional transcription of maize streak virus DNA and identification of the coat protein gene. *Nucl. Acids Res.* **13**, 7273-7256.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263.
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D. & Czosnek, H. (1991).** Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* **185**, 151-161.
- Noris, E., Hidalgo, E., Accotto, G. P. & Moriones, E. (1994).** High similarity among the TYLCV isolates from the west Mediterranean basin: The nucleotide sequence of an infectious clone from Spain. *Arch. Virol.* **135**, 165-170.
- Noris, E., Vaira, A. M., Caciagli, P., Masenga, V., Gronenborn, B. & Accotto, G. P. (1998).** Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J. Virol.* **72**, 10050-10057.
- Orozco, B. M., Miller, A. B., Settlege, S. B. & Hanley-Bowdoin, L. (1997).** Functional domains of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 9840-9846.
- Padidam, M., Beachy, R. N. & Fauquet, C. M. (1995).** Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *J. Gen. Virol.* **76**, 25-35.
- Palmer, K. E., & Rybicki, E. P. (1998).** The molecular biology of mastreviruses. *Adv. Virus research.* **50**, 183-234.
- Pascal, E., Goodlove, P. E., Wu, L. C. & Lazarowitz, S. G. (1993).** Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *Plant Cell* **5**, 795-807.
- Perring, T. M., Cooper, A. D., Russell, R. J., Farrar, C. A. & Bellows, T. S., Jr. (1993).** Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* **259**, 74-77.
- Pirone, T. P. & Blanc, S. (1996).** Helper-dependent vector transmission of plant

- viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34**, 227-247.
- Polaszek, A. & Viggiani, G. (2001).** Whitefly natural enemies in Europe: Biosystematics and biological control. In: *European Whitefly Symposium, Ragusa, Sicily / Italy*, p 61.
- Polston, J. E. & Anderson, P. K. (1997).** The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis.* **81**, 1358-1369.
- Pooma, W. & Petty, I. T. D. (1996).** Tomato golden mosaic virus open reading frame AL4 is generally distinct from its C4 analogue in monopartite geminiviruses. *J. Gen. Virol.* **77**, 1947-1951.
- Power, A. G. (2000).** Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 336-340.
- Regel, E. (1875).** Neue oder empfehlenswerte Zierpflanzen. In: *Gartenflora*, Hrsg.: Regel, E., Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart, Seiten 116-117.
- Rochester, D. E., Kositrana, W. & Beachy, R. N. (1990).** Systemic movement and symptom production following agroinoculation with a single DNA of tomato yellow leaf curl geminivirus (Thailand). *Virology* **178**, 520-536.
- Rosell, R. C., Torres-Jerez, I. & Brown, J. K. (1999).** Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whiteflies extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology* **89**, 239-246.
- Rothnie, H. M., Chapdelaine, Y. & Hohn, T. (1994).** Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies. *Adv. Virus Res.* **44**, 1-67.
- Rubinstein, G. & Czosnek, H. (1997).** Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *J. Gen. Virol.* **78**, 2683-2689.
- Rybicki, E. P. & Pietersen, G. (1999).** Plant virus problems in the developing world. *Adv. Virus Research* **53**, 127-175.
- Rybicki, E. P., Briddon, R. W., Brown, J. E., Fauquet, C. M., Maxwell, D. P., Harrison, B. D., Markham, P. G., Bisaro, D. M., Robinson, D., & Stanley, J. (2000).** Geminiviridae. In: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff,

- M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wicker; Academic Press, San Diego, pp 285-297.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Saunders, K. & Stanley, J. (1995).** Complementation of African cassava mosaic virus AC2 gene function in a mixed bipartite geminivirus infection. *J. Gen. Virol.* **76**, 2287-2292.
- Saunders, K., Lucy, A. & Stanley, J. (1991).** DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2325-2330.
- Schlee, D. & Kleber, H. P. (1991).** Biotechnologie (Teil I). 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1991.
- Schmidt, I., Blanc, S., Espérandieu, P., Kuhl, G., Devauchelle, G., Louis, C. & Cérutti, M. (1994).** Interaction between the aphid transmission factor and virus particles is a part of the molecular mechanism of cauliflower mosaic virus aphid transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8885-8889.
- Schuster, G. (1998).** Viren in der Umwelt. 1. Auflage, B. G. Teubner Verlag, Stuttgart, Leipzig, 1998.
- Settlage, S. B., Miller, A. B. & Hanley-Bowdoin, L. (1996).** Interactions between geminivirus replication proteins. *J. Virol.* **70**, 6790-6795.
- Stanley, J. & Townsend, R. (1986).** Infectious mutants of cassava latent virus generated *in vivo* from intact recombinant DNA clones containing single copies of the genome. *Nucleic Acids Res.* **14**, 5981-5998.
- Sung, Y. K. & Coutts, R. H. A. (1995a).** Mutational analysis of potato yellow mosaic geminivirus. *J Gen. Virol.* **76**, 1773-1780.
- Sung, Y. K. & Coutts, R. H. A. (1995b).** Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic virus. *J Gen. Virol.* **76**, 2809-2815.
- Sunter, G. & Bisaro, D. M. (1991).** Transactivation in a geminivirus, AL2 gene

- product is needed for coat protein expression. *Virology* **180**, 416-419.
- Sunter, G., Stenger, D. C. & Bisaro, D. M. (1994).** Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. *Virology* **203**, 203-210.
- Thresh, J. M., Fargette, D. & Otim-Nape, W. G. (1994).** Effects of African cassava mosaic geminivirus on the yield of cassava. *Trop. Sci.*, **34**, 26-42.
- Timmermans, M. C. P., Das, O. P. & Messing, J. (1994).** Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 79-112.
- Townsend, R., Stanley, J., Curson, S. J. & Short, M. N. (1985).** Major polyadenylated transcripts of cassava latent virus and location of the gene encoding the coat protein. *EMBO J.* **4**, 33-37.
- Unsel, S., Ringel, M., Höfer, P., Höhnle, M., Jeske, H., Bedford, I. D., Markham P. G. & Frischmuth, T. (2000).** Host range and symptom variation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Arch. Virol.* **145**, 1449-1454.
- van den Heuvel, J. F. J. M., Bruyère, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F. & Richards, K. (1997).** The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol.* **71**, 7258-7265.
- van den Heuvel, J. F. J. M., Franz, A. W. E. & van der Wilk, F. (1999).** Molecular basis of virus transmission. In: *Molecular biology of plant viruses*. Edited by C. L. Mandahar. Kluwer Academic Publishers, Boston / Dordrecht / London, pp 183-200.
- van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M. & van der Wilk, F. (1994).** Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* **75**, 2559-2565.
- von Arnim, A. & Stanley, J. (1992).** Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology* **186**, 286-293.
- von Arnim, A., Frischmuth, T. & Stanley, J. (1993).** Detection and possible functions of African cassava mosaic virus DNA B gene products. *Virology* **192**, 264-272.

Wege, C., Gotthardt, R.-D., Frischmuth, T. & Jeske, H. (2000). Fulfilling Koch's postulates for *Abutilon mosaic virus*. *Arch. Virol.* **145**, 2217-2225.

Wu, Z. C., Hu, J. S., Polston, J. E., Ullman, D. E. & Hiebert, E. (1996). Complete nucleotide sequence of a nonvector-transmissible strain of Abutilon mosaic geminivirus in Hawaii. *Phytopathology* **86**, 608-613.

Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W. & McKenna, R. (2001). Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology* **279**, 471-477.

MEINE HOCHSCHULPROFESSOREN

in alphabetischer Reihenfolge:

Prof. T. Adamek	Mathematik
Prof. G. Diekert	Mikrobiologie
Prof. B. Föhlisch	Organische Chemie
PD T. Frischmuth	Molekularbiologie, Virologie
Prof. H.-D. Görtz	Zoologie, Parasitologie
Prof. P. Gräber	Biophysikalische Chemie
Prof. D. Hülser	Biophysik
Prof. D. Jauch	Zoologie
Prof. H. Jeske	Molekularbiologie, Virologie
Prof. H.-J. Knackmuss	Mikrobiologie
Prof. U. Kull	Botanik, Pflanzenphysiologie, Ökologie, Evolution
Prof. P. Kunze	Tierphysiologie
Prof. P. Levi	Informatik
Prof. R. Mattes	Industrielle Genetik
Prof. J. Mitrovic	Verfahrenstechnik
Prof. E. Möhn	Entomologie
Prof. H. Paus	Physik
Prof. K. Pfizenmaier	Zellbiologie
Dr.-Ing. M. Rizzi	Bioverfahrenstechnik
Prof. D. Roller	Informatik
Prof. P. Scheurich	Immunologie
Prof. G. Schmidt-Kastner	Biotechnologie
Prof. S. Seybold	Botanik, Vegetationskunde
Prof. C. Syldatk	Mikrobiologie, Bioverfahrenstechnik
Prof. J. Weidlein	Anorganische Chemie
Prof. D. H. Wolf	Biochemie

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Frischmuth für seine exzellente Betreuung, sein nie nachlassendes Interesse an der Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Holger Jeske danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit in seiner Abteilung.

Danken möchte ich Prof. Peter Markham, Dr. Ian Bedford und Dr. Rob Briddon für die gute Zusammenarbeit sowie für den so erfolgreichen und angenehmen Aufenthalt am John Innes Centre.

Meiner Kollegin Frau Dr. Susanne Lauster gilt ein besonderes Dankeschön für ihre gute Zusammenarbeit, ihre wertvollen Tipps und Ratschläge sowie für ihre aufmunternden Worte.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen (Biologisches Institut, Universität Stuttgart) und des Department of Virus Research (John Innes Centre) möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima, sowie deren Hilfsbereitschaft bedanken. An dieser Stelle seien besonders Frau Dr. Christina Wege, Frau Margit Ringel und Herr Werner Preiß erwähnt.

Für die gute und zuverlässige Pflege meiner Pflanzen möchte ich mich bei den Gärtnern, besonders bei Frau Sigrid Kober und Herrn Rolf-Diether Gotthardt, bedanken.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir das Studium und die Promotion ermöglichten. Meinen Freunden Michael Giraud, Nicolai Glasbrenner und Michael Kaiser sei gedankt für die mentale Unterstützung während der Arbeit und für ein engagiertes Korrekturlesen des Manuskripts.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Stuttgart, 18. August 2001

Martin Höhnle