

**Auftreten, Variabilität und Rekombination von
Kartoffelviren unter besonderer Berücksichtigung des
Kartoffelvirus Y (*Potato virus Y*) in transgenen und nicht-
transgenen Kartoffeln**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Gartenbauwissenschaft

-Dr. rer. hort.-

genehmigte Dissertation von

Dipl. -Ing. agr. Stefan Flatken

geboren am 12. 4. 1976 in Cloppenburg

Hannover, November 2006

Referent: Prof. Dr. Edgar Maiß

Koreferentin: Prof. Dr. Carmen Büttner

Tag der Verteidigung: 14.11.2006

Kurzfassung

Im Rahmen eines vierjährigen freisetzungsbegleitenden Biomonitoring-Projekts (2001-2004) wurde die Abundanz und die Variabilität verschiedener Kartoffelviren in transgenen - im Kohlenhydratmetabolismus gentechnisch veränderter - Kartoffellinien der Sorte Désirée (Fructankartoffeln) im Vergleich zur nicht-transgenen Ausgangslinie und zu weiteren Vergleichssorten (Agria, Granola, Linda, Solara) in Freiland- und Gewächshausexperimenten untersucht. Der Virusbefall wurde anhand der Symptomausprägung der Kartoffelpflanzen auf der Freisetzungsfläche bonitiert, und darüber hinaus wurden Knollen aller Versuchsvarianten nach der Ernte serologisch auf Infektionen mit fünf verschiedenen Kartoffelviren (*Potato virus Y* (PVY), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Potato virus M* (PVM), *Potato virus X* (PVX) und *Potato virus S* (PVS)) überprüft. Abgesehen von der Sorte Solara, bei der über die Jahre hinweg kaum Virusinfektionen nachgewiesen werden konnten, wurden bei allen transgenen und nicht-transgenen Varianten serologisch überwiegend nur PVY-Infektionen festgestellt, während die übrigen oben genannten Viren nur in einzelnen Proben identifiziert werden konnten. Dabei fiel in zwei von drei Nachernteuntersuchungen von den insgesamt sechs transgenen Varianten im Vergleich zu der nicht-transformierten Variante Désirée lediglich eine durch leicht geringere PVY-Befallshäufigkeiten auf. Zur Stammdifferenzierung von PVY-Isolaten wurden insgesamt 642 hüllproteingehaltende Fragmente mittels RT-PCR amplifiziert und durch RFLP Analysen bzw. durch Sequenzierungen molekular charakterisiert. Die PVY-Stammspektren unterschieden sich nicht zwischen den transgenen und der nicht-transgenen Vergleichsvariante Désirée. Bei all diesen Varianten konnte sowohl PVY^{NTN} als auch PVY^O festgestellt werden, wobei der Anteil an PVY^{NTN} Infektionen deutlich über dem des PVY^O lag. Anders verhielt es sich mit den Vergleichssorten Agria und Granola, da bei den Pflanzen der Sorte Agria fast ausschließlich PVY^O-Infektionen und bei denen der Sorte Granola mit großer Mehrheit PVY^{NTN} Infektionen festgestellt werden konnten. Durch die Sequenzierung von 56 PVY Fragmenten konnte nur eines identifiziert werden, das zufälligerweise aus einer transgenen Variante stammte, und sich nach näherer Analyse als eine Rekombinante zwischen beiden Stammgruppen erwies.

Kurzfassung

In weiteren freisetzungsunabhängigen Labor- und Gewächshausversuchen wurde das Auftreten und die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen zwischen transgenen Tabakpflanzen und deletierten PVX Virusgenomen untersucht. Dieses Virus besitzt einen so genannten „Triple Gene Block“ (TGB), der einen Genombereich von drei sich überlappenden Open Reading Frames (ORF) darstellt, deren Proteine maßgeblich an der Virusausbreitung in der Pflanze beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden in zwei verschiedenen PVX-Volllängenklonen (PVX1 und PVX2) von denen der zweitgenannte eine DsRed-Markierung besitzt, jeweils Deletionen in den Bereichen des TGB-ORF1 (Del1) und TGB-ORF2 (Del2) erzeugt, wobei das Leseraster nicht verändert wurde. Die so hergestellten PVX-Mutanten verloren ihre Infektiosität. Es ist denkbar, dass solche Deletionsmutanten ihre fehlenden Genomabschnitte von transgenen Pflanzen, die diese fehlenden viralen Bereiche exprimieren, durch homologe Rekombinationsereignisse zurückerlangen könnten. Um dieses zu überprüfen wurden die vier verschiedenen PVX-Deletionsmutanten (PVX1-Del1, PVX1-Del2, PVX2-Del1 und PVX2-Del2) mittels Partikel-Bombardement in transgene Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) eingebracht, die den jeweiligen ORF (TGB1 oder TGB2) komplett exprimierten. Im Gegensatz zu den mit den PVX Volllängenklonen (PVX1 oder PVX2) inokulierten Tabakpflanzen, konnten bei allen transgenen Pflanzen, die mit den entsprechenden Deletionsmutanten inokuliert worden waren, keine Symptome einer PVX-Infektion festgestellt werden. Bei den serologischen Untersuchungen der transgenen Pflanzen 28 Tage nach Inokulation (dpi) mit den Deletionsmutanten konnte bei keiner TGB2 transgenen Pflanze eine PVX-Infektion nachgewiesen werden. Von den TGB1-transgenen Pflanzen wiesen jedoch 55% (Inokulum PVX-Del1) bzw. 36% (Inokulum PVX2-Del1) eine PVX-Infektion auf. Die Infektion durch PVX2-Del1 bestätigte auch der Nachweis der DsRed-Fluoreszenz. Um zu überprüfen, ob eine Rekombination stattgefunden hatte, wurde der Presssaft der positiv getesteten TGB1-transgenen Pflanzen mechanisch auf drei nicht-transgene Tabakpflanzen übertragen. Bei keiner dieser Pflanzen konnte durch die serologische Überprüfung (28 dpi) eine PVX-Infektion festgestellt werden. Während es bei beiden PVX-Del1 Mutanten und TGB1 exprimierenden Pflanzen zur Infektion und Komplementation kam, konnte dies für die PVX-Del2 Mutanten und TGB2 transgenen Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Homologe Rekombinationsereignisse, die zu einer Rekonstitution des kompletten

Virusgenoms geführt hätten, konnten nicht festgestellt werden. Um festzustellen, inwieweit in nicht-transgenen und mit PVX und PVM mischinfizierten Tomatenpflanzen, rekombinante Viren auftreten, wurden insgesamt 40 Tomatenpflanzen mechanisch mit einer Mischung aus PVM- und PVX-haltigem Pflanzenpresssaft co-inokuliert. Da der PVX-haltige Pflanzenpresssaft von einer Pflanze stammte, die zuvor mit dem Volllängenklon (PVX1) per Partikel Bombardement inokuliert worden war, war somit auch die virale Genomsequenz des PVX bekannt. Deshalb wurde ein RFLP Ansatz verwendet, um Rekombinationen im Bereich des TGB- und Hüllproteinens des PVX aufzudecken. Jedoch konnte bei keiner der 40 Tomatenpflanzen 28 dpi ein rekombinantes Virus identifiziert werden. Um die Auswirkung einer Rekombination zwischen diesen Viren im Hüllproteinbereich des PVX auf die Fitness des rekombinanten Virus näher charakterisieren zu können, wurde der Hüllproteinbereich des PVX-Volllängenklons PVX1 mit der entsprechenden Sequenz des PVM ausgetauscht. 28 Tage nach Inokulation dieses Konstrukts in *N. benthamiana* ließen sich weder serologisch noch mittels RT-PCR systemische virale Infektionen feststellen. Für zukünftige Rekombinationsuntersuchungen oder auch für die Überprüfung von Virusresistenzen neuer Kartoffelsorten ist es gelungen, eine infektiöse cDNA Kopie des PVM herzustellen. Nach Gesamt-RNA Extraktion einer PVM infizierten *Nicotiana glauca* -Pflanze konnten nach reverser Transkription und anschließender PCR zwei Fragmente (ca. 5,5 und ca. 3,2 kb) amplifiziert werden, die nacheinander in ein Plasmid kloniert wurden, das einen verdoppelten 35S *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) Promotor enthielt. Nach Klonierung dieser Kasette, bestehend aus dem verdoppelten 35S CaMV Promotor und die virale Genomsequenz in den modifizierten binären Vektor pBIN_SN wurden insgesamt 10 rekombinante Plasmide mittels Agroinfiltration in *N. benthamiana*, *N. glauca* und Tomatenpflanzen eingebracht. Acht von diesen waren in der Lage in diesen Pflanzen systemische PVM Infektionen auszulösen. Die virale Sequenz eines dieser rekombinanten Plasmide wurde bestimmt, und mit mehreren Sequenzen anderer Carlaviren verglichen.

Schlagwörter:

Biologische Sicherheitsforschung, Fructankartoffel, Kartoffelviren, *Potato virus Y* (PVY), Rekombination, PVX, PVM, PVM-Volllängenklon

Abstract:

In a monitoring research project (2001-2004) natural virus abundance and virus variability of potato infecting viruses in carbohydrate modified transgenic potato lines and non transgenic control lines of the variety Désirée and additional four commercially available potato varieties (Agria, Granola, Linda and Solara) were investigated in the field and greenhouse. Virus incidence was monitored by symptoms. In addition tubers were collected and analysed by serological means for the presence of *Potato virus Y* (PVY), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Potato virus M* (PVM), *Potato virus X* (PVX) and *Potato virus S* (PVS). PVY was found as the predominant virus in potato fields. However, the cultivar Solara was resistant to PVY infection. With the exception of one transgenic potato line, which was less often PVY infected than the others in comparison with the non-transgenic line Désirée in two of three post harvesting testing periods, no noticeable difference in the abundance and variability of PVY was identified between the other transgenics and non transgenic line of the variety Désirée.

Strain differentiation of PVY-Isolates was done after RT-PCR of coat protein gene containing fragments, followed by RFLP analysis and sequencing. PVY^O was found mainly in the cultivar Agria, while PVY^{NTN} was predominantly found in plants of the cultivar Granola. All other lines and varieties contained PVY^O as well as PVY^{NTN}, whereas the majority harboured PVY^{NTN}. RFLP analysis of 642 and sequence analysis of 56 fragments containing the PVY coat protein gene, respectively, revealed one fragment, which originated by chance from a transgenic plant and proved to be a recombinant of both strains.

Recombination events were studied in greenhouse experiments between deletion mutants of PVX and transgenic tobacco plants, possessing the deleted sequences. PVX possess a „triple gene block“ (TGB), which represents a viral genomic region of three overlapping ORFs, important for virus movement. Independent „in frame“ deletions were made in the ORFs of TGB1 (Del-1) and TGB2 (Del-2) of two PVX full-length clones (PVX1 and PVX2), whereby PVX2 contained an additional DsRed-marker gene. The four deletion mutants (PVX1-Del1, PVX1-Del2, PVX2-Del1 and PVX2-Del2) were unable to infect non transgenic tobacco plants. For testing the possibility that the genomes of these PVX deletions mutants can be restored by homologous recombination

events in transgenic plants, expressing these missing sequences, the PVX deletion mutants were inoculated in transgenic tobacco plants (*N. benthamiana*), expressing the whole PVX-TGB1 or PVX-TGB2, respectively. In opposite to tobacco plants, inoculated with PVX1 or PVX2 by particle bombardment, no symptoms could be observed in transgenic plants inoculated with the different mutants. By serological testing of transgenic plants, inoculated with the different PVX deletion mutants, no TGB2 transgenic tobacco plant revealed a PVX infection. On the other hand, 55% of the TGB1 transgenic plants, inoculated with PVX1-Del1 and 36% of TGB1 expressing plants, inoculated with PVX2-Del1 were systemically infected by PVX. In case of PVX2-Del1 this result was verified by the DsRed fluorescence, too. For testing, if homologous recombination events resulted in the reconstitution of the viral genome, virus containing plant sap of each of these systemically PVX infected plants was mechanically transferred to three non transgenic tobacco plants. Nevertheless, no recombinant virus was identified from those plants.

For discovering the degree of non-homologous recombination events between PVX and PVM in 40 mixed infected tomato plants, the TGB and coat protein region of the PVX was analysed by RLFP. No recombination event was detected 28 dpi in the analysed PVX genomic region.

A coat protein chimeric PVX was constructed, to collect information about the effects, how a recombination event would influence the fitness of a chimeric virus. The the coat protein gene fragment of PVX-1 was changed with that of PVM. This coat-protein chimeric PVX clone was inoculated to *N. benthamiana* plants by particle bombardment. Neither by serological methods, nor by RT-PCR, viral infections were detectable 28 dpi in these plants, showing, that such a putative recombination event would result in the loss of viral infectivity.

For additional investigation processes, an infectious full-length cDNA clone of PVM was produced. Total RNA was extracted from a PVM infected *Nicotiana glauca* plant. Synthesis of cDNA and subsequent PCR revealed two DNA fragments of about 5,5 kbp and 3,2 kbp. The fragments were cloned into a plasmid, containing an enhanced 35S *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) promoter. Prior agroinfection the entire cassette consisting of the 35S CaMV promoter and the PVM genomic sequence was subcloned

abstract

into a modified binary vector (pBIN-SN) and electroporated into *Agrobacterium tumefaciens*. Eight out of ten recombinant plasmids were able to establish systemical PVM infections in *N. hesperis*, *S. lycopersicon* and *N. benthamiana*. The genomic sequence of the PVM was determined and compared with sequences of other viruses, belonging to the genus *Carlavirus*.

Keywords:

risk assessment, fructan potato, potato viruses, *Potato virus Y* (PVY), recombination, PVX, PVM, infectious PVM full-length cDNA clone

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Geschichte, Bedeutung und neue Anforderungen der Kartoffel	1
1.2. Fructane als zusätzliche Inhaltsstoffe gentechnisch veränderter Kartoffeln	3
1.3. Vorstellung der einzelnen Kartoffelviren	9
1.3.1. <i>Potato virus Y</i> (PVY).....	10
1.3.2. <i>Potato virus X</i> (PVX)	24
1.3.3. <i>Potato virus M</i> (PVM) und <i>Potato virus S</i> (PVS)	37
1.3.4. <i>Potato leafroll virus</i> (PLRV).....	44
1.4. Rekombination bei Pflanzenviren	48
1.4.1. Modell der RNA Rekombination	49
1.5. Zielsetzungen und Aufgabenstellungen der vorliegenden Arbeit	55
2. Material und Methoden	57
2.1. Material.....	57
2.1.1. Chemikalien.....	57
2.1.2. Geräte.....	59
2.1.3. Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits	61
2.1.4. Software.....	62
2.1.5. Synthetische Oligonukleotide (Primer)	62
2.1.6. Restriktionsendonukleasen (Enzyme)	66
2.1.7. DNA/RNA/Protein -modifizierende Enzyme.....	67
2.1.8. Verwendete Antiseren	68
2.1.9. Plasmide und Nukleinsäuren	68
2.1.10. Verwendete Marker	69
2.1.11. Infektiöse Volllängenklone.....	69
2.1.12. Bakterienstämme	69
2.1.13. Pflanzenmaterial	70
2.1.14. Verwendete Virusisolate und ihre Herkünfte	72
2.1.15. Zuordnung der Datenbanksequenzen verschiedener Viren des Genus <i>Carlavirus</i>	72
2.2. Puffer und Lösungen	73
2.2.1. Gibberellinsäurelösungen zur Aufhebung der Keimruhe.....	73
2.2.2. Abreibepuffer zur Virenübertragung	74
2.2.3. Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	74
2.2.4. Puffer für die DNA Extraktion (nach Edwards <i>et al.</i> 1991).....	75
2.2.5. Puffer für die Lagerung von DNA bzw. RNA.....	75
2.2.6. Puffer für die Silica RNA-Extraktionsmethode.....	76
2.2.7. Puffer der DNA/RNA/Protein -modifizierenden Enzyme	77
2.2.8. Puffer und Lösungen für die Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden	78
2.2.9. Zusammensetzungen der verwendeten Restriktionsenzym-puffer	79
2.2.10. Puffer und Lösungen für die Isolierung rekombinanter Plasmid - DNA (Minipräparation).....	81
2.2.11. Puffer für die serologischen Untersuchungen (ELISA und TPIA).....	81
2.2.12. Puffer für die SDS Gelelektrophorese und den Western - Blot.....	83
2.2.13. Puffer für die Agroinfiltration	86
2.2.14. Medien und Medienzusätze	86

2.3.	Methoden.....	89
2.3.1.	Anzucht und Kultur von Versuchspflanzen.....	89
2.3.2.	Herstellung von Augenstecklingen aus Kartoffelknollen und Überwindung der natürlichen Keimruhe durch Gibberellinsäurebehandlung.....	90
2.3.3.	Freisetzungen der transgenen und nicht transgenen Kartoffeln	90
2.3.4.	Serologische Nachweismethoden	95
2.3.5.	Molekularbiologische Grundtechniken	101
2.3.6.	Nukleinsäure Extraktionsmethoden.....	104
2.3.7.	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR und RT-PCR.....	106
2.3.8.	Modifikationen von DNA Fragmenten	108
2.3.9.	Ligationsansätze	110
2.3.10.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden.....	112
2.3.11.	Aufarbeitung der Plasmide für die Auftragssequenzierung	116
2.3.12.	Restriktion von DNA-Fragmenten	117
2.3.13.	Partikel - Bombardement.....	119
2.3.14.	Agroinfektion	122
2.3.15.	Mechanische Virusübertragung.....	124
2.3.16.	Elektronenoptische Darstellung von Pflanzenviren	125
2.3.17.	Herstellung von Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie.....	125
2.4.	Spezielle Methoden	126
2.4.1.	Erzeugung von „in frame“ Deletionsmutanten des PVX	126
2.4.2.	Herstellung der PVM-PVX Chimären.....	128
2.4.3.	Herstellung eines PVM Vollängenklons	129
3.	Ergebnisse.....	133
3.1.	Abundanz und Variabilität der natürlicherweise auftretenden Viruspopulationen während den Freisetzungen 2001-2004.....	133
3.1.1.	Stichprobenartige Überprüfung des Pflanzgutes	133
3.1.2.	Ermittlung virusinfizierter Pflanzen in den Freisetzungen.....	136
3.1.3.	Ermittlung der Häufigkeit verschiedener Viren im Freisetzungsversuch	139
3.1.4.	Nachernteuntersuchungen	144
3.1.5.	RFLP-Untersuchungen und Sequenzanalysen von PVY-Fragmenten zur Bestimmung der verschiedenen PVY-Stämme	158
3.1.6.	RFLP-Analyse von weiteren PVY-Fragmenten.....	167
3.1.7.	Sequenzvariabilität innerhalb der PVY Hüllproteinfragmente	168
3.2.	Freisetzungsunabhängige Labor- und Gewächshausexperimente.....	175
3.2.1.	Untersuchungen zur homologen Rekombination von PVX- Deletionsmutanten in transgenen Tabakpflanzen.....	175
3.2.2.	Herstellung der PVX Deletionsmutanten	176
3.2.3.	Untersuchungen zum Auftreten rekombinanter Viren in PVX und PVM mischinfizierten Tomatenpflanzen	182
3.2.4.	Überprüfung der Fitness des artifiziell hergestellten hüllproteinchimären Vollängenklons pPVX/M-CP.....	184
3.2.5.	Herstellung einer infektiösen cDNA Kopie des PVM	186
4.	Diskussion	200

4.1.	Untersuchungen zur Abundanz und Variabilität der verschiedenen Viren während der Freisetzen 2001-2004	200
4.1.1.	Vergleich zwischen den erwarteten und den vorgefundenen PVY-Befallshäufigkeiten in den Freisetzen.....	202
4.1.2.	PVY als prädominantes Virus bei den serologischen Nacherntetungen	204
4.1.3.	Molekulare Untersuchungen und Sequenzanalysen von PVY-hüllproteingenenthaltenden Fragmenten	209
4.1.4.	Sequenzierung ausgewählter PVY hüllproteingenenthaltener Fragmente	214
4.2.	Untersuchungen zur homologen Rekombination zwischen PVX-TGB1 bzw. PVX-TGB2 transgenen <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen und die im TGB1 oder TGB2 Deletionen aufweisenden PVX-Mutanten	216
4.3.	Untersuchungen zum Vorkommen intermolekularen Rekombination zwischen dem PVX und PVM.....	225
4.3.1.	Verlust der Infektiosität des zwischen den Viren PVX und PVM artifiziell erschaffenen hüllproteinchimären Virus.....	229
4.4.	Konstruktion eines PVM Vollängenklons.....	233
4.5.	Abschlussbetrachtung und Ausblick	239
5.	Anhang	242
5.1.	PVY Anfälligkeiten der verschiedenen Kartoffelsorten.....	242
5.2.	Sequenzen phylogenetische Stammbäume.....	242
5.2.1.	Sequenz des mit Hilfe der Primer PVMXCPup und PVMXCPdown amplifizierten PVM Hüllproteinfragments.....	242
5.2.2.	Phylogenetische Stammbäume des PVM und anderer Carlaviren auf Basis ihrer Aminosäuresequenzen (AS-Sequenzen)	243
5.2.3.	Konserviert vorliegende Motive innerhalb des carlaviralen ORF1.....	249
5.2.4.	Aminosäuresequenzen der einzelnen PVM ORFs.....	250
5.2.5.	Nukleotidsequenz des PVM	253
5.2.6.	Sequenzen der PVY –hüllproteingenenthaltenden Fragmente.....	264
6.	Tabellenverzeichnis	286
7.	Abbildungsverzeichnis	288
8.	Literaturverzeichnis	291
9.	Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit.....	337
10.	Lebenslauf	338
11.	Erklärung	340
	Danksagung	343

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen:

%	Prozent
3'-UTR	3'-nicht-translatierte Region
35S	35S-Promotor des CaMV
5'-UTR	5'-nicht-translatierte Region
λ	Lambda
™	Trade Mark
A	Adenin
<i>A. bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
<i>A. dest.</i>	destilliertes Wasser
abs.	absolut
Amp.	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
as	antisense
ad	auffüllen
ATP	Adenosin-Trisphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
b	Basen
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin / Bundessortenamt
ca.	circa
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
Camp	Chloramphenicol
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CP	<i>coat protein</i> (Hüllprotein)
cv.	cultivar
d. h.	das heißt
DAS-ELISA	Double-Antibody-Sandwich ELISA
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
DMSO	Dimethylsuloxid
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat (G/A/T/C)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DsRed	rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma striata</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskop
<i>et al.</i>	Et alii (lat.: und andere)
EtOH	Ethanol
FFT	„fructan:fructan-1-fructosyltransferase“
g	Erdbeschleunigung (9,8 m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green-fluorescent-protein</i>
ha	Hektar
HC-Pro	Helferkomponente Protease („helpercomponent protease“)
Hrsg.	Herausgeber
ICTV	<i>International Committee of Taxonomy of Viruses</i>
IC-RT-PCR	Immunocapture RT-PCR
IPTG	Isopropyl- α -D-thio-galactopyranosid
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
klx	Kilolux
Kn	Kanamycin
l.	Liter
LM	low melting (niedrig schmelzend)
M	molar
MCS	(multiple cloning site) Mehrfachklonierungsort
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min.	Minute
mRNA	messenger RNA
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i> ; Polylinker in Plasmiden
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> der Vereinigten Staaten von Amerika
n. d.	nicht durchgeführt
ng	Nanogramm
ncr	non-coding region
nos	Nopalin Synthetase
npt II	Neomycin Phototransferase II, vermittelt Resistenz gegenüber Kn (Kn ^R)
npt III	Neomycin Phototransferase III
nt	Nukleotid

Abkürzungsverzeichnis

NTR	„nontranslated region“ (nichttranslatierbarer Bereich)
OD _{550/600}	optische Dichte bei 550 oder 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain Reaction“ Polymerase Kettenreaktion
pers. Komm.	Persönliche Kommunikation
pH	negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Wasserstoff-Ionen in einer wässrigen Lösung
Phusion DP	Phusion TM High-Fidelity DNA Polymerase
PTA-ELISA	Plate trapped Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ori	Origin of replication
RdRp	RNA-abhängige RNA Polymerase
RP	Riboproteinkomplex
RE	Restriktionsendonuklease
RFLP	Restriktionsfragment Längen Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur (20-22°C)
s	sense
SD	Shine-Dalgarno-Motiv
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodium-Dodecyl-Sulfate)
sec.	Sekunden
SEL	Größenausschlusslimit („size exclusion limit“)
1-SST	„sucrose:sucrose-1-fructosyltransferase“
Std.	Stunde
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TGB	Triple gene block
TPIA	Tissue-Print-Immuno-Assay
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
UpM	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
VPg	viral kodierendes Genom-assoziiertes Protein
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Nukleinsäuren und Aminosäuren

A		Adenin
C		Cytosin
G		Guanin
T		Thymin
U		Uracil
A	(Ala)	Alanin
C	(Cys)	Cystein
D	(Asp)	Aspartatsäure
E	(Glu)	Glutaminsäure
F	(Phe)	Phenylalanin
G	(Gly)	Glycin
H	(His)	Histidin
I	(Ileu)	Isoleucin
K	(Lys)	Lysin
L	(Leu)	Leucin
M	(Met)	Methionin
N	(Asn)	Asparagin
P	(Pro)	Prolin
Q	(Gln)	Glutamin
R	(Arg)	Arginin
S	(Ser)	Serin
T	(Thr)	Threonin)
V	(Val)	Valin
W	(Trp)	Tryptophan
Y	(Tyr)	Tyrosin

Buchstabencode für Nukleinsäuren

R	G oder A
Y	C oder T
W	A oder T
M	A oder C
K	G oder T
S	C oder G
H	A, C oder T
V	A, C oder G
B	C, G oder T
D	A, G oder T
N	G, A, T oder C

Pflanzennamen

<i>C. quinoa</i>	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
<i>D. barbartus</i>	<i>Dianthus barbartus</i> L.
<i>D. caryophyllus</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin
<i>N. clevelandii</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i> Gray
<i>N. debneyi</i>	<i>Nicotiana debneyi</i> Domin
<i>N. hesperis</i>	<i>Nicotiana hesperis</i> Burbidge
<i>N. glutinosa</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i> L.
<i>N. occidentalis</i>	<i>Nicotiana occidentalis</i> L.
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
<i>S. lycopersicon</i>	<i>Solanum lycopersicon</i> L.
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i> L.

Abkürzungsverzeichnis

Virusabkürzungen

AcoLV	<i>Aconitum latent virus</i>	HVS	<i>Helenium virus S</i>
AMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	LSLV	<i>Lily symptomless virus</i>
BaMV	<i>Bamboo mosaic virus</i>	LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>	NCLV	<i>Narcissus common latent virus</i>
BCMNV	<i>Bean common mosaic necrosis virus</i>	NMV	<i>Narcissus mosaic virus</i>
BIScV	<i>Blueberry scorch virus</i>	PAMV	<i>Potato aucuba mosaic virus</i>
BDMV	<i>Bean draft mosaic virus</i>	PsBMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>	PPV	<i>Plum pox virus</i>
BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	PopMV	<i>Poplar mosaic virus</i>
BPMV	<i>Bean pod mottle virus</i>	PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>
BtMV	<i>Beet mosaic virus</i>	PVA	<i>Potato virus A</i>
BVX	<i>Banana mosaic virus</i>	PVBP	<i>Pepper vein banding virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow draft virus</i>	PVM	<i>Potato virus M</i>
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	PVS	<i>Potato virus S</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	PVY	<i>Potato virus Y</i>
CCMV	<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>	PVX	<i>Potato virus X</i>
CLV	<i>Carnation latent virus</i>	RCNMV	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>
CIYMV	<i>Clover yellow mosaic virus</i>	SMV	<i>Soybean mosaic virus</i>
CIYVV	<i>Clover yellow vein virus</i>	TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	TBRV	<i>Tomato black ring virus</i>
CPMV	<i>Cowpea mosaic virus</i>	TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
CsCMV	<i>Cassava common mosaic virus</i>	TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
CVB	<i>Chrysanthemum virus B</i>	TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
CYMV	<i>Clover yellow mosaic virus</i>	TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
DVS	<i>Daphne virus S</i>	TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>
FoMV	<i>Foxtail mosaic virus</i>	TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
GarLV	<i>Garlic latent virus</i>	VeLV	<i>Verbena latent virus</i>
GVB	<i>Grapevine virus B</i>	WCIMV	<i>White clover mosaic virus</i>
KLV	<i>Kalanchoe latent virus</i>	WSMV	<i>Wheat streak mosaic virus</i>
HpLV	<i>Hop latent virus</i>	WPMV	<i>Wild potato mosaic virus</i>
		ZVX	<i>Zygocactus virus X</i>
		ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

1. Einleitung

1.1. Geschichte, Bedeutung und neue Anforderungen der Kartoffel

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) wurde vor über 400 Jahren von den Spaniern während ihrer Erkundung Nordamerikas entdeckt und nach Europa gebracht (Bertram Reuter, 1988; 1997). Gegen Ende des 16. Jahrhunderts gelangte sie auch nach Deutschland, wo sie zunächst als beliebte Zierpflanze angebaut wurde. Erst im 17. Jahrhundert nach dem Ende des Dreißigjährigen Krieges wurde die Kartoffel als Erdapfel kultiviert (Putz, 1997). Nachdem ihr Potenzial als Grundnahrungsmittel erkannt wurde, um Hungersnöte zu lindern, förderte Friedrich der Große in großem Umfang den Kartoffelanbau zur Mitte des 18. Jahrhunderts. Schließlich hielt die Kartoffel zu Beginn des 19. Jahrhunderts auch über Preußens Grenzen hinweg als wichtiges Volksnahrungsmittel Einzug in die übrigen Länder Deutschlands (Bertram Reuter, 1988; Wirsing, 1988).

Heutzutage stellt die Kartoffel eine wichtige landwirtschaftliche Kulturpflanze dar. Laut dem Statistischen Bundesamt Deutschlands betrug die Kartoffelanbaufläche im Jahre 2004 insgesamt 295300 ha und im Jahre 2005 wurde eine vorläufige Fläche von 276300 ha angegeben. Weiterhin wurden im Jahre 2004 ca. 13 Millionen Tonnen Kartoffeln geerntet, während das vorläufige Ergebnis der Ernte des Jahres 2005 auf ca. 11 Millionen Tonnen beziffert wird. Neben der Bedeutung als Rohstoff für die Stärkeproduktion und als Tierfutter spielen Kartoffeln auch für die menschliche Ernährung eine entscheidende Rolle. Laut dem Bericht des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft vom 31. August 2005 verbrauchte in den Jahren 2003/2004 ein Bundesbürger 66,8 kg Kartoffeln je Jahr.

Die traditionelle Methode, Eigenschaften der Kartoffel zu verbessern, ist das Kreuzen zweier relativ leistungsfähiger Eltern und das Selektieren der besten Nachkommen, die dann zur weiteren Züchtung verwendet werden. Die Kulturkartoffel ist tetraploid, das heißt, es gibt zu jedem Gen vier Allele. Mit konventionellen Züchtungsverfahren lassen sich nur Gene in neue Sorten überführen, die dem Genreservoir der Kartoffel angehören.

1. Einleitung

Mittlerweile konnten gentechnische Lösungen für die Züchtung neuer Kartoffelsorten gefunden werden, die sich durch Eigenschaften wie z.B. erhöhter Resistenz gegen verschiedene Krankheits- und Schaderreger auszeichnen. Hierzu gehören beispielsweise zum einen nematodenresistente Kartoffelvarianten, die durch eine Integration verschiedener Resistenzgene erzeugt werden konnten (Atkinson *et al.*, 2001; Urwin *et al.*, 2001, 2003; Cowgill *et al.*, 2002). Zum anderen konnten auch Kartoffelvarianten produziert werden, die durch die Expression verschiedener vom *Bacillus thuringiensis* (B.t.) abstammender Gene für Delta-Endotoxine, eine insektizide Wirkung gegenüber Fraßschädlingen aufweisen (Adang *et al.* 1993; Perlak *et al.*, 1993 und Chan *et al.*, 1996). In ähnlicher Weise konnten auch Kondrák *et al.* (2005) eine Verzögerung des Wachstums und der Entwicklung von Kartoffelkäferlarven nachweisen, die sich vom Laub transgener Kartoffelpflanzen ernährten, die ein aus einer Heuschreckenart stammendes proteinasehemmendes Protein exprimierten.

Auch gegen bakterielle Schaderreger wurden transgene Kartoffeln erzeugt, wie die T4-Lysozymkartoffeln (Düring, 1996; Düring *et al.*, 1993), oder die von Lorenc-Kukula *et al.* (2005) erzeugten Kartoffeln der Sorte Désirée. Letztere wiesen aufgrund der Expression einer Anthocyanin 5-O-Glucosyltransferase eine im Vergleich zu der nicht-transformierten Ausgangslinie eine zwei- bis dreifach höhere Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* auf. Als resistent gegenüber *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora infestans* und *Erwinia carotovora* erwiesen sich die von Osusky *et al.* (2004) hergestellten Kartoffeln der Sorte Désirée, die ein modifiziertes Peptid (Temporin A) synthetisierten, das eine breite mikrobizide Wirkung besitzt.

Ebenso wurden verschiedene transgene Kartoffellinien entwickelt, die sich als resistent gegenüber verschiedenen Kartoffelviren auszeichneten. Beispielsweise erzeugten Huisman *et al.* (1992) und Xu *et al.* (1995) Kartoffelvirus X resistente Kartoffelvarianten, während Missiou *et al.* (2004), Solomon-Blackburn und Barker (2001), Hassairi *et al.* (1998), Kaniewski *et al.* (1990), Lawsen *et al.* (1990), Malnoe *et al.* (1994), Okamoto *et al.* (1996), Pehu *et al.* (1995), Smith *et al.* (1995), Maki-Valkama (2000) und Missiou *et al.* (2004) gentechnisch modifizierte Kartoffellinien unterschiedlicher Sorten mit Resistenzeigenschaften gegenüber dem Kartoffelvirus Y erzeugten.

Zusätzlich wurden von weiteren Kartoffelvarianten berichtet, bei denen neben einer Ertragssteigerung (Thiele *et al.*, 1999) die gezielte Veränderung der Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe dieser Knollen im Mittelpunkt standen, um diese Stoffe als Rohstoffe für technische Zwecke besser nutzen zu können. Hierzu zählen neben einer veränderten Stärkezusammensetzung in den Knollen (Kuipers *et al.* 1991) auch dextranhaltige Knollen (Kok-Jacon *et al.*, 2005) oder Kartoffeln, die sich durch einen stark reduzierten bis nicht mehr vorhandenen Amylosegehalt auszeichneten (Kuipers *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurden eine Reihe von transgenen Kartoffellinien hergestellt, die dem Verbraucher direkte Vorteile bringen sollen. Als Beitrag zur gesünderen Ernährung stellten Chakraborty *et al.* (2000) Kartoffeln her, die ein nicht allergieauslösendes und reich an verschiedenen essenziellen Aminosäuren bestehendes Protein aus Amarant exprimierten. In einem weiteren Beispiel seien die von Park *et al.* (2005) hergestellten transgenen Kartoffeln genannt, die aufgrund der Expression eines aus *Arabidopsis thaliana* stammenden Kalzium-Transportkomplexes eine erhöhte Kalziumaufnahme der Pflanzen bewirkten, so dass der Verzehr dieser Knollen zu einer Verringerung von Krankheiten, die auf Kalziummangel zurückzuführen sind, beitragen könnten.

Zu Schluss seien die Fructan produzierenden Kartoffeln genannt, die basierend auf der Kartoffelsorte Désirée am Max-Planck-Institut in Golm entwickelt wurden (Hellwege *et al.*, 2000). Da diese Kartoffelvarianten in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle einnehmen, sollen im Folgenden Fructane und ihr Syntheseweg in Pflanzen näher beschrieben werden.

1.2. Fructane als zusätzliche Inhaltsstoffe gentechnisch veränderter Kartoffeln

Die zu den Ballaststoffen zählenden Fructane werden auch Polyfructosylsucrosen genannt, und stellen Mehrfach-Fruchtzuckermoleküle (Polyfructosen) dar (Ritsema *et al.*, 2003). Sie werden von Saccharose, bestehend aus Glucose (Traubenzucker) und Fructose (Fruchtzucker), aufgebaut. Ähnlich wie die unlösliche Stärke oder die Saccharose gehören auch die löslichen Fructane in die Gruppe der Speicherkohlenhydrate (Vergauwen *et al.*, 2003). Die pflanzlichen Fructanmoleküle werden in den Vakuolen der Zellen synthetisiert und gelagert. Sie nehmen einerseits

1. Einleitung

wichtige Aufgaben in der kurzfristigen Lagerung und der Bereitstellung von Assimilaten und andererseits auch Funktionen der Osmoregulation wahr (Sprenger *et al.*, 1995).

Die einfachste Form der Fructane ist das Inulin, das in verschiedenen dikotylen Pflanzenfamilien wie den *Asteraceae*, *Campanulaceae* und *Boraginaceae* besonders häufig vorkommt (Hendry, 1993). Inuline bestehen aus jeweils einer Glucose, an der eine unterschiedliche Anzahl von Fructoseeinheiten angebunden ist (Lewis, 1993). Die Konzentration und der Grad der Polymerisation ist pflanzenspezifisch. Die Kettenlängen reichen je nach Pflanze von ungefähr zehn bis zu einigen Hundert Fructoseeinheiten. Während beispielsweise der Polymerisationsgrad des in Chicorée gespeicherten Inulins mit 10-15 (Wilson *et al.*, 1999) relativ niedrig ist, konnten z.B. Hellwege *et al.* (2000) in Artischocke (*Cynara scolymus*) und Itaya *et al.* (1997) in der Kugeldistel (*Echinops ritro*) langkettige Inuline entdecken.

Zwei Enzyme konnten bereits identifiziert und isoliert werden, die für die Produktion des Inulins in Pflanzen verantwortlich sind (Edelman und Jefford, 1968; Koops und Jonker, 1996; Lüscher *et al.*, 1996; Van den Ende und Van Laere, 1996): Dabei handelt es sich zum einen um das Enzym „sucrose:sucrose-1-fructosyltransferase“ (1-SST) und zum anderen um die „fructan:fructan-1-fructosyltransferase“ (1-FFT). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten inzwischen sowohl *in vitro* zeigen, dass die Synthese der Fructane des Inulintyps von Saccharose durch die beiden Enzyme (1-SST und 1-FFT) möglich ist (Van Laere und Van den Ende, 2002), wie auch Hellwege *et al.* (2000) *in vivo* durch die Erzeugung inulinproduzierender transgener Kartoffeln (*Solanum tuberosum* cv. Désirée).

Der Syntheseweg der Fructane, ausgehend von Saccharosemolekülen ist in Abb. 1 dargestellt. Das Enzym 1-SST gilt in der pflanzlichen Fructanproduktion als Schlüsselenzym, da es aus zwei Molekülen Saccharose neben dem Inulin „Trisaccharid 1-Kestose“ auch Glucose herstellen kann, und darüber hinaus in der Lage ist, Mehrfachfructane mit einem Polymerisationsgrad von fünf herzustellen (Catchpole, 2005). Im Gegensatz zur 1-SST kann das Enzym 1-FFT nicht Saccharose als Fructosespender verwenden (Edelman und Jefford, 1968; Jeong und Housley, 1992; Koops und Jonker, 1994; Lüscher *et al.*, 1993, 1996; St. John *et al.*, 1997 und Van den

Ende *et al.*, 1996). Als Fructosespender benutzt es statt dessen die 1-Kestose oder auch bereits vorhandene Fructanmoleküle mit einem höheren Polymerisationsgrad. Die Fructosereste werden dann von diesem Enzym (1-FFT) entweder an eine Reihe von Fructan- oder auch Saccharosemolekülen übertragen, die damit als Fructoseakzeptor dienen. In Abhängigkeit von der Saccharoseverfügbarkeit ist 1-FFT somit also auch in der Lage, Fructane zu degradieren. Die enzymatischen Eigenschaften der Enzyme 1-FFT weisen leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzen auf. Bei einem Vergleich zwischen den 1-FFT Enzymen des Chicorées und der Distel stellten Vergauwen *et al.* (2003) Unterschiede im Spektrum der Fructanmoleküle fest. So wies das FFT-1 des Chicorées im Vergleich zum 1-FFT der Distel eine höhere Affinität zu Saccharose, Fructose und 1-Kestose als Substrate auf, so dass beim Chicorée auch lange Fructanketten eher wieder enzymatisch verkürzt werden können.

1. Einleitung

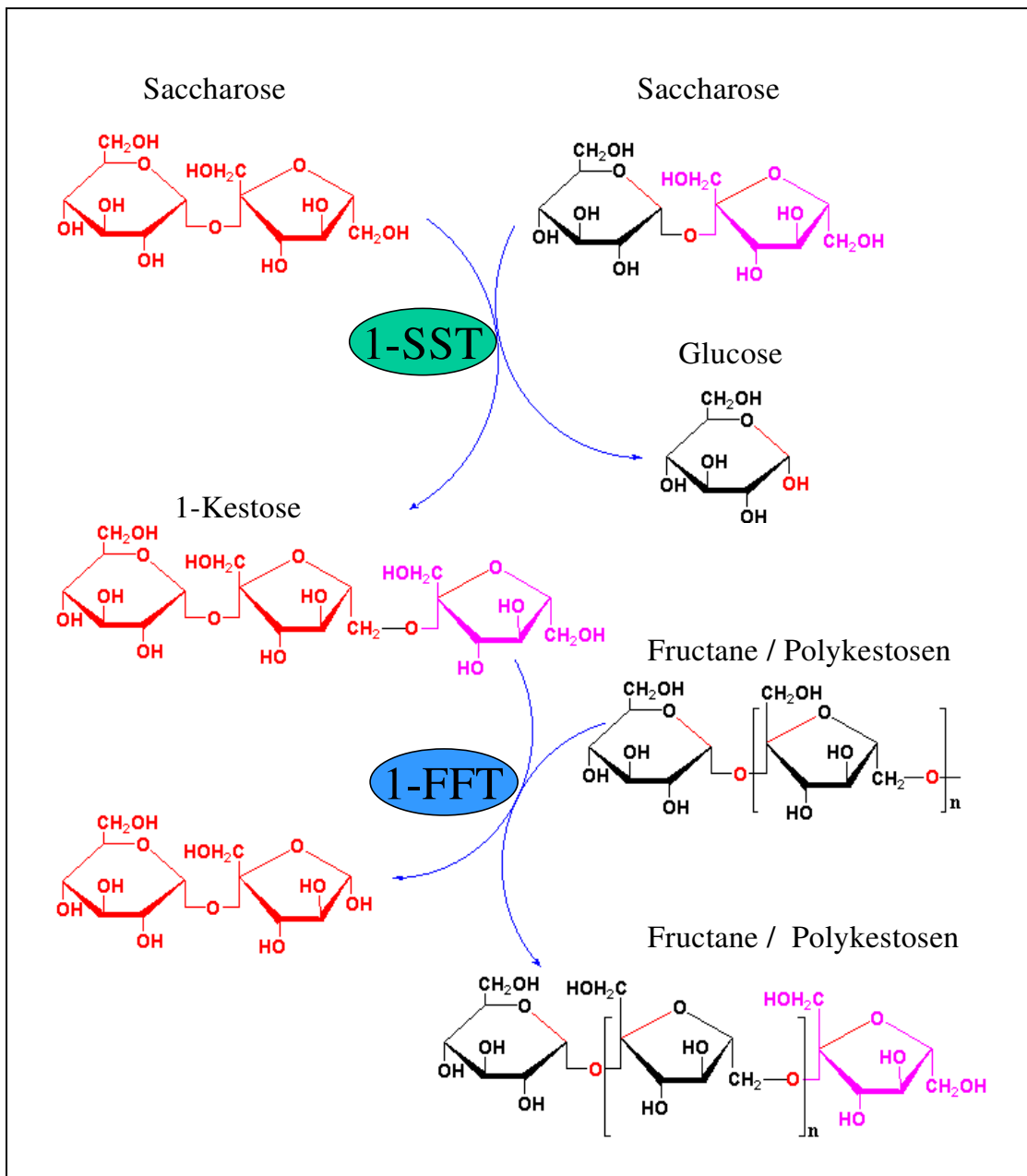


Abb. 1: Schematische Darstellung der pflanzlichen Fructansynthese

Die in pink dargestellte Fructose-Einheit entstammt von einem Saccharosemolekül. Zunächst wird durch das Enzym 1-SST die Verknüpfung zweier Saccharosemoleküle katalysiert, so dass neben der 1-Kestose auch eine Glucose entsteht. Anschließend kann die Fructoseeinheit vom Enzym 1-FFT von der 1-Kestose auf verschiedene Fructane oder Polykestosen übertragen werden.

(Schema übernommen aus www.uky.edu/~dhild/biochem/13/lect13.html; März 2005).

Legende: 1-SST = sucrose:sucrose-1-fructosyltransferase; 1-FFT = fructan:fructan-1-fructosyltransferase

Zusammengefasst von Ritsema *et al.* (2003) sind seit mehr als 10 Jahren positive gesundheitliche Effekte der Fructane bekannt. Der aus Chicorée stammende Mehrfachzucker Inulin ist das am Häufigsten verwandte Fructan in Lebensmitteln. In der Lebensmittelindustrie findet es in Joghurts, Eiscreme und Brotaufstrichen als Fettersatz Verwendung. Inuline kommen auch natürlicherweise in Lebensmitteln wie Zwiebeln, Lauch, Artischocke und Pflaume vor. Den Fructanen wird nachgesagt, dass sie einen Einfluss auf verschiedene Bakterien wie den *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*- Arten besitzen, und sich damit positiv auf die Gesundheit auswirken können (Roberfroid, 1993 und Gibson *et al.*, 1995).

Aufgrund der probiotischen Effekte dieser Stoffe wurde das Interesse geweckt, Fructane auch von Pflanzen produzieren zu lassen, die dazu normalerweise nicht in der Lage sind. Hellwege *et al.* (2000) stellten Kartoffeln (*S. tuberosum* L. cv. Désirée) her, die aus der Artischocke (*Cynara scolymus*) stammenden Fructosyltransferasen (1-SST und 1-FFT) konstitutiv exprimierten. In den geernteten Knollen konnte das volle Spektrum an unterschiedlich langen Inulinmolekülen mit einem Polymerisationsgrad von bis zu 200 entdeckt werden. Außerdem nahmen diese einen Anteil von bis zu 5% der Trockenmasse der Kartoffelknollen an. Es wurde auch eine leicht verringerte Stärkekonzentration in den Knollen beobachtet, obwohl sich die Konzentrationen an Saccharose in den Blättern und Knollen nicht änderten (Hellwege *et al.*, 2000). Weiterhin konnten Catchpole *et al.* (2005) durch eine Analyse der Inhaltsstoffe bei den verschiedenen transgenen Kartoffelvarianten der Sorte Désirée und mehreren nicht-transgenen Sorten (Désirée, Linda, Agria, Solara und Granola) zwar große Schwankungen zwischen den einzelnen Kartoffelvarianten feststellen. Die gentechnisch veränderten Varianten der Sorte Désirée wiesen jedoch im Vergleich zu den übrigen untersuchten Sorten neben dem erwarteten Gehalt an inulinähnlichen Polysacchariden keine zusätzlichen unerwarteten Inhaltsstoffe auf (Catchpole *et al.*, 2005).

Für die biologische Sicherheitsforschung waren diese Fructankartoffeln als Modellpflanzen für vegetativ vermehrbare, gentechnisch veränderte Kulturpflanzen von besonderem Interesse. In einem mehrjährigen Freisetzungsversuch (2001 bis 2004) wurden verschiedene Fructankartoffelvarianten zusammen mit den bereits oben erwähnten nicht-transformierten Vergleichslinien im Freiland angebaut. Um die Frage

1. Einleitung

zu klären, inwieweit die für Kartoffeln völlig neuen Zuckerkomponenten zu veränderten Wechselwirkungen mit der Umwelt führen können, wurden von mehreren Arbeitsgruppen durch anbaubegleitende Datenerhebungen und weiterführende Laborexperimente die transgenen Kartoffelvarianten im Vergleich zu den nicht transgenen Kartoffellinien auf verschiedene Merkmale hin untersucht. Neben der Identifizierung veränderter phänotypischer Merkmale und Anfälligkeiten gegenüber wichtigen Schaderregern, wurden auch nach möglichen Auswirkungen auf den Kartoffelkäfer und ökologisch relevante Mikroorganismen Untersuchungen durchgeführt. Weitere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Identifizierung potenzieller Effekte der transgenen Varianten bezüglich ihrer Stresstoleranz und ihrer Fitness, sowie ihren Reaktionen auf Wasserstress (Knipp und Honermeier, 2006). Eine ausführliche Darstellung der Forschungsarbeiten und einen Überblick über die erzielten Ergebnissen sind im Internet unter www.biosicherheit.de einsehbar.

Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren ebenfalls Teil dieses Forschungsprojektes und beschäftigten sich unter anderem mit dem Vorkommen und den Zusammensetzungen verschiedener Kartoffelviruspopulationen in den transgenen und nicht-transgenen Kartoffelvarianten.

Viruskrankheiten spielen aufgrund der vegetativen Vermehrung der Kartoffeln im Kartoffelanbau und besonders im Pflanzkartoffelanbau eine entscheidende Rolle. Infolge mechanischer Übertragungen über Verletzungen, die durch landwirtschaftliche Geräte im Rahmen der Durchführung von Kulturmaßnahmen entstehen, oder aufgrund vektorieller Übertragung durch verschiedene Blattlausarten können Kartoffelviren im Bestand stark verbreitet werden (Primärinfektion). In bereits befallenen Pflanzen können die Viren auch in die neu gebildeten Knollen gelangen (Sekundärinfektion), so dass der Anteil an virusinfiziertem Pflanzgut stetig zunehmen kann.

Deshalb findet die Produktion von Pflanzkartoffeln in Deutschland vor allem in Niedersachsen, Mecklenburg Vorpommern, Bayern und Schleswig-Holstein in so genannten Gesundlagen statt, die von Arenz und Hunnius (1959) näher charakterisiert wurden. Im Jahre 2004 wurden in Deutschland insgesamt 272 verschiedene Kartoffelsorten zur Vermehrung angebaut. Als Pflanzkartoffeln dürfen nur solche Knollen gehandelt werden, die aufgrund der behördlichen Untersuchungen als virusfrei

bzw. entsprechend der Virustoleranzgrenzen in den einzelnen Vermehrungsstufen anerkannt wurden. So erlauben die gesetzlichen Vorschriften eine Belastung des Vorstufen- bzw. Basispflanzgutes mit nur maximal 2 % schwerem Virus (hierzu zählen das Kartoffelvirus Y, Kartoffelvirus M und das Kartoffelblattrollvirus) bzw. 4 % leichtem Virus (hierzu werden die Viren Kartoffelvirus X und Kartoffelvirus S gezählt). Dagegen darf zertifiziertes Pflanzgut (Z-Pflanzgut) maximal 8% schweres bzw. 32 % leichtes Virus beinhalten.

Da in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zum Auftreten der oben genannten Pflanzenviren in den transgenen und nicht-transgenen Kartoffelvarianten durchgeführt wurden, werden die Pflanzenviren zunächst im Folgenden kurz vorgestellt.

1.3. Vorstellung der einzelnen Kartoffelviren

Wie bereits oben erwähnt wurden sowohl die Fructankartoffeln wie auch nicht-transgene Kartoffeln auf Infektionen mit fünf verschiedenen Kartoffelviren untersucht. Wegen der besonderen Bedeutung des PVY, des PVM und des PVX für die vorliegende Arbeit, sollen diese drei Viren intensiver als die übrigen beiden (PLRV und PVS) behandelt werden.

1.3.1. *Potato virus Y (PVY)*

Verschiedene Pflanzenarten, vor allem aus der Familie der *Solanaceae*, wie Kartoffel, Paprika, Tabak und Tomaten werden vom PVY befallen, aber auch einige Pflanzen aus den Familien *Chenopodiaceae* und *Leguminaceae* gehören zu dessen Wirtspflanzenkreis (de Bokx und Huttinga, 1981). Das PVY tritt weltweit auf und führt zu bedeutenden Ernteverlusten an ökonomisch wichtigen *Solanaceae*-Arten (wie z.B. der Kartoffel). Im Kartoffelanbau zählt es zu den am weitesten verbreitetsten und gefährlichsten Viren der Kartoffel. In Abhängigkeit von der Interaktion zwischen Kartoffelsorte, Virusstamm und Infektionszeitpunkt können Verluste bis zu 90% entstehen (Weidemann, 1990). Die Knollen infizierter Kartoffeln zeichnen sich häufig neben einer verminderten Knollengröße auch durch einen geringeren Stärkegehalt aus. Die durch eine PVY Infektion entstehenden Schadbilder hängen ebenfalls sowohl von der infizierten Kartoffelsorte, wie auch vom Virusstamm ab. Bei einigen Kartoffelsorten äußert sich ein Befall mit dem gewöhnlichen PVY Stamm (PVY^O) dadurch, dass an den Blattunterseiten strichelförmige Nekrosen sichtbar werden können (Strichelkrankheit) und dass diese Fiederblätter im Laufe der Vegetationsperiode eine Braunfärbung annehmen und schließlich abgestorben, am Stängel herunterhängend, verbleiben. Im Gegensatz dazu lassen sich an verschiedenen Kartoffelsorten, die mit dem an Tabak Adernekrosen erzeugenden N-Stamm (PVY^N) infiziert sind, lediglich nur schwach ausgeprägte Mosaikscheckungen im Laub erkennen. Ein weiterer bekannter PVY-Stamm (PVY^C) erzeugt bei einigen Kartoffelsorten ein so genanntes „stipple streak Symptom“ und kann zum vorzeitigen Absterben der Pflanzen führen.

Die Ausprägungen der Mosaikerscheinungen können bei weniger anfälligen Sorten in Abhängigkeit von der Witterung und der Nährstoffversorgung der Pflanzen derart schwach ausfallen, dass diese Symptome bei den Pflanzen im Bestand leicht übersehen werden können. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls bekannt, dass die durch das PVY^O hervorgerufenen Mosaiksymptome, sowohl durch kühle Temperaturen (unter 10°C), als auch hohe Temperaturen (über 25°C) maskiert werden und deshalb häufig kaum zu erkennen sind.

Im Jahre 1931 wurde das PVY erstmals beschrieben und gilt als Typspezies innerhalb des Genus *Potyvirus*. Es gehört zur Familie der *Potyviridae*, welche die größte bekannte Pflanzenvirusgruppe darstellt (Ward und Shukla, 1991).

Alle Viren dieser Familie bestehen aus fadenförmigen Partikeln, die eine Länge von 650-900 nm und eine Breite von ungefähr 13 nm aufweisen. Die Hülle dieser Viren besteht aus ca. 2000 Hüllproteinuntereinheiten, die das lineare, positiv orientierte und einzelsträngige RNA Genom einschließen (Chen *et al.*, 2001).

Neben der mechanischen Ausbreitung wird es vor allem durch Blattläuse (über 25 verschiedene Blattlausarten konnten ermittelt werden) in einer nicht-persistenten Weise übertragen. Von den Blattlausarten wird vor allem *Myzus persicae* als Hauptvektor genannt (van Hoof, 1980).

1.3.1.1. Genom des PVY

Die filamentösen Viruspartikel des PVY besitzen ein einzelsträngiges positivsinniges RNA-Genom mit einer Länge von ca. 9700 Nukleotiden (nt). Zwischen den 5'- und 3'-terminalen nicht-kodierenden Sequenzbereichen (5'-UTR und 3'-UTR) befindet sich ein einziger offener Leserahmen (ORF), der für ein 350 kDa Polyprotein kodiert (Riechmann *et al.*, 1992; Robaglia *et al.*, 1989; Thole 1993). Die Abb. 2 zeigt schematisch die Genomstruktur des PVY.

1. Einleitung

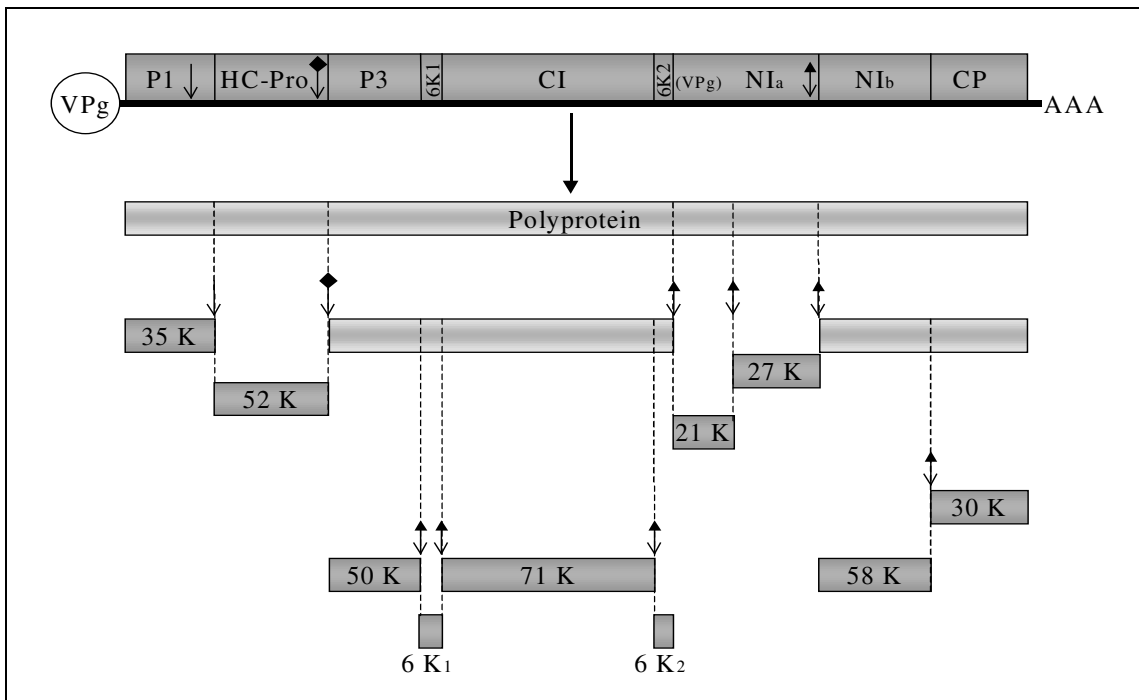


Abb. 2: Schematische Darstellung des PVY-Genoms

Abbildung verändert nach Virus Taxonomy Online, 7. Edition. Die schwarze Linie repräsentiert die potyvirale RNA, an deren 5'-Ende ein VPg kovalent gebunden vorliegt (Kreis) und sich am 3'-Ende ein Poly-A-Schwanz (AAA) befindet. Das dunkle Rechteck auf der viralen RNA steht für das Polyprotein, das durch enzymatische Spaltungen in die einzelnen Funktionseinheiten unterteilt wird. Die aus der Polyproteinprozessierung hervorgegangenen funktionellen Proteine (dunkle schmale Rechtecke) sind mit ihren Molekulargewichten dargestellt. Die Proteaseaktivitäten der verschiedenen viralen Proteine werden durch unterschiedliche kleine Pfeile symbolisiert: Während der Pfeil ↓ die Proteaseaktivität des P1-Proteins symbolisiert, zeigen die mit dem Dreieck markierten Pfeile die Proteaseaktivität des NIa an und die mit dem Karo versehenen Pfeile die Proteaseaktivitäten des HC-Pro.

Legende: P1 und P3 = Protein 1 und Protein 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; NIa, NIb = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; 6K1 und 6K2 = kleine 6kDa große Proteine 1 bzw. 2.

Während am 5'-Ende der potyviralen, positiv-orientierten, einzelsträngigen RNA ein VPg kovalent durch eine Phosphatesterbindung verknüpft vorliegt (Murphy *et al.*, 1991), terminiert ein Poly-A-Schwanz das virale 3'-Ende (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Das Genom eines Virus des Genus *Potyvirus* wird in Form eines Polyproteins translatiert, das durch viruseigene Proteasen (in Abb. 2 durch unterschiedliche Pfeilsymbole dargestellt) durch insgesamt neun enzymatische Spaltungen in die einzelnen funktionellen Proteine P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb und das Hüllprotein (CP) prozessiert wird (Dougherty und Carrington., 1988; Riechmann *et al.*, 1992; Shukla *et al.*, 1994; Robaglia *et al.*, 1989; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Während die Proteinase des P1 und die der Helferkomponente-Proteinase (HC-Pro) nur an ihren eigenen C-terminalen Enden autoproteolytische Spaltungen vornehmen (Carrington *et al.*, 1989; Verchot *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1998), übernimmt die Proteasedomäne (NIa-Pro), die am C-terminalen Bereich des „nuclear inclusion“ Proteins (Kerneinschlusskörper a, NIa) lokalisiert ist, die Spaltungen aller übrigen Schnittstellen (Carrington *et al.*, 1988; Garcia *et al.*, 1990). Die Spaltungen laufen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab, denn Merits *et al.* (2002) stellten fest, dass die Schnittstellen zwischen P3 und 6K1, CI und 6K2 und der internen NIa Schnittstelle im Vergleich zu den übrigen relativ langsam prozessiert werden.

1.3.1.2. Funktionen einzelner potyviralen Genombereiche und Proteine

5'-UTR - Bereich:

Nach Carrington *et al.* (1990), Nicolaisen *et al.* (1992) und Kerkarainen *et al.* (1999) besitzt der am 5'-Ende lokalisierte nicht translatierbare Genomabschnitt (UTR) bei den Potyviren eine Funktion als Translationsbeschleuniger, dessen Wirkungsweisen jedoch noch nicht vollständig geklärt werden konnten. Die ersten 31 Nukleotide des 5'-UTR liegen bei verschiedenen Potyviren relativ konserviert vor, und Simón-Buela *et al.* (1997) konnten zeigen, dass dieser Sequenzbereich beispielsweise beim *Plum pox virus*

1. Einleitung

(PPV) zwar keinen Einfluss auf die Infektiosität dieses Virus besaß, wohl aber für die Pathogenität und für die Virusreplikation Bedeutung hat.

P1:

Neben dem N-terminalen Bereich des Hüllproteingens (CP) gilt der Sequenzbereich des P1 als sehr variabel (Aleman-Verdaguer *et al.*, 1997; Shukla *et al.*, 1991). Zusätzlich zu der bereits oben beschriebenen autoproteolytischen Proteasefunktion wird dem P1 auch eine Beteiligung an der Symptomausbildung zugeschrieben (Wisler *et al.*, 1995; Tordo *et al.*, 1995). Beim *Potato virus A* (PVA), dem *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) und dem *Turnip mosaic virus* (TuMV) konnte für dieses Protein ebenfalls eine RNA-Bindungsaktivität nachgewiesen werden (Brantley und Hunt, 1993; Soumounou und Laliberte, 1994; Merits *et al.*, 1998). Weiterhin nimmt das P1 des PVY wegen seines Vorkommens in Form von cytoplasmatischen Einschlusskörpern auch Aufgaben bei der interzellulären Ausbreitung wahr (Arbatova *et al.*, 1998).

HC-Pro:

Die Helferkomponente HC-Pro übt eine Vielzahl verschiedener Funktionen aus. Neben der Autoproteolyse (Maia *et al.*, 1996) spielt sie bei der Blattlausübertragung eine entscheidende Rolle (Govier *et al.*, 1977; Wang *et al.*, 1998). In ihrer Aminosäuresequenz konnte das Blattlausübertragungssignal: KITC (Atreya und Pirone, 1993) identifiziert werden. Weiterhin ist dieses Protein an der Replikation, an der interzellulären und an der systemischen Ausbreitung beteiligt (Kasschau *et al.*, 1997; Kasschau und Carrington, 2001; Rojas *et al.*, 1997; Spetz und Valkonen, 2003). Darüber hinaus besitzt dieses Protein die Fähigkeit, RNA Moleküle zu binden (Maia und Bernardi, 1996; Merits *et al.*, 1998). Die Symptomausprägungen bei Einzelinfektionen, die synergistische Erhöhung der Virusakkumulation und die Verstärkung der Symptomausprägungen bei Vorliegen von Mischinfektionen mit anderen Pflanzenviren werden vom HC-Pro stark beeinflusst (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997; Redondo *et al.*, 2001, Sáenz *et al.*, 2001). Darüber hinaus

konnten Pruss *et al.* (2004) bei transgenen Tabakpflanzen, die das HC-Pro des *Tobacco etch virus* (TEV) exprimierten weitere Effekte beobachten. Im Vergleich zu den nicht-transgenen Varianten wurde eine verstärkte Resistenz gegenüber anderen Viren wie dem *Tobacco mosaic virus* (TMV) und dem *Tomato black ring nepovirus* (TBRV) und gegenüber pilzlichen Pathogenen, wie dem Blaufäuleerreger, nachgewiesen.

Bei Blättern transgener *N. benthamiana* -Pflanzen, die das HC-Pro des PPV transient exprimierten, konnten Yang und Ravelonandro (2002) eine verstärkte Nekrosebildung beobachten, und Tribodet *et al.* (2005) konnten erst kürzlich die Ausbildung von Adernekrosen bei Tabakpflanzen (*N. tabacum*) mit dem C-terminalen Ende des HC-Pros verschiedener PVY^N Isolate in Verbindung bringen.

HC-Pro Proteine interagieren mit sich selbst (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Thornbury *et al.*, 1985; Plisson *et al.*, 2003) und mit verschiedenen viruseigenen Proteinen wie dem CP (Roudet-Tavert *et al.*, 2002) dem P1 (Mertis *et al.*, 1999) und dem VPg (Yambao *et al.*, 2003), sowie auch mit einer Reihe von Wirtspoteinen (Guo *et al.*, 2003).

Das HC-Pro wirkt als „Suppressor des RNA-silencing“ (Kasschau und Carrington, 1998; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Llave *et al.*, 2000; Mette *et al.*, 2001; Mallory *et al.*, 2001; Kasschau und Carrington, 2001; Mlotshwa *et al.*, 2002; Savenkov und Valkonen, 2002; Kasschau *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2003). Die Expression des HC-Pro (Hamilton und Baulcombe, 1999; Hamilton *et al.*, 2002) bewirkte eine deutliche Abnahme von microRNAs und small interfering RNAs (siRNA), die am RNA-Silencing Prozess beteiligt sind.

P3:

Bis jetzt sind nur wenige Funktionen dieses Proteins bekannt (Uruqui-Inchima *et al.*, 2001). So werden dem P3 Funktionen bei der Virusreplikation zugesprochen, (Choi *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1994; Langenberg und Zhang, 1997; Mertis *et al.*, 1999; Rodríguez-Cerezo *et al.* 1993). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten Choi *et al.* (2000) für das P3 des *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) nachweisen, dass sich dieses an weitere P3-, aber auch an P1-, HC-Pro und CI- Proteine binden kann. Durch

1. Einleitung

Sequenzuntersuchungen konnten Kekarainen *et al.* (1999) beim PVA und Choi *et al.* (2001) beim WSMV in den C-terminalen Bereichen dieser Proteine stark konservierte Regionen identifizieren, weshalb Choi *et al.* (2005) vermuteten, dass in diesen Regionen spezifische RNA Bindungselemente vorhanden sein müssen. Durch Mutationsanalysen konnten Choi *et al.* (2005) weiterhin zeigen, dass durch ein innerhalb des P3-Cistrons des WSMV gelegenes internes RNA Element sowohl die Replikation als auch die Ausbreitungsfähigkeit dieses Virus beeinflusst. Neben Funktionen der Replikation werden diesem Protein, wie auch dem 6K1-Protein, Eigenschaften zugeschrieben, die nicht nur die Symptomausprägungen, sondern auch das Wirtspflanzenspektrum und zudem die Stärke der Virulenz beeinflussen (Riechmann *et al.*, 1992; Sáenz *et al.*, 2000; Jenner *et al.*, 2002, 2003; Suehiro *et al.*, 2004).

6K1:

Über die Funktionen dieses Proteins sind nur sehr wenige Informationen vorhanden. Merits *et al.* (1998) konnten diesem Protein keine RNA-Bindungsaktivitäten nachweisen, und der Proteinnachweis erfolgte als P3/6K1 Polyprotein (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Durch die Erzeugung einer Deletion innerhalb der 6K1-kodierenden Sequenz wurde die proteolytische Prozessierung von den benachbarten Proteinen P3 und CI unterbrochen, so dass Merits *et al.* (2002) davon ausgehen, dass der 6K1 Sequenzabschnitt als Brücke (spacer) zwischen dem P3 und dem CI fungiert.

CI:

Neben Helikase- und ATPase-Aktivitäten (Lain *et al.*, 1990, 1991; Fernandez *et al.*, 1995) scheint dieses Protein auch wichtige Funktionen bezüglich der interzellulären Virusausbreitung auszuüben. Während die CI-Proteine zu Beginn einer Infektion in der Nähe von Plasmodesmen lokalisiert sind (Carrington *et al.*, 1996), konnten die durch eine langsamere proteolytische Prozessierung entstehenden CI/6K2-Polyproteine, gebunden an zellulären Membranen entdeckt werden (Merits *et al.*, 2002). Durch

Aggregation vieler CI-Proteine werden die für Potyviren typischen, und im Cytoplasma lokalisierten, Einschlusskörper, gebildet (Ward *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2001).

6K2:

Rajamäki und Valkonen (1999) und Spetz und Valkonen (2004) konnten eine Beteiligung dieses Proteins sowohl an einer intra- als auch einer interzellulären Ausbreitung von Potyviren zeigen. Darüber hinaus werden durch 6K2 Proteine Replikationskomplexe an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums gebunden (Schaad *et al.*, 1997). Außerdem konnten Spetz und Valkonen (2004) für dieses Protein zusätzlich einen wirtspflanzenspezifischen Einfluss bezüglich der Symptomausprägung infizierter Pflanzen nachweisen.

NIa:

Neben einem N-terminalen VPg-Bereich ist die Proteinasedomäne (NIa-Pro) am C-terminalen Ende lokalisiert. Mit Ausnahme der Schnittstellen des P1 und der HC-Pro werden durch das NIa alle übrigen Spaltungen des potyviralen Polyproteins prozessiert (Carrington *et al.*, 1988; Garcia *et al.*, 1990), wobei die NIa-Pro-Aktivität sowohl von den proteolytischen Erkennungssequenzen als auch den sie flankierenden Sequenzabschnitten beeinflusst wird (Riechmann *et al.*, 1992; Schaad *et al.*, 1996). Dadurch werden die optimalen Erkennungssequenzen zwischen 6K1/CI, 6K2/VPg, NIa-Pro/NIb und NIb/CP besonders schnell prozessiert (Merits *et al.*, 2002).

Eine RNA-Bindungsaktivität konnte diesem Protein ebenfalls nachgewiesen werden (Merits *et al.*, 1998), sowie im Falle des *Pepper vein banding virus* (PVBV) eine unspezifische DNase Aktivität (Anindya & Savithri, 2004). Die VPg-Domäne beeinflusst wesentlich die Virusreplikation, und bindet kovalent unter Beteiligung eines Tyrosin-Restes an den Phosphatrest des terminalen Adenosins der viralen RNA (Riechmann *et al.*, 1992; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Bei der Virusreplikation wird dem VPg eine Primerfunktion zugeschrieben, denn es konnten sowohl

1. Einleitung

Wechselbeziehungen mit der RNA-abhängigen RNA Polymerase (RdRp) (hier das NIB) und Nukleotidbindungsaktivitäten nachgewiesen werden (Riechmann *et al.*, 1992; Puustinen und Mäkinen, 2004). Darüber hinaus konnten zum Teil sehr spezifische Wechselwirkungen zwischen potyviralen VPg und pflanzlichen Translations- und Initiationsfaktoren (eIF4E oder eIF(iso)4E) festgestellt werden (Leonard *et al.*, 2000; Schaad *et al.*, 2000; Duprat *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2004), von denen angenommen wird, dass sie die virale Replikation ermöglichen oder verbessern. Weitere Funktionen des VPg bestehen in der Wirtsspezifität und in den Interaktionen mit dem am Langstreckentransport von Potyviren beteiligten 6K2 Proteinen (Rajamäki und Valkonen, 1999; Moury *et al.*, 2004). Darüber hinaus scheint dieses Protein auch an der Schwere der Symptomausprägungen beteiligt zu sein, wie es beispielsweise beim PVA oder beim *Pea seed-borne mosaic virus* (PsBMV) festgestellt werden konnte (Rajamäki und Valkonen, 1999; Borgstrom und Johansen, 2001 wiedergegeben bei Fellers *et al.*, 2002). Das NIa des PVY wirkt bei verschiedenen Kartoffelsorten, die das dominante *Ry* Gen besitzen als Elicitor für die Auslösung der extremen Resistenz gegenüber diesem Virus, wobei die Proteasewirkung für diese Funktion nicht notwendig ist (Mestre *et al.*, 2003).

NIB:

Das NIB-Protein besitzt eine RNA Bindungsaktivität und gilt als potyvirale RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRp) (Merits *et al.*, 1998). Wie auch das NIa bildet dieses Protein Einschlusskörper, die in den Zellkernen infizierter Pflanzen und darüber hinaus auch im Cytoplasma und an den Replikationskomplexen lokalisiert vorkommen (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Zwischen dem NIB und den potyviralen NIa-Pro- oder VPg- Domänen sind Interaktionen bekannt (Guo *et al.*, 2001), ähnlich wie zwischen dem VPg (Leonard *et al.*, 2004) und pflanzlichen Poly-A-Bindungsproteinen (PABP). Fellers *et al.* (2002) wiesen für das NIB des PVY nach, dass dieses spezifisch bei einer nematodenresistenten Tabaksorte als Elicitor für die Auslösung einer hypersensitiven Reaktion in Form von Adernekrosen wirkt.

CP:

Die potyvirale RNA wird durch eine Proteinhülle, bestehend aus ca. 2000 Hüllproteineinheiten umgeben. Beim TEV konnten Pirone und Thornbury (1983) diesem Protein die besondere Bedeutung bezüglich der Blattlausübertragung nachweisen. Atreya *et al.* (1990) hoben durch eine Mutation im CP Bereich des TVMV die Blattlausübertragbarkeit auf. López-Moya *et al.* (1999) konnten im N-terminalen Bereich der Hüllproteine (CP) blattlausübertragbarer Potyviren das DAG Aminosäuremotiv identifizieren, das an einer Interaktion mit der HC-Pro beteiligt ist. Mutationen, wodurch dieses Motiv zu „DTG“ verändert wurde, führten zu einer drastischen Verminderung in der Blattlausübertragbarkeit (Atreya *et al.*, 1995). Die Interaktion zwischen dem CP und dem HC-Pro läuft über das konservierte Motiv „PTK“ der HC-Pro und dem „DAG“ Motiv des Hüllproteins ab, so dass die HC-Pro aufgrund eines weiteren konserviert vorliegenden Motivs „KITC“ als Brückenprotein zwischen spezifischen Rezeptoren der Nahrungskanäle der Blattläuse und den CP Proteinen fungiert (Blanc *et al.*, 1997; Raccach *et al.*, 2001). Inzwischen konnten Wylie *et al.* 2002 beim *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV) einem weiteren Motiv „NAG“ ebenfalls Eigenschaften bei der Blattlausübertragung zuweisen, denn eine Mutation dieses Motivs zu „NAS“ führte zu einem Verlust der Blattlausübertragung. Während die N- und C-terminalen Bereiche des Hüllproteins entscheidende Einflüsse für den interzellulären Transport eines Potyvirus besitzen, ist die Kernregion maßgeblich an der Ausbildung der Viruspartikel beteiligt (Dolja *et al.*, 1995; Varrelmann und Maiss, 2000). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass das Hüllprotein aufgrund der festgestellten CP/Nib (RdRp) Interaktionen, auch eine Regulationsfunktion auf die RNA-Amplifikation ausübt (Mahajan *et al.*, 1996).

3'-UTR:

Neben dem Einfluss dieses Sequenzbereiches auf die Virusreplikation am Beispiel des PPV (Simon-Buela *et al.*, 1997) konnten Fellers *et al.* (2002) im 3'-UTR Bereich des PVY ca. 150 Nukleotide vor dem ersten Adenosin des Poly-A-Schwanzes das Polyadenylierungssignal „AAUAAA“ identifizieren.

1. Einleitung

1.3.1.3. PVY-Stämme

Schon früh konnten vom PVY aufgrund des Wirtspflanzenspektrums (vorwiegend Kartoffeln und Tabakpflanzen) verschiedene Stämme unterschieden werden. Zu diesen gehören die Stämme PVY^O, PVY^N und PVY^C (de Bokx und Huttinga, 1981), die sich inzwischen aber auch durch serologische und molekularbiologische Nachweismethoden unterscheiden lassen. Während der weltweit vertretene O-Stamm („ordinary“-Stamm) des PVY auf *Nicotiana tabacum* -Pflanzen Mosaiksymptome verursacht, weisen Tabakpflanzen nach Inokulation mit Isolaten des PVY^N Stammes Adernekrosen auf. PVY^N scheint noch nicht weltweit verbreitet zu sein, denn sein Vorkommen wurde bislang in Europa, Nord- und Südamerika und in Teilen Afrikas nachgewiesen.

Neben diesen schon früh entdeckten Stämmen konnten in jüngerer Zeit zwei weitere Stämme (PVY^{NTN} und PVY^{N-W}) vorgefunden und näher untersucht werden: Isolate, die dem PVY^{NTN} zugeordnet wurden fielen dadurch auf, dass auf den Knollen infizierter Kartoffeln eingesunkene Ringflecken beobachtet werden konnten (Beczner *et al.*, 1984; Le Romancer *et al.*, 1994). Auch diese Isolate verursachten eine Adernekrosebildung an Tabak und wurden auch aufgrund ihres serologischen Verhaltens als Pathotyp innerhalb der PVY^N-Isolate beschrieben (van den Heuvel *et al.*, 1994; Glais *et al.*, 1996; Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998a). Das PVY^{NTN} kann inzwischen in vielen europäischen Anbaugebieten nachgewiesen werden (Weidemann und Maiss, 1996). Lindner *et al.* (2004) konnten im Rahmen ihrer Untersuchungen zum Vorkommen von PVY-Stämmen und -Stammgruppen in Deutschland durch molekulare Untersuchungen ca. 85% aller serologisch als PVY^N eingestuften Proben dem PVY^{NTN} Stamm zuordnen.

Durch Genomanalysen konnte inzwischen geklärt werden, dass es sich bei den europäischen Isolaten des PVY^{NTN} um natürlich vorkommende rekombinante Viren handelt (vergleiche Abb. 3), die aus den PVY Stämmen PVY^O und PVY^N hervorgegangen sein müssen (Glais *et al.* 1996, 1998; 2002; Boonham *et al.* 2002). Bei den europäischen PVY^{NTN} -Isolaten konnten drei Rekombinationsstellen vorgefunden werden, von denen die erste sich im C-terminalen Bereich der HC-Pro befindet. Hier findet ein Wechsel von der PVY^N in die PVY^O -ähnliche Sequenz statt, die dann wiederum im N-terminalen Bereich des NIa in die PVY^N -ähnliche Sequenz übergeht, um im C-terminalen Bereich des CP erneut in die PVY^O -ähnliche Sequenz zu wechseln

(Boonham *et al.*, 2002; Glais *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Nordamerikanischen PVY^{NTN}-Stämmen nicht um solche Kartoffelviren, die aus Rekombinationsereignissen, sondern wahrscheinlicher aufgrund von Mutationen innerhalb des PVY^N Genoms entstanden sind (Nie und Singh, 2003a). Inzwischen konnten Lorenzen *et al.* (2006) auch die ersten europäischen rekombinanten PVY^{NTN} Isolate im Westen der USA nachweisen.

Ein weiterer rekombinanter PVY Stamm wurden zuerst in Ungarn in der Kartoffelsorte „Wilga“ entdeckt. Die Isolate dieses Stammes zeichneten sich sowohl durch eine höhere Infektiosität, als auch durch ihr verstärktes Auftreten in zahlreichen Kartoffelsorten aus (Chrzanowska, 1991; 1994). Im Gegensatz zu PVY^{NTN} konnten bis jetzt noch keine Ringnekrosen an den Knollen PVY^N-W infizierter Kartoffelpflanzen festgestellt werden (Piche *et al.* 2004). Diese Isolate verursachen zwar einerseits Adernekrosen auf Tabak, können andererseits jedoch nicht mit PVY^N- sondern mit PVY^O-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Chrzanowska, 1994).

Durch phylogenetische Analysen konnte inzwischen auch die rekombinante Genomstruktur der PVY^N-W Virusisolate, die auch in Abb. 3 zu sehen ist, aufgedeckt werden (Glais *et al.*, 1998, 2002). Die PVY^N-W -Isolate weisen wie die europäischen PVY^{NTN} Isolate einen Rekombinationsbereich im C-terminalen Bereich der HC-Pro auf, bei dem ein Wechsel von PVY^N zu PVY^O -ähnlicher Sequenz festgestellt werden konnte (Glais *et al.* 2002). Weiterhin konnte auf molekularer Ebene zwischen verschiedenen Isolaten, die dem PVY^N-W angehören, eine hohe Variabilität innerhalb ihres 5'-UTR-P1 Bereiches festgestellt werden, so dass die Isolate innerhalb dieses Stammes in drei Gruppen unterteilt werden können (Chachulska *et al.*, 1997; Glais *et al.*, 1998, 2002). Zur ersten Gruppe zählen all die Isolate, die eine PVY^N ähnliche Sequenz innerhalb ihres 5'-UTR-P1 Bereiches aufweisen. Die Vertreter der zweiten Gruppe zeichnen sich durch einen Wechsel der Sequenz von PVY^O zu PVY^N-ähnlich aus, während in die dritte Gruppe alle Isolate eingeordnet werden, deren 5'-UTR-P1 Sequenz Ähnlichkeiten mit denen der PVY^O Isolate besitzen (Chachulska *et al.*, 1997; Glais *et al.*, 1998, 2002).

Begünstigt durch sehr schwach ausgeprägte (Chrzanowska *et al.*, 1991) bis kaum zu erkennende Mosaiksymptome auf den Blättern PVY^N-W infizierter Kartoffeln (Kerlan

1. Einleitung

et al., 1999; Glais *et al.* 2005) scheint sich dieser Stamm inzwischen stark in Europa ausgebreitet zu haben. Chrzanowska *et al.* (1998) konnten feststellen, dass in Polen ca. 90% aller von ihnen untersuchten PVY Infektionen diesem Stamm zugeordnet werden mussten. Die zunehmende Ausbreitung des PVY^N-W konnte auch in Frankreich (Kerlan *et al.*, 1999) und Spanien (Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998a) festgestellt werden. Ebenfalls waren in Deutschland bei einer mehrjährigen Untersuchung von Pflanzkartoffeln ca. 2/3 aller serologisch als PVY^O eingestuften Proben in der Lage, Adernekrosen an Tabakpflanzen hervorzurufen, was für den PVY^N-W Stamm spricht (Lindner *et al.*, 2004). Als Alternative zur Identifizierung dieser Isolate mit Hilfe eines Bioassays (bestehend aus Testpflanzendiagnose und serologischer Untersuchung) konnten Glais *et al.* (2005) inzwischen eine PCR basierte molekularbiologische Diagnosemethode entwickeln, bei der sie unter Ausnutzung des in der HC-Pro-Domäne liegenden Rekombinationsbereiches bekannter PVY^N-W Isolate diese über ein ca. 4000 bp langes Fragment spezifisch identifizieren können.

In einigen Bereichen der USA und in Kanada wurden inzwischen Isolate mit der Bezeichnung PVY^{N:O} beschrieben (Nie und Singh, 2003b; Piche *et al.*, 2004), die sehr große Ähnlichkeit mit dem europäischen PVY^N-W Stamm besitzen. Diese Isolate konnten mit PVY^O-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Crosslin *et al.*, 2005; Glais *et al.*, 1998; Nie *et al.*, 2004 und Piche *et al.*, 2004). Durch Sequenzanalysen ist inzwischen bekannt, dass diese im Bereich der HC-Pro einen Rekombinationsbereich besitzen, bei dem ein Sequenzwechsel von PVY^N zu PVY^O stattfindet (Glais *et al.*, 1998; 2002; Nie und Singh, 2003b). Einige dieser Isolate können ebenfalls auf den Knollen Ringnekrosen verursachen (Crosslin *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2004), und Lorenzen *et al.* (2006) konnten inzwischen die erste vollständige Sequenz eines dieser Knollennekroseverursachenden PVY Isolate ermitteln.

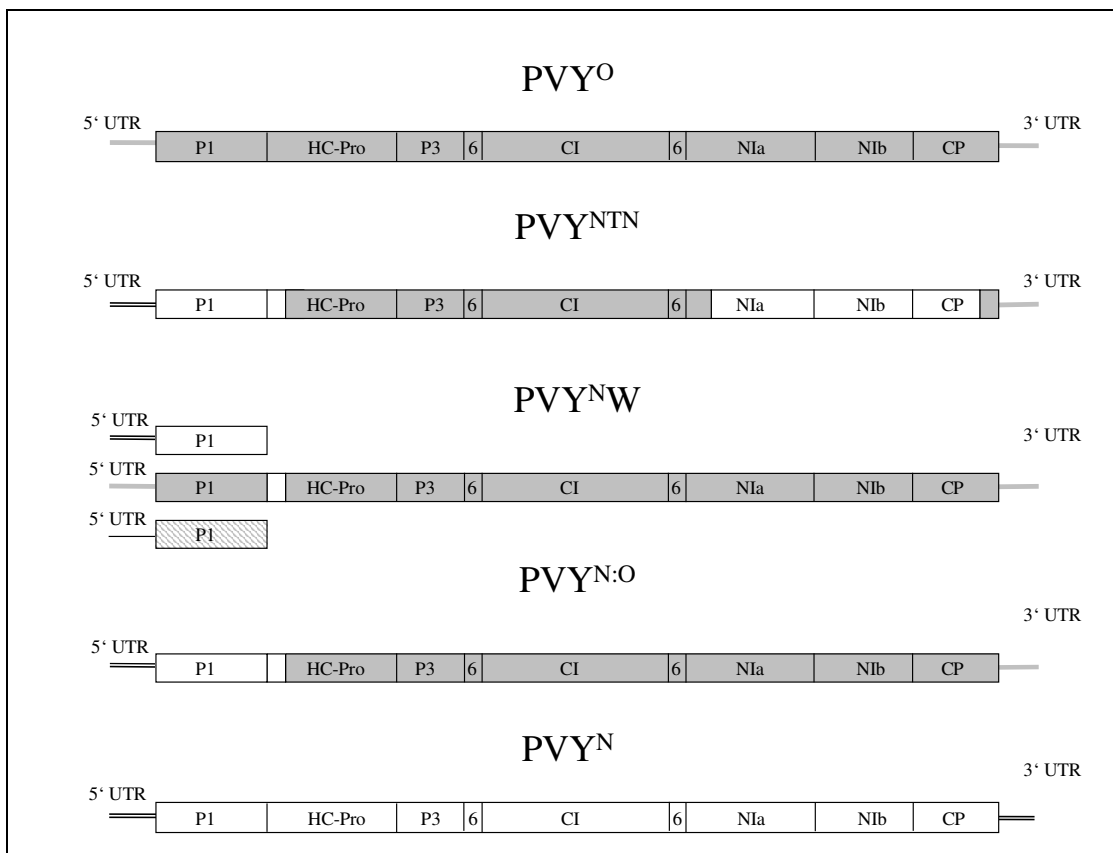


Abb. 3: Schematische Darstellung der Genome verschiedener PVY-Stämme (PVY^O, PVY^{NTN}, PVY^{N-W}, PVY^{N:O} und PVY^N)

Grau gehaltene Genomabschnitte stehen für PVY^O ähnliche Sequenzen, während weiße Bereiche PVY^N ähnliche Sequenzen symbolisieren. Die Stämme PVY^{NTN}, PVY^{N:O} und PVY^{N-W} beinhalten sowohl PVY^O als auch PVY^N ähnliche Sequenzbereiche.

Bei den PVY^{N-W} Isolaten ist eine große Variabilität im 5'-UTR und P1 Bereich bekannt, so dass diese in drei Untergruppen eingeteilt werden können: Während die erste Gruppe in diesem Bereich PVY^O ähnliche Sequenzen aufweist, zeigen die Sequenzen der Isolate der zweiten Gruppe die größte Ähnlichkeit mit denen des PVY^N, die der dritten Gruppe mit Sequenzen von PVY^O als auch von PVY^N (gestrichelter Bereich).

Grafik verändert nach Glais *et al.* (2002) nach Angaben von Glais *et al.* (1998, 2005), Chachulska *et al.* (1997) und Boonham *et al.* (2002), Nie und Singh (2003a,b); Nie *et al.* (2004) und Piche (2004)

1. Einleitung

1.3.2. *Potato virus X (PVX)*

PVX kann in einigen Kartoffelsorten Ertragsausfälle zwischen 10% und 20% verursachen (Koenig und Lesemann, 1989). An den befallenen Kartoffelpflanzen lassen sich zum Teil leichte mosaikartige Scheckungen der Blätter im unteren Staudenbereich erkennen, wobei die Symptome oft jedoch so schwach ausgebildet sind, dass kranke Pflanzen im Bestand kaum auffallen.

Neben dem Verursachen von Schäden an Kartoffeln kann PVX aber auch andere Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) wie Tomate (*Solanum lycopersicon*) und Tabak (*N. tabacum*) infizieren. Für die Verbreitung des PVX wurden verschiedene Vektoren beschrieben. Neben einigen Grashüpferarten (*Melanoplus differentialis* und *Tettigonia viridissima*) wurden von Campbell (1979) auch der Pilz *Synchytrium endobioticum* als Überträger angesehen. Dieser Pilz gilt in jüngerer Zeit nicht mehr als bedeutender Überträger des PVX. Die mechanische Übertragung während der Durchführung von Feldarbeiten mit Hilfe landwirtschaftlicher Maschinen wird inzwischen als Hauptfaktor angesehen, wodurch dieses Virus innerhalb der Bestände großflächig ausgebreitet werden kann (Adams, 1991; Campbell, 1996; Koenig und Lesemann, 1989).

Koenig und Lesemann (1989) erwähnen, dass PVX erstmals von Smith (1932) beschrieben wurde. PVX ist die Typspezies des Genus *Potexvirus*, einer Gruppe von positiv orientierten plussträngigen RNA Viren (Huisman *et al.*, 1988; Bercks, 1970; Milne, 1985; van Regenmortel *et al.*, 2000). Dieses Genus wurde bis jetzt noch keiner Virusfamilie zugeordnet (van Regenmortel *et al.*, 2000). Neben der Genomorganisation sind die Expression und die grundsätzlichen Funktionen einzelner Proteine bei Koenig und Lesemann (1998) und Hull (2002) beschrieben.

1.3.2.1. Organisation des PVX-Genoms

Begrenzt durch eine Cap-Struktur am 5'-Ende und einen Poly-A-Schwanz am 3'-UTR-Bereich besitzt das virale 6435 b umfassende positiv-einzelsträngige RNA Genom insgesamt fünf offene Leseraster (ORF 1-5), die für virale Proteine mit unterschiedlichen Funktionen kodieren (siehe Abb. 4).

Am 3'-Ende des positiv-sinnigen RNA Stranges befinden sich die Promotoren für die Minusstrang Synthese, während am 3'-Ende der Minusstrang RNA eine Polymerasebindungsstelle für die Synthese der positiv-sinnigen RNA vorhanden ist. Es wurde berichtet, dass sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende des PVX Genoms mit Wirtsproteinen interagieren kann, und dass diese Bindungen für die Replikation notwendig sind (Sriskanda *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002). Chen *et al.* (2005) konnten inzwischen zeigen, dass das im 3'-Ende lokalisierte AAUAAA Motiv beim *Bamboo mosaic virus* (BaMV, Genus *Potexvirus*) sowohl an der RNA-Minusstrangsynthese, wie auch an der Polyadenylierung der sinnsträngigen RNA beteiligt ist.

1. Einleitung

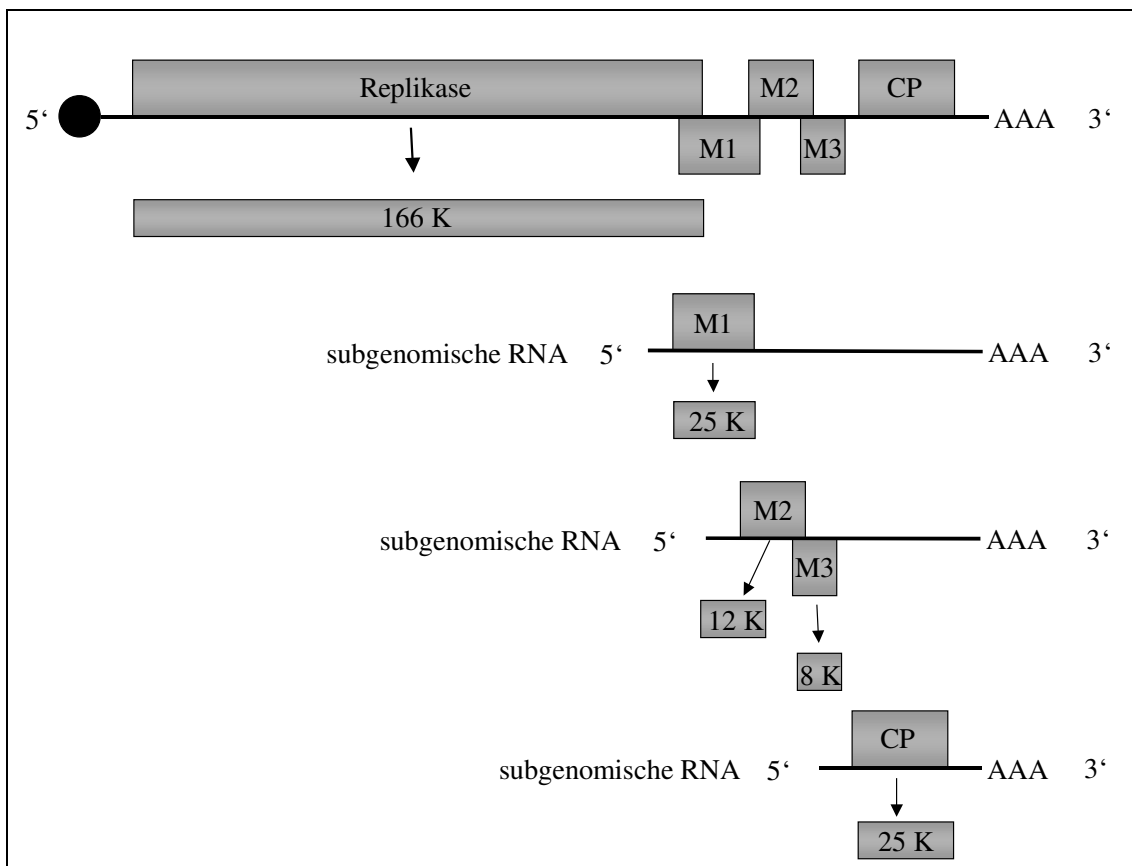


Abb. 4: Schematische Darstellung der Genomstruktur und -expression des PVX

Die großen Rechtecke stellen die offenen Leserahmen dar. Die viralen Proteine werden durch die schmalere Rechtecke symbolisiert. Die schwarze Kugel am 5' Ende der genomischen RNA symbolisiert das CAP. Die RNA Moleküle werden als schwarze Linien dargestellt.

Für den „Triple gene block“ (M1-M3) und das CP erfolgt die Synthese von subgenomischen RNAs.

Legende: M1 = Movement Protein 1; M2 = Movement Protein 2; M3 = Movement Protein 3; CP = Hüllprotein AAA = Poly-A-Schwanz

(Grafik verändert nach Angaben von Koenig und Lesemann (1998) und Hull (2002))

1.3.2.2. Beschreibung der potexvirealen ORFs und ihre Funktionen

ORF1:

Der erste offene Leserahmen kodiert für ein aus 1456 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 166 kDa. Dieses als 166 K bezeichnete Protein ist als Komponente eines Polymerasekomplexes (Replikase) an der Replikation der viralen RNA beteiligt und wird direkt von der genomischen RNA translatiert (vergleiche Abb. 4). Die Replikase besitzt drei Domänen (Koonin und Dolja, 1993). Diese sind die am N-terminalen Ende lokalisierte methyltransferaseähnliche Domäne (Rozanov *et al.*, 1992), die zentral gelegene NTP bindende/Helikasedomäne (Davenport und Baulcombe, 1997) und die in der C-terminalen Region befindliche Domäne der RdRp (Longstaff *et al.*, 1993). Wie auch von anderen viralen RdRp bekannt, ist auch die PVX-Replikase mit Membranen assoziiert (Doronin und Hemenway, 1996). Die Replikase ist das einzige Protein des PVX, das sowohl zusammen mit wirtspflanzeigenen Proteinen an der RNA-Minusstrangsynthese, als auch an der Erzeugung von sinnsträngig orientierter genomischer und subgenomischer RNA beteiligt ist (Longstaff *et al.*, 1993).

TGB:

Die nächsten drei sich teilweise überlappenden ORFs werden als „Triple gene block“ (TGB), und entsprechend ihrer Reihenfolge innerhalb des TGBs als TGB1 bis TGB3 bezeichnet. Dementsprechend werden auch die durch diese ORFs kodierten Proteine TGBp1 bis TGBp3 (Beck *et al.* 1991; Verchot *et al.* 1998; Solovyev *et al.* 1996) oder aufgrund ihrer molekularen Massen als 25 K, 12 K und 8 K benannt (Huisman *et al.*, 1988). Die Organisationsstruktur des TGB kommt sowohl bei stäbchenförmigen Viren der Genera *Pomovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus* und *Benyvirus*, wie auch bei fadenförmigen Viren der Genera *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Allexivirus*, und *Foveavirus* vor (Beck *et al.*, 1991, Gilmer *et al.*, 1992; Herzog *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1999; Petty und Jackson, 1990; Morozov und Solovyev, 2003).

1. Einleitung

Da in der vorliegenden Arbeit lediglich mit fadenförmigen, TGB besitzenden Viren der Genera *Potexvirus* und *Carlavirus* gearbeitet wurde, sollen an dieser Stelle nur die Funktionen des potexähnlichen TGB beschrieben werden.

Während das TGBp1 (25K) Protein durch seine eigene monocistronische subgenomische RNA kodiert wird, kodiert für die Proteine des TGBp2 und des TGBp3 eine kürzere, bicistronische sgRNA (Morozov *et al.*, 1991 und Verchot *et al.*; 1998). Dieses ist auch in der Abb. 4 wiedergegeben.

Von den drei Proteinen des PVX-TGBs (25K, 12K und 8K) ist bekannt, dass sie maßgeblich an der interzellulären Ausbreitung des Virus in infizierten Pflanzen beteiligt sind (Carrington *et al.*, 1996; Deom *et al.*, 1992; Lucas and Wolff, 1999). Trotz zahlreicher Untersuchungen sind noch nicht alle ihrer Funktionen aufgeklärt worden, jedoch gelten spezifische Interaktionen zwischen den drei TGB-Proteinen als sehr wahrscheinlich und als grundlegende Voraussetzung für einen effizienten Zell-zu-Zell-Transport (Erhardt *et al.*, 1999a und b; Lauber *et al.*, 1998 und Solovyev *et al.*, 1999). Beck *et al.* (1991) deckten anhand von künstlich herbeigeführten Mutationen an einem Vollängenklon des *White clover mosaic virus* (WCIMV) erste generelle Funktionen bezüglich der Notwendigkeit der TGB-kodierten Proteine an der interzellulären Ausbreitung von Potexviren auf. Im Gegensatz zu dem hier nicht näher behandelten hordei-ähnlichen Transportsystem, bei dem nur die drei Proteine des TGB für die Ausbreitung von Zelle zu Zelle benötigt werden, zeichnen sich die Viren der potex-ähnlichen Gruppe dadurch aus, dass bei ihnen zusätzlich auch das Hüllprotein (CP) für den interzellulären Transport notwendig ist (Chapman *et al.*, 1992; Fedorkin *et al.*, 2001; Forster *et al.*, 1992 und Krishnamurthy *et al.*, 2002). Die Notwendigkeit dieser vier Proteine für die Ausbreitung konnte bereits beim PVX bestätigt werden (Morozov *et al.*, 1989 und Hefferon *et al.*, 1997).

Im Folgenden werden nun die einzelnen Funktionen der TGB-Proteine der potexähnlichen Gruppe näher beschrieben.

TGBp1:

Das TGBp1 Protein ist ein multifunktionales Protein und besitzt demnach eine Reihe von Aufgaben (Verchot-Lubicz, 2005).

Davies *et al.* (1993) und Rouleau *et al.* (1994) konnten sowohl bei PVX wie auch beim *Foxtail mosaic virus* (FoMV) mit Hilfe von spezifischen Antikörpern feststellen, dass deren TGBp1-Proteine im Cytoplasma befallener Pflanzen in Form von Oligomeren und darüber hinaus in solch großen Mengen vorzufinden waren, dass diese Proteine auch als Einschlusskörper beobachtet werden konnten. Hsu *et al.* (2004) zeigten, dass von den TGBp1-Einschlusskörpern des *Bamboo mosaic virus* (BaMV) ständig TGBp1 Proteine abgegeben werden und dass dieser Prozess in Anwesenheit von viraler RNA und von CP-Proteinen verstärkt wird. Deshalb gehen Hsu *et al.* (2004) davon aus, dass diese Einschlusskörper nicht nur Lagerstätten an TGBp1 Proteinen darstellen, sondern dass an diesen Gebilden auch die virale RNA für ihren Transport vorbereitet wird. Auch Angell *et al.* (1996), Lough *et al.* (1998) und Yang *et al.* (2000) bemerkten das häufige Vorkommen der TGBp1 Proteine des PVX und des WCIMV im Cytoplasma infizierter Pflanzen, und stellten dabei die Fähigkeit dieser Proteine zur Vergrößerung des Größenausschlusslimits (SEL: size exclusion limit) der Plasmodesmen fest. Durch Mikroinjektionsversuche konnten Lough *et al.* (1998) die Ausbreitung fluoreszenzmarkierter TGBp1 Proteine des WCIMV über die Plasmodesmen von Zelle zu Zelle verfolgen. Durch eine transiente Expression der ORFs des PVX-TGBs und des PVX-Hüllproteins in verschiedenen Kombinationen konnten Yang *et al.* (2000) nachweisen, dass die interzelluläre Ausbreitung des PVX-TGBp1 durch Interaktionen dieses Proteins mit den übrigen viralen TGB Proteinen reguliert wird.

Im Gegensatz zu den Proteinen des TGB2 und TGB3, die kleine hydrophobe Proteine darstellen, gehen Morozov *et al.* (1989, 1997) sowie Morozov und Solovyev (2003) davon aus, dass es sich phylogenetisch betrachtet, beim TGBp1 um ein divergentes Duplikat einer an der viralen Replikation verwandten NTPase/Helikase handelt. Mehrere konservierte Motive konnten bei verschiedenen TGB1 Proteinen unterschiedlicher Viren identifiziert werden, die als charakteristisch für Proteine mit NTP-Bindungs- und Helikasefunktionen gelten (Gorbalenya & Koonin 1989, 1993; Gorbalenya *et al.*, 1989b und Skryabin *et al.*, 1988). Neben diesen beiden Funktionen

1. Einleitung

konnten darüber hinaus auch RNA-Bindungsaktivitäten festgestellt werden (Bleykasten *et al.*, 1996; Cowan *et al.*, 2002; Donald *et al.*, 1997, Erhardt *et al.*, 2000; Kalinina *et al.*, 1996, 2001, 2002; Lough *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1999; Rouleau *et al.*, 1994 und Wung *et al.*, 1999). Insgesamt konnten bei dem TGBp1 der Potexviren sieben NTPase/Helikase Motive festgestellt werden, aufgrund der die Helikase der Helikasen-Überfamilie I zugeordnet wurde (Morozov *et al.*, 1999). Die beiden Helikasemotive „GKS“ und „DEY“ stellen dabei NTPase-Motive dar, die NTP- und Mg^{2+} -Bindungen hervorrufen, die als Voraussetzungen für die RNA-Helikaseaktivitäten gelten (Morozov *et al.*, 1999). Eine Eliminierung dieser Motive hatte sowohl einen Verlust der Virusausbreitung, wie auch eine Einbuße der Vergrößerung der Permeabilität der Plasmodesmen zur Folge (Angell *et al.*, 1996; Lough *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1999). Mutationen des „DEY“ Motivs bewirkten ebenfalls eine Beeinträchtigung der subzellulären Ausbreitung (Howard *et al.*, 2004).

Kiselyova *et al.* (2003) und Rodionova *et al.* (2003) berichten, dass bei einer niedrigen Konzentration an PVX-TGBp1 Proteinen diese terminal an die das Viruspartikels binden, während bei steigender TGBp1 Konzentration die Helix des Partikels zunehmend instabiler wird.

Zitiert in Verchot-Lubicz (2005) nehmen Fairman *et al.* (2004), Linder *et al.* (2003) und Rout *et al.* (2000) an, dass die TGBp1 Proteine die Funktionen einer eukaryotischen RNA-Helikase nachahmen, von denen bekannt ist, dass sie Ribonukleoproteinkomplexe entwinden, die Translation stimulieren und die Ausbreitung im Cytoplasma beeinflussen können. Obwohl noch nicht alle biologischen Funktionen der TGBp1-NTPase und -Helikase vollständig geklärt werden konnten, wird davon ausgegangen, dass die RNA-Bindungsaktivitäten eine Notwendigkeit für die Ausbildung von Komplexen, bestehend aus diesen Proteinen und der viralen RNA, oder von Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs), bestehend aus viraler RNA, Hüllproteinen und TGBp1-Proteinen, ist, wovon letztere die Ausbreitungsform des Virusgenoms repräsentiert (Morozov und Solovyev, 2003 und Oparka, 2004).

Die interzelluläre Ausbreitung des TGBp1 weist pflanzenspezifische Unterschiede auf. So konnten Howard *et al.* (2004) mit Hilfe GFP-markierter PVX-TGBp1-Proteine (GFP/TGBp1) zwar die interzelluläre Ausbreitung dieser Proteine in verschiedenen

Wirtspflanzen (*N. tabacum*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, und *S. lycopersicon*) beobachten, aber nach einer Deletion der ATPase Motive konnte im Gegensatz zu den übrigen Pflanzen nur noch in *N. benthamiana* -Pflanzen eine Ausbreitung festgestellt werden (Howard *et al.*, 2004).

Voinnet *et al.* (2000) und Bayne *et al.* (2005) berichten, dass PVX-TGBp1 in *N. benthamiana* zusätzlich die Funktion als "Suppressor des Gene silencing" ausübt.

Die PVX-TGBp1 Proteine haben zusätzlich eine Wirkung auf die Morphologie infizierter Tabakpflanzen. Denn Kobayashi *et al.* (2004) stellten bei ihren PVX-TGBp1-transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* Xanthi D8 NN) fest, dass diese im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen eine deutlich reduzierte Photosyntheserate, einen geringeren Stärkeaufbau in den Blättern und Wurzeln und eine erhöhte Nitratanreicherungen in den Blättern aufwiesen. Weiterhin konnten sie bei ihren transgenen Tabakpflanzen durch mikroskopische Untersuchungen Veränderungen in der Chloroplastenstruktur erkennen.

TGBp2 und TGBp3:

Für die potexviralen TGB-Proteine TGBp2 und TGBp3 stehen im Vergleich zum TGBp1 weit weniger Informationen über ihre möglichen Funktionen zur Verfügung. Wie bereits erwähnt, kodieren subgenomische RNAs für diese beiden Proteine, die wie die TGBp1 Proteine maßgeblich an der viralen Ausbreitung beteiligt sind (Angell *et al.*, 1996; Lough *et al.*, 2000; Solovyev *et al.*, 2000). Ein auf Aminosäureebene durchgeführter Sequenzvergleich von TGBp2-Proteinen verschiedener Viren offenbarte nicht nur die sehr hohe Ähnlichkeit zwischen den Proteinen untereinander, sondern verdeutlichte zudem, dass eine zentral lokalisierte konservierte hydrophobe Domäne von zwei stark hydrophilen Transmembransegmenten flankiert wird (Morozov *et al.*, 1987; 1989 und Solovyev *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu besitzen die TGBp3-Proteine der Viren der Genera *Potex*-, *Carla*-, *Allexi*- und *Foveavirus* neben einem N-terminal gelegenen hydrophoben Transmembransegment nur einen konservierten hydrophilen C-terminalen Bereich (Morozov *et al.*, 1991).

1. Einleitung

In infizierten Zellen sind die TGBp2 und TGBp3 Proteine am Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert (Krishnamurthy *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2003) und es konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, dass die TGBp2- und TGBp3-Proteine an Membran- und Zellwandfraktionen vorkommen (Hefferon *et al.*, 1997b; Morozov *et al.*, 1987, 1989, 1990a, 1991 und Yang *et al.*, 2000). Mutationen, die diese Verknüpfung mit dem ER zerstörten, führten zu einem Verlust der Virusausbreitung wodurch die Bedeutung dieser Assoziation mit dem ER deutlich wird (Krishnamurthy *et al.*, 2003 und Mitra *et al.*, 2003).

Viele Funktionen des TGBp2 und des TGBp3 bezüglich der Virusausbreitung konnten noch nicht vollständig geklärt werden. Im Gegensatz zu Lough *et al.* (1998) die weder bei den TGBp2- noch bei den TGBp3-Proteinen des WCIMV einen direkten Einfluss bezüglich der Veränderung des Größenausschlusslimits der Plasmodesmen feststellen konnten, konnten Tamai und Meskhi (2001) solche Permeabilitätsänderungen der Plasmodesmen durch die PVX-TGBp2 Proteine beobachten.

Fridborg *et al.* (2003) konnten drei pflanzliche Proteine identifizieren, die sowohl mit dem PVX-TGBp2, als auch mit der beta-1,3-Glucanase, einem kalloseabbauenden Enzym interagierten. Diese pflanzlichen Faktoren stellen somit eine direkte Verbindung zwischen einem viralen Ausbreitungsprotein und einem pflanzlichen Faktor dar, die als Hauptregulatoren der Plasmodesmen-Permeabilitäten gelten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PVX-TGBp2 und PVX-TGBp3-Proteine aufgrund von Wechselbeziehungen Einfluss auf die Funktionen des TGBp1 nehmen können (Hefferon *et al.*, 1997; Morozov *et al.*, 1990a, 1991 und Yang *et al.*, 2000).

Aber auch die subzelluläre Lokalisation des TGBp2 wird wesentlich durch die des TGBp3 bestimmt (Solovyev *et al.*, 2000; Lough *et al.*, 2000; Tamai und Meshi, 2001). Denn bei alleiniger Expression des TGB2 lagen diese Proteine an den Elementen des Endomembransystems (bestehend aus Endoplasmatischen Retikulum, Zellkern und Golgiapparat) assoziiert vor.

Ergänzend konnten Ju *et al.* (2005) anhand von GFP-markierten PVX-TGBp2 Proteinen nachweisen, dass diese in benachbarten Tabakzellen peripher gelegene Zwillingsstrukturen ausbilden, indem sich jeweils zwei Gebilde an den

gegenüberliegenden Seiten einer gemeinsamen Zellwand zweier benachbarter Zellen befanden. Weiterhin stellten sie fest, dass zu Beginn einer PVX-Infektion die PVX-TGBp2 Proteine zunächst verstärkt am ER und an Vesikeln (die vom ER, nicht aber vom Golgiapparat abstammten) vorzufinden waren. Erst im weiteren Verlauf der Infektion fand eine zunehmende Verlagerung des GFP-markierten PVX-TGBp2 ins Cytosol und auch an die Zellkernregion statt (Ju *et al.*, 2005).

Bereits 1997 konnten Hefferon *et al.* das verstärkte Vorkommen der PVX-TGBp3-Proteine in den Bereichen der Zellwände beobachten, das mit dem C-terminalen hydrophilen Bereich dieses Proteins in Zusammenhang steht. Denn PVX-TGBp3 Mutanten, die Deletionen in diesem hydrophilen Bereich aufwiesen, waren nicht in diesen Bereichen zu finden und verursachten eine Verminderung des interzellulären wie auch des Langstreckentransports (Krishnamurthy *et al.*, 2002 und Schepetilnikov *et al.*, 2005).

Ähnlich wie beim PVX-TGBp1 konnte auch bei den Proteinen PVX-TGBp2 und PVX-TGBp3 ein pflanzenspezifischer Einfluss bezüglich ihrer interzellulären Ausbreitung festgestellt werden. Während in *N. benthamiana* Pflanzen die Proteine TGBp1-3 und CP unabhängig voneinander von Zelle zu Zelle transportiert wurden, konnte eine solche interzelluläre Ausbreitung in *N. tabacum*, *N. clevelandii* und *S. lycopersicon* nur bei den TGBp1-Proteinen festgestellt werden (Howard *et al.*, 2004; Krishnamurthy *et al.*, 2002, 2003; Mitra *et al.*, 2003).

CP:

Der am 3'-Ende des Virusgenoms gelegene ORF5 kodiert für das CP, das sich aus 238 Aminosäuren zusammensetzt und ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa besitzt. Wie aus Abb. 4 zu entnehmen ist, kodiert eine subgenomische RNA für das CP (Hefferon *et al.*, 1997). Die Hüllproteine sind für die Enkapsidierung des viralen Genoms notwendig (Cruz *et al.*, 1996), und durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich des CP auf der Oberfläche eines Viruspartikels lokalisiert ist (Baratova *et al.*, 1992 und Santa Cruz *et al.*, 1996).

1. Einleitung

Kwon *et al.* (2005) stellten fest, dass eine bestimmte „stem-loop“ Struktur im 5'-UTR Bereich des Virusgenoms für die Bindung der Hüllproteine an die virale RNA und damit auch für die Viruspartikelformung notwendig ist. Neben der Aufgabe der Enkapsidierung der viralen RNA spielt das PVX-CP auch eine entscheidende Rolle bei der Virusausbreitung innerhalb der Wirtspflanze (Baulcombe *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 1992; Santa Cruz *et al.*, 1998). In PVX infizierten Tabakpflanzen konnten Oparka *et al.* (1996) die Hüllproteine in unmittelbarer Nähe der Plasmodesmen lokalisiert vorfinden. Durch jüngere Untersuchungen geht man davon aus, dass das CP zusammen mit der viralen RNA und mehreren TGBp1 Proteinen einen sogenannten Riboproteinkomplex (RP) ausbildet, durch den die interzelluläre systemische Ausbreitung des Virus durch die Plasmodesmen stattfinden kann (Lough *et al.*, 1998, 2000; 2001 und Santa Cruz *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang konnten Howard *et al.* (2004) einen pflanzenspezifischen Einfluss bezüglich der interzellulären Ausbreitungsweise des PVX-CP feststellen. Denn im Gegensatz zu anderen Tabakpflanzen konnten sie nur in *N. benthamiana* eine Ausbreitung dieses Proteins von Zelle zu Zelle beobachten.

Darüber hinaus konnte dem PVX-CP inzwischen auch *in vitro* sowohl eine ATP-Bindungs- und eine ATPase-Aktivität nachgewiesen werden (Rakitina *et al.*, 2005).

1.3.2.3. Modelle der interzellulären potexviralen Ausbreitung

Während in einem älteren Modell noch davon ausgegangen wird, dass ganze Viruspartikel von Zelle zu Zelle transportiert werden (Santa Cruz, 1998), gehen Lough *et al.*, 1998; 2000; Yang *et al.*, 2000 und Krisnamurthy *et al.*, 2002, 2003 davon aus, dass ein RP durch die Plasmodesmen transportiert wird, während die Proteine TGBp2 und TGBp3 an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums verankert vorliegen. Im neuesten Modell der interzellulären Ausbreitung unterteilten Verchot-Lubicz (2005) diesen Prozess in drei Abschnitte: eine frühe, mittlere und späte Phase.

Frühe Phase:

Während des ersten Abschnittes breiten sich die TGBp1 Proteine von Zelle zu Zelle aus. Dabei lagern sie sich auch in den Plasmodesmen an, wodurch deren SEL vergrößert wird. Einige TGBp1 Proteine interagieren mit TGBp2- und TGBp3-Proteinen und dirigieren diese getrennt voneinander durch die Plasmodesmen. Freie TGBp1 Proteine breiten sich vor der eigentlichen Infektionsfront aus, um den pflanzlichen RNA Silencing Mechanismus in den benachbarten Zellen zu unterdrücken. Auch Komplexe, bestehend aus TGBp1 und TGBp2 oder TGBp1 und TGBp3, gelangen verstärkt in die benachbarten Zellen, um dort ebenfalls das RNA Silencing- und weitere pflanzliche Verteidigungsmechanismen für die bevorstehende Virusinfektion zu unterdrücken. Am Ende der frühen Phase binden in den benachbarten Zellen die TGBp2- und TGBp3-Proteine nahe den Plasmodesmen an das Endoplasmatische Retikulum, und einige TGBp1 Proteine beginnen, sich an diesen anzulagern.

Mittlere Phase:

Während der mittleren Phase wird das Virus durch die Plasmodesmen in die benachbarten Zellen geschleust. Dabei ist es noch nicht vollständig geklärt, ob bei diesem Vorgang Viruspartikel oder eher Ribonukleoproteinkomplexe in die benachbarten Zellen transportiert werden. Das TGBp1 könnte durch die Plasmodesmen einerseits an den Viruspartikeln und andererseits aber auch an den Ribonukleoproteinkomplexen (bestehend aus viraler RNA, TGBp1 und CP) gebunden transportiert werden.

1. Einleitung

Späte Phase:

In diesem Stadium liegen die TGBp1-PVX oder TGBp1-CP-RNA Einheiten in den benachbarten Zellen am ER angeheftet vor. Diese Bindung erfolgt an den Ankerkomplexen, die durch TGBp1-Oligomere, TGBp2 und TGBp3 Proteine aufgebaut werden. Frei werdende TGBp1 Proteine können entweder die PVX-Viruspartikel oder den Ribonukleoproteinkomplex entwinden und bereiten so die RNA für die Translation vor. Von der sich der Translation anschließenden Replikation ist bekannt, dass sie an den Membranen stattfindet, so dass diese auch an den Ankerkomplexen am ER abläuft.

Am Ende dieser Phase lösen freie Hüllproteine die TGBp1-Proteine von den Plasmodesmen ab, so dass diese wieder ihren ursprünglichen Zustand annehmen. Die frei gewordenen TGBp1-Proteine können für weitere RNA-Transportereignisse verwendet werden, oder die Ausbreitung der viralen Infektion aufgrund der Unterdrückung des RNA Silencing begünstigen.

1.3.3. *Potato virus M (PVM) und Potato virus S (PVS)*

Sowohl das Kartoffelvirus M (*Potato virus M*, PVM), als auch das Kartoffelvirus S (*Potato virus S*, PVS), das in dieser vorliegenden Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielt, gehören dem Genus *Carlavirus* an (Zavriev *et al.*, 1991 und Foster, 1992).

PVM-Infektionen können bei einigen anfälligen Kartoffelsorten zu Ertragsverlusten von 20% bis 50% führen (Stevenson *et al.* 2001). Dabei bilden infizierte Pflanzen oft als charakteristisches Symptom ein sogenanntes Rollmosaik aus, bei dem die Blätter im oberen Pflanzenbereich Einrollerscheinungen zeigen. Darüber hinaus weisen oftmals die Blätter befallener Pflanzen eine Scheckung oder ein Mosaik auf (Stevenson *et al.* 2001 und Heitefuss *et al.*, 1993).

Infektionen mit dem weltweit vorkommenden PVS können bei anfälligen Kartoffelsorten Ernteverluste bis zu 20% verursachen und bei Vorliegen einer Mischinfektion mit dem PVM oder PVX sogar bis zu 40% betragen. Befallene Kartoffelpflanzen zeichnen sich häufig durch vertiefte Blattnerven aus, so dass sich die Blätter rau anfühlen. Des Weiteren können PVS-Infektionen aber auch latent verlaufen, oder bei stärkerer Ausprägung kann das Schadbild dem des PVM gleichen (Heitefuss *et al.*, 1993).

1.3.3.1. **Genomorganisation der Carlaviren**

Das *Carnation latent virus* (CLV) ist das Typvirus des Genus *Carlavirus* (Brunt *et al.*, 2000). Innerhalb dieses Genus sind in über 35 Arten viele Viren inzwischen beschrieben worden, bei denen es sich um flexible Partikel mit einer Länge von 610-690 nm und einem Durchmesser von 12-15 nm handelt.

Diese Viren werden vorwiegend von Blattläusen (wenige auch von Weißen Fliegen) in einer nicht-persistenten Weise übertragen (Brunt *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 1990; Fuji *et al.*, 2002; Hataya *et al.*, 2000; 2001; Henderson *et al.*, 1992; Levay und Zavriev, 1991; MacKenzie *et al.*, 1989; Meehan *et al.*, 1991a,b; Memelink *et al.*, 1990; Naidu *et al.*, 1998; Nicolaisen und Nielsen, 2001; Ryu *et al.*, 2000 und Zavriev *et al.*, 1991). Das

1. Einleitung

Genom dieser Viren bildet ein einzelsträngiges positiv-sinniges RNA-Molekül (7,4-8,5 kb), das von einer einzelnen Hüllproteinsorte (31- 35 kDa) umgeben wird (referiert bei Lee *et al.* 2003). Während das virale Genom des PVS eine Größe von ca. 7,5 kb (Foster, 1992) besitzt, weist das PVM-Genom eine Größe von ca. 8,5 kb auf (Zavriev *et al.*, 1991).

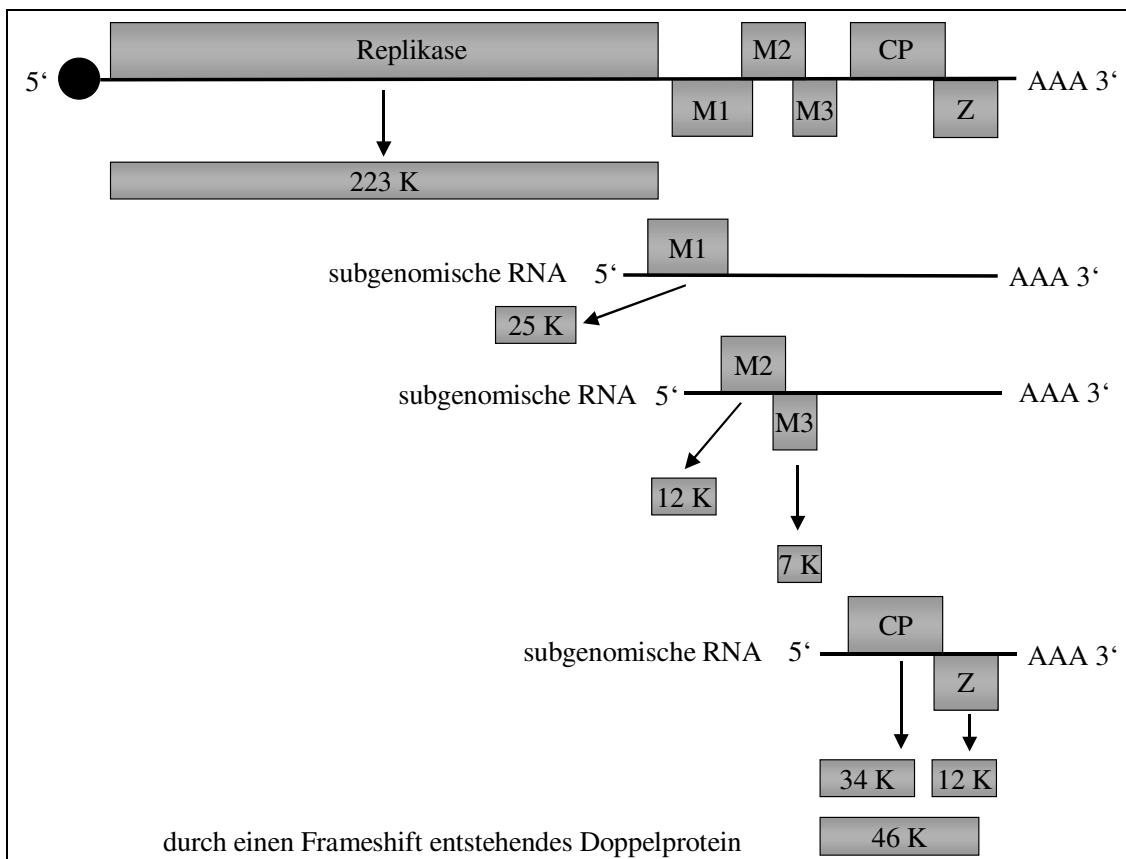


Abb. 5: Schematische Darstellung der Genomorganisation und der -expression des PVM

Die RNA Moleküle werden durch schwarze Linien dargestellt. Die schwarze Kugel repräsentiert die Cap Struktur, während die großen Rechtecke die ORFs darstellen und die schmalere Rechtecke die Proteine symbolisieren.

Legende: M1-M3 = „Movement Proteine“ 1-3; CP = Hüllprotein; Z = Protein mit Zinkfingermotiv; AAA = Poly-A-Schwanz. (Grafik verändert nach Zavriev *et al.* (1991))

Wie aus der Abb. 5 zu entnehmen ist, ähnelt das durch eine Cap-Struktur am 5'-Ende und durch einen Poly-A-Schwanz terminierte Genom sehr stark derjenigen von Viren, die dem Genus *Potexvirus* angehören (vergleiche Abb. 4). Jedoch weisen die beiden Genomorganisationen den Unterschied auf, dass das Genom der Carlaviren einen

zusätzlichen ORF (ORF6) zwischen dem CP und dem Poly-A-Schwanz enthält (Cavileer *et al.*, 1994; Henderson *et al.*, 1992; MacKenzie *et al.*, 1989).

Während der erste ORF durch die genomische RNA kodiert wird, werden die übrigen Proteine von subgenomischen RNA Molekülen translatiert (Hull, 2002).

Inzwischen sind die Genome einiger Viren des Genus *Carlavirus* komplett sequenziert worden. Zu ihnen gehören beispielsweise das *Aconitum latent virus* (AcoLV), *Blueberry scorch virus* (BLScV), *Garlic latent virus* (GarLV), *Hop latent virus* (HpLV), *Lily symptomless virus* (LSV), *Potato virus M* (PVM), *Poplar mosaic virus* (PopMV), *Daphne virus S* (DVS) und das *Narcissus common latent virus* (NCLV) (Che *et al.*, 2002; Fuji *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002; Hataya *et al.*, 2000, 2001; Choi und Ryu, 2003; Zavriev *et al.*, 1991; Smith und Campbell, 2004; Lee *et al.*, 2006 und Zheng *et al.*, 2006). Stellvertretend für die Viren des Genus *Carlavirus* soll an dieser Stelle am Beispiel des PVM ein kurzer Überblick über die Funktionen der einzelnen ORFs gegeben werden, und darüber hinaus auch bekannte Motive beschrieben werden.

Das virale Genom des PVM wird am 5'-Ende durch einen nicht-translatierbaren Bereich (UTR) von 75 Nukleotiden (nt) und am 3'-Ende vor dem Poly-A-Schwanz von einem weiteren UTR (70 nt) terminiert. Zusätzlich befinden sich zwischen den ORFs 1 und 2, sowie zwischen ORF 4 und 5 weitere nicht-translatierbare Bereiche von 38 und 21 nt (Zavriev *et al.*, 1991).

5'-UTR:

Im nicht-translatierbaren 5'-Bereich verschiedener Viren des Genus *Carlavirus* konnte das Motiv „UAAACA“ gefunden werden, von dem Cavileer *et al.* (1994) annehmen, dass dieses im Rahmen der Genomreplikation oder der Translation wichtige Funktionen ausübt. Beim PVS konnten Turner *et al.* (1999) innerhalb der 5'-UTR-Region Sequenzen identifizieren, die in ähnlicher Weise auch vor der Hüllproteinsequenz vorkommen, und denen sie eine translationsverstärkende Wirkung auf die nachfolgenden Leserahmen zuschreiben.

1. Einleitung

ORF1:

Beim PVM kodiert der erste offene Leserahmen für ein Polypeptid von 233 kDa (Zavriev *et al.*, 1991), das den Polymerasekomplex darstellt. Wie bei verschiedenen Viren des Genus *Carlavirus* bereits gezeigt werden konnte, beinhaltet dieses auch als Replikase bezeichnete Protein neben den drei Motiven einer Methyltransferase (MET) des Typs 1 (Hataya *et al.*, 2000; Choi und Ryu, 2003), fünf Motive für eine RNA-Helikase (HEL) der Gruppe 1 (Choi und Ryu, 2003) sowie weitere acht Motive, die als RdRp-typisch von verschiedenen Autoren beschrieben wurden (Hillman *et al.*, 1995 und Koonin *et al.*, 1993; Hataya *et al.*, 2000).

Wie beim PVM (Zavriev *et al.*, 1991) identifizierten Fuji *et al.* (2002) auch beim ALV das NTP Bindungs- und Helikasemotiv „GX₄GKS“, welches Gorbalenya (1989b) als typisches Motiv für die Helikasen-Superfamilie I beschrieb. Das ebenfalls für RNA-Replikasen bekannte Motiv „GDD“ (Poch *et al.*, 1989; Koonin *et al.*, 1993) konnte auch beim PVM (Zavriev *et al.*, 1991) und beispielsweise auch beim ALV von Fuji *et al.* (2002) vorgefunden werden. Die einzelnen konservierten Motive der genannten Domänen innerhalb der carlaviralen ORF1-Proteine wurden bei Choi und Ryu (2003) entnommen und sind im Anhang wiedergegeben.

Smith und Campbell (2004) referieren, dass bei verschiedenen Carlaviren wie dem PVS, *Helenium virus S* (HVS), B1ScV und dem PVM das Replikaseprotein autoproteolytisch prozessiert wird (Foster *et al.*, 1990; Foster und Mills, 1992; Lawrence *et al.*, 1995; Meehan und Mills, 1991a,b; Tavantzis, 1991). Lawrence *et al.* (1995) konnten zwei katalytische Zentren identifizieren, die an dieser Autoproteolyse maßgeblichen Einfluss haben.

UTR zwischen ORF1 und 2:

Wie bereits oben erwähnt, besitzt das PVM einen nicht-translatierbaren Bereich von 38 Nukleotiden (Zavriev *et al.*, 1991). Hataya *et al.* (2000) konnten beim Genom des HpLV feststellen, dass die ORFs 2 und 5 durch subgenomische RNAs exprimiert werden, und dass weiterhin die spezifische Sequenz „C/UUUAGGU“ in den subgenomischen Promotoren vorhanden ist (Levay *et al.*, 1991).

ORF 2- 4:

Die ORFs 2 bis 4 bilden einen „triple gene block“ (TGB), dessen Proteine maßgeblich für den viralen Zell-zu-Zell-Transport verantwortlich sind. Die Funktionen der einzelnen TGB-Proteine wurden bereits bei der Beschreibung der ORFs des Potexvirus (PVX) ausführlich besprochen (vergleiche Punkt 1.3.2.2).

Diese drei Proteine besitzen beim PVM Molekülmassen von 25, 12 und 7 kDa (Zavriev *et al.*, 1991). Im N-terminalen Bereich des ORF 2 (TGBp1) befindet sich das NTP-Bindungs- und Helikasemotiv „GKS/T“, das laut Hataya *et al.* (2000) hoch konserviert bei verschiedenen Viren des Genus *Carlavirus* vorliegt, und schon früher von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Cavileer, 1994; Mackenzie, 1989; Memelink, 1990; Rupasov, 1989). Dieser Bereich liegt auch bei den NTP-abhängigen DNA-Helikasen konserviert vor (Gorbalenya *et al.*, 1989b; Smith und Campbell, 2004). Morozov *et al.* (1990b) und Zavriev *et al.* (1991) stellten fest, dass dieses „GKS/T“-Motiv beim PVM doppelt vorkommt, nämlich zum einen in der Aminosäuresequenz der Replikase und zum anderen in der des TGBp1. Die Aminosäuremotive „MPLT/SPP“ im N-terminalen Bereich und „TLPXVGD“ im zentralen Bereich des TGBp2, deren Funktionen noch nicht geklärt werden konnten, wurden bei mehreren Viren des Genus *Carlavirus* gefunden (Foster, 1992 und Hataya *et al.*, 2000).

UTR vor dem CP:

Wie bereits oben erwähnt, befindet sich beim PVM zwischen dem ORF 4 (TGB3) und dem ORF5, der für das CP kodiert, eine nicht-translatierbare Region von 21 Nukleotiden (Zavriev *et al.*, 1991). Dieser Bereich ist auch Bestandteil der 5'-UTR-Region der subgenomischen RNA, von der das CP und das 12 kDa Protein translatiert werden. Innerhalb des 5'-UTR-Bereiches der 1,3 kb langen subgenomischen RNA des PVS konnte vor dem „AUG“ Codon des Hüllproteingens (CP) eine 101 nt lange Sequenz ermittelt werden, die als Translationsverstärker („Viral Translational enhancer“, VTE) nachfolgender ORFs fungiert, und sich um die zentrale Sequenz „CCTTTAGGTT“ erstreckte (Turner *et al.*, 1994a, b, 1997).

Durch die Anwesenheit dieser Sequenz konnten Turner *et al.* (1994a, 1994b) beim PVS eine Steigerung der Translation um das Vierfache feststellen, und sie konnten darüber

1. Einleitung

hinaus beobachten, dass eine Deletion von 47 Basen vor diesem zentralen Motiv einen deutliche Verringerung der Translatierbarkeit der nachfolgenden ORFs zur Folge hatte (Turner und Foster, 1997).

Smith und Campbell (2004) fanden im Genom des PopMV eine „Shine-Dalgarno“ (SD)-ähnliche Sequenz (AGGAGG), die in den Sequenzen verschiedener Viren, wie denen der Carlaviren, konserviert vorliegen (Foster und Mills, 1991). Unter der Voraussetzung, dass sich Hüllproteine in Chloroplasten ansammeln können, vermuten Hefferon *et al.* (2000), dass diese aufgrund der SD-Sequenz auch in den Chloroplasten synthetisiert werden könnten.

ORF 5:

Das PVM-Hüllprotein (CP) wird durch ORF5 kodiert und besitzt eine Molekülmasse von 34 kDa (Zavriev *et al.* 1991). Hataya *et al.* (2000) berichten, dass die Aminosäuresequenz „TGG(XXG)“ in den C-terminalen Bereichen der Hüllproteine vieler Viren des Genus *Carlavirus* konserviert vorliegt. Auch Lee *et al.* (2003) beschrieben bei ihren Untersuchungen der Sequenz des 3'-Endes das DSV dieses mit einer Erweiterung versehene „TGG“-Motiv (His-X₇-Asp-X₁₅-Thr-Gly-Gly), das mit denen von zellulären Serin-Proteinasen starke Ähnlichkeiten aufweisen soll.

ORF 6:

Dieser ORF des PVM kodiert für ein 12 kDa Protein, und wird um Verwechslungen mit dem TGBp2 Protein (12 kDa) zu vermeiden, im Folgenden als 11K bezeichnet (Zavriev *et al.* 1991). Durch die Anwesenheit dieses sechsten ORFs lassen sich die Carlaviren von den Potexviren abgrenzen (Cavileer *et al.*, 1994; Foster, 1992; Henderson *et al.*, 1992; MacKenzie *et al.*, 1989). Zwar konnten noch nicht alle Funktionen dieses Proteins erforscht werden, aber laut Smith und Campbell (2004) könnte dieses Protein durchaus direkt mit dem viralen Genom interagieren und darüber hinaus regulierend auf die Replikation, den viralen Transport, die RNA Stabilität oder auf die Translation wirken.

Im C-terminalen Bereich dieses ORFs wurde von verschiedenen Autoren ein metallbindendes Zinkfingermotiv „CX₂CX₁₂CX₄C“ beschrieben (Klug und Rhodes,

1987; Rupasov, 1989; Hataya *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003 und Fuji *et al.*, 2002). Dieser aus einer cysteinreichen Aminosäuresequenz bestehender Ringfinger ist an einer unspezifischen Nukleinsäurebindung beteiligt. Darüber hinaus ist dieses Motiv sowohl von vielen nukleinsäurebindenden Proteinen als auch von verschiedenen pflanzenviralen Proteinen bekannt (MacFarlane *et al.*, 1989 und Zavriev *et al.*, 1991). Dem 11K Protein des PVM konnten Gramstat *et al.* (1990) *in vitro* die Fähigkeit nachweisen, RNA- und DNA- Moleküle binden zu können. Lukhovitskaya *et al.* (2005) konnten inzwischen dem cysteinreichen Protein des *Chrysanthemum virus B* (CVB) in *N. benthamiana* -Pflanzen Funktionen als Pathogenitätsdeterminante nachweisen. Gramstat *et al.* (1994) konnten *in vitro* zeigen, dass das cysteinreiche Protein des PVM auf zwei verschiedene Weisen exprimiert werden kann. Neben einer internen Initiierung der Expression dieses ORFs sowohl am ersten, wie auch am zweiten AUG-Startcodon, konnte dieser ORF auch aufgrund eines Frameshiftmechanismus als CP/11K Doppelprotein exprimiert werden. Den für die Auslösung des Frameshift notwendigen Sequenzabschnitt konnten Gramstat *et al.* (1994) dem Motiv „AAAUGA“ zuordnen. Neben diesem Zinkfingermotiv konnten noch weitere konservierte Motive bei verschiedenen Carlaviren identifiziert werden, deren Bedeutung aber noch nicht geklärt werden konnte. Beispielsweise erwähnen Lee *et al.* (2003), dass bei mehreren Viren dieses Genus vor dem Zinkfingermotiv eine aus basischen Aminosäuren bestehende Domäne („RKRRRA“) vorhanden ist.

3'-UTR:

Im Bereich der 3'-UTR konnten inzwischen bei vielen carlaviralen Sequenzen „stem loop“-Strukturen ermittelt werden (Haylor *et al.*, 1990). In dieser Sequenz ist das Motiv „ACCUAA“ lokalisiert, das auch bei vielen Viren des Genus *Potexvirus* konserviert vorliegt. Dieses befindet sich ca. 30-60 Nukleotide vor dem Beginn des Poly-A-Schwanzes (Bancroft *et al.*, 1991), und ist an der viralen Replikation beteiligt. Cheng und Tsai (1999) konnten diesem Hexamermotiv eine Rolle als cis- agierendes Element zuweisen, das bei der Erkennung des Templates durch die Replikase mitwirkt, und so auch auf die Produktion der (-) RNA-Stränge Einfluss nimmt. Mutationsversuche machten deutlich, dass diese Region nur im unversehrtem Zustand eine effiziente

1. Einleitung

Virusanhäufung auszulösen vermag (Cheng und Tsai, 1999; Huang *et al.*, 2001). Auch einem weiteren konserviert vorliegenden Motiv „UAUUUU“ (Smith *et al.* 2004) werden Funktionen bezüglich der Genomreplikation und der Translationsregulation zugesprochen.

1.3.4. *Potato leafroll virus (PLRV)*

Da dieses Virus in der vorliegenden Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielt, soll es an dieser Stelle auch nur kurz dargestellt werden.

Je nach Anfälligkeit der Kartoffelsorten können Infektionen mit diesem Virus Ertragsverluste bis zu 80% verursachen (Killick, 1979; Weidemann, 1990), der sich durch einen geringeren Knollenansatz und deutlich verkleinerten Knollen auszeichnet. Infizierte Pflanzen weisen vor allem im unteren Stängelbereich nach oben hin tütenförmig eingerollte Blätter auf, die sich zusätzlich durch eine gelbliche Färbung und eine Sprödigkeit auszeichnen (Heitefuss *et al.*, 1993 und Stevenson *et al.*, 2001).

1.3.4.1. Genomorganisation des PLRV

PLRV ist das Typvirus des Genus *Polerovirus* der Familie *Luteoviridae* (Pringle, 1998). Polereoviren bestehen aus kleinen isometrischen Viruspartikeln (23 nm), die ein einzelsträngiges positiv orientiertes, monopartites (5,8 kb) RNA Genom besitzen (Mayo *et al.*, 1982). Wie bei Viren des Genus *Polerovirus* üblich, ist auch das PLRV auf das Phloemgewebe eines Wirtes begrenzt (Barker und Harrison, 1986; Shepardson 1980 und Mayo und Ziegler-Graff, 1996). PLRV wird durch Blattlausvektoren (vorwiegend durch *Myzus persicae*) in einer zirkulativen, nicht-propagativen Weise übertragen (Eskandari *et al.*, 1979; Harrison, 1984; Sylvester, 1980). Obwohl das Virus über einen längeren Zeitraum in der Blattlaus verweilt, findet im Insekt jedoch keine Replikation statt (Gray *et al.*, 2003).

Die Genomorganisation des PLRV kann aus Abb. 6 entnommen werden.

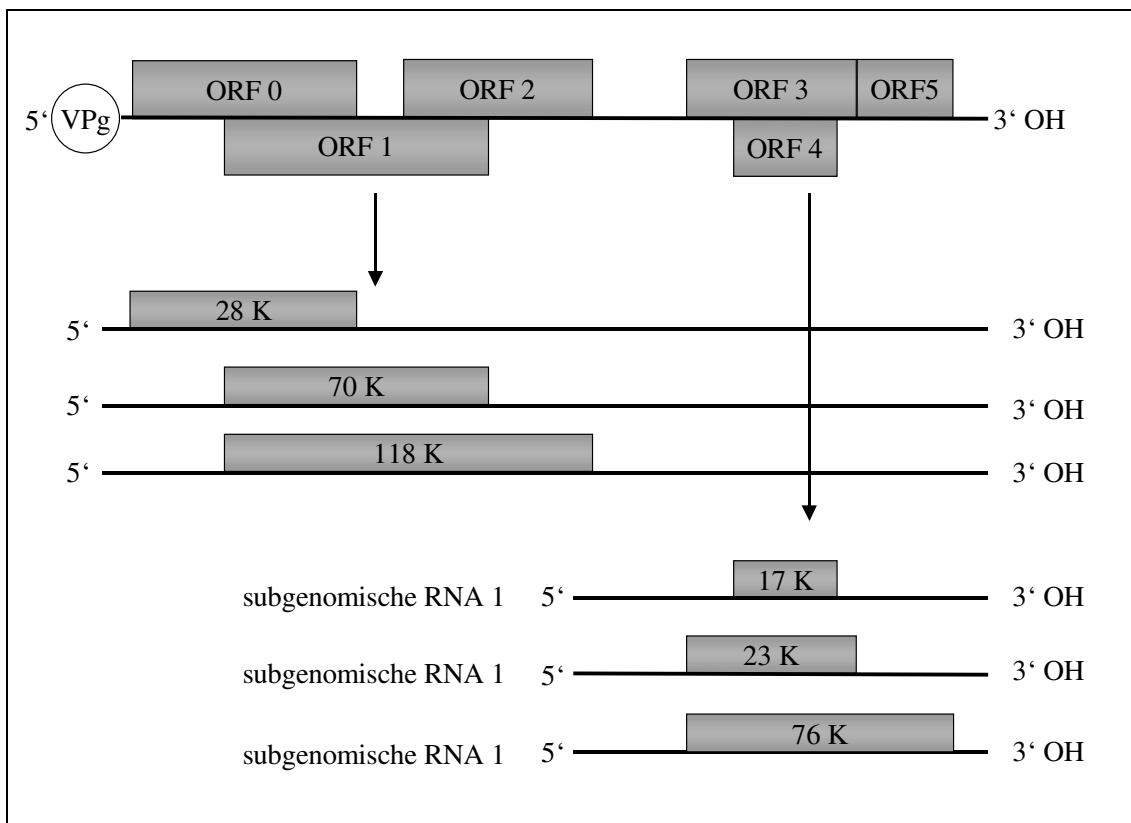


Abb. 6: Schematische Darstellung des PLRV-Genoms und der für das Virus typischen Translationsprodukte.

Die Linien repräsentieren die genomische und subgenomischen RNA Moleküle, während die ORFs durch dickere und die Translationsprodukte durch schmalere Rechtecke dargestellt werden. Der Kreis am 5' Ende der genomischen RNA symbolisiert das VPg. (verändert nach Virus Taxonomy Online, 7. Edition)

Inzwischen wurden die Nukleotidsequenzen des ca. 6 kb PLRV-RNA Genoms von mehreren, aus verschiedenen geographischen Gegenden stammenden Isolaten bestimmt (Mayo *et al.*, 1989; van der Wilk *et al.*, 1989; Keese *et al.*, 1990 und Palucha *et al.*; 1994). Diese Sequenzen wiesen untereinander alle hohe Ähnlichkeiten auf, die zwischen 93% und 97% lagen. Neben einem am 5'-UTR-Ende kovalent gebundenen VPg besitzt das virale Genom sechs ORFs, die in zwei Blöcken angeordnet sind. Diese beiden Blöcke werden durch eine intercistronische Region von ca. 200 Nukleotiden voneinander getrennt. Wie bei den Viren der Familie *Luteoviridae* üblich, weist auch das PLRV verschiedene Mechanismen der Genexpression auf. Hierzu zählen überlappende Leserahmen, subgenomische RNA-Moleküle, Durchlesen eines Stop Codons, ribosomales „leaky scanning“, ribosomales Frameshifting und die

1. Einleitung

Autoproteolyse von Proteinen (von Rohde *et al.*, 1994 und Miller *et al.* 1997). Die von den ersten drei ORFs kodierten Proteine (ORF 0-2) werden direkt von der genomischen RNA translatiert. Dagegen werden das CP (ORF3), das Movement-Protein (MP, ORF4) und das für die Blattlausausbreitung wichtige Protein (ORF5) von einer subgenomischen RNA exprimiert (Smith und Harris, 1990).

1.3.4.2. Funktionen der einzelnen ORFs

Im Folgenden werden kurz die Funktionen der einzelnen Proteine vorgestellt.

ORF 0:

Über die Funktionen des kodierten Proteins ist bis jetzt wenig bekannt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass es als Unterdrücker des „gene silencing“ fungiert (Pfeffer *et al.*, 2002).

ORF 1:

Dieser Leserahmen kodiert für ein Polyprotein mit einer Molekülmasse von 70kDa, welches eine potenzielle Proteinase und eine VPg Domäne besitzt. Durch einen autoproteolytischen Vorgang soll das VPg vom restlichen Protein abgetrennt werden (Gorbalenya *et al.*, 1989a; van der Wilk, 1997 und Miller *et al.*, 1997). Mayo und Ziegler-Graff (1996) schreiben sowohl diesem, wie auch dem Protein das durch den ORF 2 kodiert wird, RNA-Polymeraseaktivitäten zu.

ORF 2:

Durch einen -1 ribosomalen Frameshift in der Überlappungszone, die zwischen dem ORF 1 und dem ORF 2 liegt, wird dieses Protein exprimiert (Prüfer *et al.*, 1992; Kujawa *et al.*, 1993). Da in der Aminosäuresequenz ein erweitertes GDD-Motiv (S/TGXXXTXXXNS/T(X₁₈₋₃₇)GDD) identifiziert werden konnte, das für virale RdRps oder Replikasen bekannt ist, gilt dieses Protein als Replikase (Kamer und Argos, 1984 und Koonin, 1991).

ORF 3 und 5:

Die ikosaedrischen Viruspartikel der *Luteoviridae* bestehen aus zwei Strukturproteinen. Diese sind zum einen die häufiger vorkommenden 23 kDa Hüllproteine, kodiert durch den ORF 3, und die weniger oft vorkommenden 76 kDa Proteine, die als Durchleseproteine („read through“) bekannt sind (Bahner *et al.*, 1990 und Mayo und Ziegler Graff, 1996).

Das Durchleseprotein wird durch ORF 3 und dem nachfolgendem ORF 5 kodiert, das aufgrund der Unterdrückung eines Stop-Codons im Anschluss an die Hüllproteinsequenz entsteht (Mayo und Miller, 1999). Es wird angenommen, dass die Viruspartikel von 180 Hüllproteinuntereinheiten zusammengesetzt werden. Dabei heben sich die Durchleseproteine (ca. 50 kDa) von der Virusoberfläche ab. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinhüllen der Viren zwar auch ohne Beteiligung der Durchleseproteine nur aus den Hüllproteinen gebildet werden können, jedoch wiesen diese eine deutlich geringere systemische Ausbreitung auf, und waren darüber hinaus auch durch einen Verlust der Blattlausübertragbarkeit gekennzeichnet (Bruyere *et al.*, 1997; Chay *et al.*, 1996 und Reinbold *et al.*, 2001).

Des Weiteren kann dieses Protein durch eine N-terminal gelegene argininreiche Domäne mit der viralen RNA interagieren (Dolja und Koonin, 1991). Aminosäureaustausche in diesem Bereich hatten einen Verlust der Viruspartikelbildung, der systemischen Ausbreitung, sowie eine Verschlechterung der Blattlausübertragbarkeit zur Folge (Lee *et al.*, 2005). Haupt *et al.* (2005) konnten die Hüllproteine in *N. benthamiana* -Pflanzen sowohl im Cytoplasma wie auch an den Rändern des Kernkörperchens im Zellkern beobachten.

ORF 4:

Dieses innerhalb des ORF 3 Gens kodiert vorliegende Protein gilt als „Movement-Protein“, und beeinflusst somit in besonderem Maße die Ausbreitung innerhalb der Pflanze (Tacke *et al.*, 1993).

1.4. Rekombination bei Pflanzenviren

Verschiedene Studien suchten nach Erklärungen für die Evolution einzelsträngiger mRNA ähnlicher Viren, die in den Pflanzen in Form einer Quasispezies, d. h. als eine Population nah verwandter Sequenzen existieren (García-Arenal *et al.*, 2001 und Roossinck *et al.*, 2003). Ein Charakteristikum dieser Viren besteht in der relativ hohen Mutationsrate, die während ihrer Replikation aufgrund der mangelnden „Proofreading“-Aktivitäten ihrer RNA-abhängigen RNA Polymerasen entsteht (Reaney *et al.*, 1987; Eigen, 1996 und Domingo *et al.*, 1998). Solche Mutationen ermöglichen es den Nachkommen, sich veränderten Umweltumgebungen anzupassen. Neben Mutationsereignissen stellt die Rekombination bei RNA Viren eine weitere wichtige Quelle für die Schaffung genetischer Variabilität dar (Bruyere *et al.*, 2000; Garcia-Arenal *et al.*, 2001).

Nach Hull *et al.* (2002) bezeichnet die Rekombination eine Erzeugung chimärer Nukleinsäuremoleküle, die sich entweder aus Bereichen zusammensetzen, die sich zuvor auf verschiedenen elterlichen Nukleinsäuremolekülen, oder sich aber an verschiedenen Positionen auf demselben elterlichen Nukleinsäuremolekül befunden haben. Neben der Erhöhung der Variabilität innerhalb einer Viruspopulation vermögen RNA-Rekombinationsereignisse auch beschädigte oder mutierte virale RNA-Genome zu reparieren und deren Infektiosität wiederherzustellen (Lai, 1992). Deshalb spielt die RNA-Rekombination eine entscheidende Rolle in der Evolution der Pflanzenviren (Aranda *et al.*, 1997; Fernandez-Cuartero *et al.* 1994; Lai 1992; Worobey *et al.* 1999; Roossinck 1997 und Tan *et al.* 2004).

Rekombinationen auf RNA Ebene sind ein generelles Phänomen und konnten laut Alejska *et al.* (2005) bei allen Typen von Viren festgestellt werden, die ein RNA Genom besitzen: Bei einzelsträngig-positiv-sinnigen RNA-Viren (Hirst, 1962; Ledinko, 1963; Lai, 1992 und Alejska *et al.*, 2001) bei einzelsträngigen-negativ-sinnigen RNA-Viren (Suzuki *et al.*, 1998; Plyusnin, 2002), in doppelsträngigen RNA-Viren (Mindich *et al.*, 1992; Onodera *et al.* 1993) und bei Retroviren (Coffin, 1978; Zhang und Temin, 1993 und Hu 1997).

1.4.1. Modell der RNA Rekombination

Rekombinationsereignisse lassen sich in homologe (genetisches Material wird mit einem verwandten Organismus ausgetauscht) und nicht-homologe Rekombinationen unterscheiden (Lai, 1992). Von Nagy und Simon (1997) wurden drei verschiedene Mechanismen für Rekombinationen vorgeschlagen:

Der erste Mechanismus beinhaltet eine Rekombination mit homologen (verwandten) Sequenzen. Verläuft die Rekombination präzise, so weisen die entstehenden Übergangsstellen keine Deletionen oder Additionen von Nukleotiden auf. Verläuft dieser Prozess jedoch unpräzise (bzw. aberrant), können durch entsprechende Additionen oder Deletionen von Nukleotiden Leserasterverschiebungen die Folgen sein.

Beim zweiten Mechanismus handelt es sich um eine Rekombination ohne Sequenzhomologien. Diese kann durch Strangbrüche und anschließender Religation oder durch den Übergang der viralen Replikase auf den zweiten Matrizenstrang verursacht werden.

Beim dritten Mechanismus wird eine Rekombination durch Sequenzhomologien begünstigt. Dieser Mechanismus stellt eine Verbindung der Eigenschaften aus den beiden vorher genannten Modellen her und neben Sequenzhomologien sind weitere virale oder Wirtsfaktoren für die Rekombination notwendig.

Das erste pflanzliche Virus an dem RNA Rekombinationen beobachtet wurden, war das *Brome mosaic virus* (BMV), das ein dreiteiliges positiv-strängiges RNA Genom besitzt (Bujarski und Kaesberg, 1986). Bei diesem Virus konnte auch nachgewiesen werden, dass die Proteine der RdRp an dem Rekombinationsprozess beteiligt sind (Figlerowicz *et al.*, 1997; 1998 und Nagy *et al.*, 1994).

Inzwischen konnten auch die Replikasen weiteren Viren wie beispielsweise die des *Cucumber mosaic virus* (CMV) und die des *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV), sowie einige Replikasen verschiedener Viren der Genera *Carmo-* und *Tombusvirus* als Hauptfaktoren für die Entstehung von RNA-Rekombinationen bestätigt werden (Kim und Kao 2001; Cheng und Nagy, 2003). Darüber hinaus konnten beim BMV sowohl

1. Einleitung

homologe (Nagy und Bujarski, 1995), als auch nicht-homologe Rekombinationsereignisse festgestellt werden (Nagy und Bujarski., 1993).

Als Modell der RNA Rekombination wurde der „Template switching“ Mechanismus („copy choice“) erstmals für das Poliovirus von Cooper *et al.* (1974) entwickelt (Worobey und Holmes 1999). Dieses geht davon aus, dass die virale RdRp während der RNA Synthese von einem Ausgangsstrang auf einen anderen RNA-Strang übergeht und dort die Synthese des neuen Stranges fortführt (Jarvis *et al.*, 1991; Lai, 1992). Vor dem eigentlichen Wechsel der Replikase auf einen zweiten RNA-Strang bleibt diese zunächst stehen, und verdrängt den Ausgangsstrang (Lai., 1992; Nagy und Simon, 1997). Dabei kann dieses Stehenbleiben der RdRp sowohl durch RNA bedingte Sekundär- oder Tertiärstrukturen, wie auch durch den Einbau falscher Nukleotide ausgelöst werden (Deng und Shuman, 1997; Huang *et al.*, 2001; Jager *et al.*, 1999; von Hippel, 1998 und Wilson *et al.*, 1995). Der Wechsel des Enzyms zu einem zweiten Strang kann auch durch andere Faktoren begünstigt oder hervorgerufen werden. Diese sind intermolekulare RNA-RNA Interaktionen, intramolekulare Interaktionen oder RNA-Protein Interaktionen (Jarvis *et al.*, 1991; Korzheva *et al.*, 2000; Lai., 1992 und Nagy *et al.*, 1993). Nach dem Matrizenstrangwechsel führt die RdRp die Synthese des neuen Stranges weiter fort, indem sie den vom ersten Ausgangsstrang stammenden neu hergestellten RNA-Strang als Primer für die zweite Matrizen-RNA benutzt. Wie bereits erwähnt, können in Abhängigkeit von der Basenpaarung zwischen den beiden Matrizen-RNA Strängen die neu entstandenen RNA Moleküle in verschiedenen Kategorien eingeordnet werden: basenpaarungsabhängig (base pairing dependent), „base pairing assisted“ (hilfreich durch Basenpaarung) und unabhängig von der Basenpaarung (Nagy, 1997).

Verschiedene Studien zeigten dass RNA Rekombinationen nicht unbedingt als zufälliges Ereignis betrachtet werden können, bei der jedes Nukleotid eines Ursprungs-RNA-Moleküls mit einer gleich hohen Wahrscheinlichkeit an einem Rekombinationsereignis beteiligt ist. Denn nicht alle Regionen innerhalb eines RNA-Moleküls weisen eine gleichmäßig hohe Rekombinationshäufigkeit auf. Deshalb werden Bereiche, in denen häufiger Rekombinationsereignisse beobachtet werden „hot spots“ und diejenigen, die eine geringere Rekombinationshäufigkeit aufweisen, als

„cold spots“ bezeichnet. Zu diesen Bereichen wurden mehrere Modelle entwickelt, die sich mit diesen Erscheinungen bei verschiedenen Viren beschäftigten (Jarvis *et al.*, 1991; Lai 1992; Nagy und Bujarski, 1997). Einen hot-spot konnten Wierzchoslawski *et al.* (2003, 2004) auf der RNA3 des BMV im Bereich des subgenomischen Promotors lokalisieren, während Chen *et al.* (2002) weitere hot spots bei verschiedenen aus *Alstroemeria*-Arten stammenden CMV-Isolaten vorwiegend in den 3'-UTR Bereichen der RNA2 und RNA3 vorfanden. Dabei zeichneten sich diese Bereiche bedingt durch inter- und intramolekulare Rekombinationsereignisse durch zusätzliche Sequenzen unterschiedlicher Länge aus. Schon frühere Untersuchungen am BMV zeigten, dass bestimmte AU reiche Regionen Rekombinationsereignisse erleichterten (Nagy und Bujarski, 1997; Nagy und Bujarski, 1996). Nagy und Bujarski (1996) und Nagy *et al.* (1999) stellten sogar weiterhin fest, dass solche AU-reichen Regionen die Möglichkeit einer unpräzisen Rekombination (kleine Deletionen, Basensubstitutionen, Duplikationen) begünstigten, während bei GC-reichen Regionen einiger Viren der Genera *Carmovirus* und *Tombusvirus* die gegenteilige Wirkung beobachtet werden konnte (Cheng und Nagy, 2003). Die AU-reichen Regionen verschiedener Viren fördern auch intervirale Rekombinationsereignisse, die oft in unpräziser Weise erfolgen. Dieses konnten Shapka und Nagy (2004) bei Rekombinationen zwischen dem BMV und dem Tombusvirus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) feststellen.

Rekombinationsereignisse können sowohl zwischen verschiedenen viralen, als auch zwischen viralen und pflanzlichen RNA-Molekülen ablaufen, und zur Entstehung neuer Virusstämme beitragen (Lai, 1992 und Worobey *et al.*, 1999). Schon mehrfach wurde sowohl das Auftreten von Rekombinationen zwischen viralen Nukleinsäuren (Aaziz und Tepfer, 1999a; Nagy *et al.*, 1999; Nagy und Bujarski, 1995, 1996, 1997; Gal-On *et al.*, 1998) als auch zwischen viraler und transgener RNA in transgenen Pflanzen beschrieben (Varrelmann *et al.*, 2000; Aaziz und Tepfer, 1999b; Greene und Allison, 1994, 1996; Borja *et al.*, 1999). Rekombinationen zwischen Virus- und Wirts-RNA konnten nicht nur bei Pflanzenviren, sondern auch bei verschiedenen human- und tierpathogenen RNA-Viren beobachtet werden (Khatchikian *et al.*, 1998; Baroth *et al.*, 2000; Greene und Allison, 1994; Nagai *et al.*, 2003).

1. Einleitung

Bereits 1994 bezeichneten Gibbs die seltener auftretenden RNA Rekombinationen zwischen Viren verschiedener Virusgruppen als „inter-Group“ und die häufiger vorkommenden Rekombinationen innerhalb einer Virusgruppe als „intra-Group“ Rekombinationen. Oft wird über Rekombinationsereignissen innerhalb einer Gruppe sehr naher verwandter Viren bzw. Stämme eines Virus (Jakob *et al.* 1997; Nie und Singh, 2002a,b) oder von Rekombinationen zwischen den Segmenten multipartiter Viren berichtet (Bujarski und Kaesberg, 1986; Cascone *et al.* 1990, 1993; Bujarski und Nagy, 1994). Beispielsweise war es White und Morris (1994) in einem artifiziellen System möglich, Rekombinationen zwischen den RNA-Molekülen des *Cucumber necrosis virus* (CNV) und den replikationsdefekten oder -intakten RNAs des TBSV nachzuweisen. Masuta *et al.* (1998) zeigten, dass nach Rekombination der RNA2 des CMV und des *Tomato aspermy virus* (TAV) ein quadripartites Hybridvirus mit einer chimären Replikase gebildet werden konnte, und Aaziz und Tepfer (1999a) war es möglich bei denselben Viren, in nicht-transgenen, mischinfizierten Pflanzen RNA Rekombinationen nachzuweisen.

Häufig konnten rekombinante Viren festgestellt werden, wenn ein hoher Selektionsdruck auf ein Virus ausgeübt wurde. Beispielsweise stellten Silbernagel *et al.* (2001) in relativ kurzer Zeit rekombinante Viren in solchen Pflanzen fest, die zwar mit den Potyviren *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) und *Bean common mosaic virus* (BCMV) gleichzeitig inokuliert worden waren, die aber für eines der beiden Viren keine natürliche Wirtspflanze darstellten. Im Gegensatz dazu konnten sie jahrelang keinerlei rekombinante Viren in solchen Pflanzen identifizieren, die für die beiden verwendeten Viren natürliche Wirtspflanzen waren. Rekombinante Viren wurden nicht nur in artifiziellen Versuchsanordnungen festgestellt, bei denen ein künstlich erzeugter hoher Selektionsdruck herrschte, sondern auch unter natürlichen Bedingungen. Cervera *et al.* (1993), Glasa *et al.* (2002) konnten die natürliche Rekombination bei PPV zwischen verschiedenen Stämmen oder Isolaten zeigen, und Moreno *et al.* (2004) wiesen einen Anteil an Rekombinanten von 7% in einer natürlichen Population des WMV in Spanien nach. Auch durch verschiedene Untersuchungen natürlicher Isolate von anderen Potyviren (darunter auch einige von

PVY) konnten rekombinante Viren beschrieben werden (Revers *et al.*, 1996; Glais *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2004).

Wie bereits oben erwähnt, können Rekombinationsereignisse nicht nur zwischen verschiedenen viralen RNA Molekülen ablaufen, sondern auch zwischen Virus- und Wirts-RNA. Bei mehreren künstlich veränderten Pflanzenviren konnte beobachtet werden, dass sie in der Lage waren, ihr Genom durch Rekombinationen mit einem transgenen pflanzlichen Transkript zu reparieren (Borja *et al.*, 1999; Greene und Allison, 1994; Rubio *et al.*, 1999). Beispielsweise beobachteten Greene und Allison (1994, 1996) bei Mutanten des CCMV, die Deletionen im CP aufwiesen, dass diese nach Rekombination in einer CCMV-CP transgenen Pflanze wieder nicht-transgene *N. benthamiana* -Pflanzen systemisch infizieren konnten, und bei weiteren Untersuchungen dieser Rekombinanten stellten Allison *et al.* (1997) zum Teil veränderte oder neuartige Symptomausprägungen fest.

Varrelmann *et al.* (2000) waren in der Lage, sowohl die Restauration eines assemblierungsdefekten und nicht durch Aphiden übertragbaren PPV Isolates in PPV-CP transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen, als auch nach gleichzeitiger Inokulation dieses defekten Virus mit einer ausbreitungsdefekten PVX Mutante, die ein intaktes PPV Hüllprotein exprimiert, zu zeigen. Adair und Kearney (2000) inokulierten transgene *N. benthamiana* -Pflanzen mit einem TMV Klon, dessen Hüllproteinsequenz teilweise entfernt worden war. Die transgenen Pflanzen zeichneten sich dadurch aus, dass sie ein ca. 3000 bp langes Fragment des TMV exprimierten, das unter anderem die Sequenz des TMV-CP enthielt. In 32 % dieser transgener Pflanzen konnten sie rekombinante TMV Genome feststellen, welche die vollständigen Hüllproteinsequenzen besaßen. Mayo und Jolly (1991) identifizierten ein Luteovirusisolat, das infolge eines Rekombinationsereignisses innerhalb des 5'-Endes eine Chloroplasten-Exon-Sequenz beinhaltet. Auch im Genom einiger Closteroviren konnten Sequenzen zellulärer Proteine festgestellt werden (Dolja *et al.*, 1994 und Peremyslov *et al.*, 1998).

Aus intra- und intermolekularen Rekombinationsereignissen, an denen virale und pflanzliche RNA Moleküle beteiligt sind, können nicht nur veränderte Viren hervorgehen. Diese Ereignisse können auch Auswirkungen auf das Genom der Wirtspflanzen haben. Tanne und Sela (2005) fanden in verschiedenen Weinpflanzen

1. Einleitung

Sequenzbereiche des PVY vor. Diese Bereiche beinhalteten neben dem Hüllproteingen auch Teile des darauffolgenden 3'-UTRs. Tanne und Sela (2005) stellen die Hypothese auf, dass sich im Laufe der Evolution eine Rekombination zwischen der RNA des PVY und einem pflanzlichen retrotransponalen Element stattgefunden haben könnte, woraufhin die virale Sequenz in das Genom der Weinpflanzen integriert wurde.

Rekombinationsereignisse zwischen pflanzlicher und viraler RNA gewinnen an Bedeutung, wenn diese sich in gentechnisch modifizierten Pflanzen im Freiland ereignen. Die Verwendung von transgenen Pflanzen könnte zwar langfristig einen wichtigen ökonomischen und ökologischen Beitrag beispielsweise in der Produktion von virusresistenten Pflanz-, Speise- und Industriekartoffeln leisten, es dürfen jedoch von dessen Anbau im Freiland keine sicherheitsrelevanten Einflüsse für den Konsumenten und die Umwelt ausgehen. Bereits zu Beginn der 90er Jahre wurde die Herstellung bzw. der Anbau transgener Pflanzen von Tepfer (1993) dahingehend hinterfragt, ob dieser ein biologisches Risiko darstelle. Auch wenn Falk und Bruening (1994) ein solches Risiko als sehr gering und relativ unwahrscheinlich einstufen, postulieren andere Autoren Auswirkungen auf Viruspopulationen als potenzielle Sicherheitsbedenken, die zum Entstehen von Viren mit veränderten Eigenschaften bezüglich ihrer Übertragbarkeit, ihres Wirtspflanzenspektrums oder ihrer Fitness führen könnten (Allison *et al.*, 1997; Greene und Allison, 1994).

Wie bereits beschrieben, konnten in verschiedenen artifiziellen Systemen unter Selektionsdruck Rekombinationen zwischen transgener pflanzlicher und viraler RNA festgestellt und infolgedessen rekombinante Viren identifiziert werden. Allerdings ist wenig darüber bekannt, inwieweit und mit welcher Häufigkeit rekombinante Viren beim Anbau transgener Pflanzen, die aufgrund ihres Transgens keinen erkennbaren Selektionsdruck auf die Viren ausüben, im Freiland tatsächlich entstehen.

Ein mehrjähriger Freisetzungsversuch (2001 bis 2004), bei dem neben sechs transgenen Fructankartoffellinien auch sechs nicht transgenene Vergleichsvarianten unterschiedlicher Kartoffelsorten unter praxisnahen Bedingungen angebaut wurden, bot die Gelegenheit, diesen Sachverhalt näher untersuchen zu können. Für die vorliegende Arbeit leiteten sich deshalb mehrere Zielsetzungen ab.

1.5. Zielsetzungen und Aufgabenstellungen der vorliegenden Arbeit

Die hier vorliegende Arbeit hatte unter anderem das Ziel, das Auftreten der bereits vorgestellten fünf Kartoffelviren in den Pflanzen der transgenen und nicht-transgenen Kartoffelvarianten durch anbaubegleitende Studien zu ermitteln, und gegebenenfalls Unterschiede bezüglich der vorzufindenden Kartoffelviruspopulationen zwischen einzelnen Kartoffellinien und Sorten festzustellen. Ein weiteres Ziel dieser Untersuchungen bestand darin, das Ausmaß der unter den auf der Freisetzungsfläche vorherrschenden Kulturbedingungen entstehenden rekombinanten Viren in den Pflanzen der einzelnen Kartoffellinien herauszufinden und die Fitness dieser modifizierten Viren gegebenenfalls zu bewerten. Aus diesen Zielen leiteten sich folgende Aufgabenstellungen ab:

- Feststellung der in den einzelnen Kartoffelvarianten der Freisetzungen vorkommenden oben beschriebenen fünf Kartoffelviren
- Erfassung der Sequenzvariabilitäten der in den transgenen und nicht-transgenen Kartoffelvarianten vorgefundenen Viruspopulationen
- Identifizierung und Bestimmung des Ausmaßes von potenziell auftretenden rekombinanten Kartoffelviren in den nicht-transgenen und den in ihrem Kohlenhydratstoffwechsel gentechnisch modifizierten Kartoffelvarianten, sowie gegebenenfalls Bewertung der Fitness der vorgefundenen rekombinanten Viren

Da im Vorfeld des Freisetzungsversuches nicht davon ausgegangen werden konnte, dass der Anbau von transgenen Fructankartoffellinien einen unmittelbaren Einfluss auf das Auftreten von rekombinanten Viren haben würde, sollten ergänzende Labor- und Gewächshausversuche durchgeführt werden, bei denen das Rekombinationsverhalten der Viren PVX und PVM innerhalb der Bereiche TGB und CP untersucht werden sollte.

Das Ausmaß und die Häufigkeit homologer Rekombinationsereignisse zwischen transgener pflanzlicher und viraler RNA sollte anhand von deletierten PVX Mutanten und transgener *N. benthamiana* -Pflanzen (die entweder den vollständigen PVX-TGB1 oder PVX-TGB2 exprimierten) untersucht werden. Dabei sollte ermittelt werden,

1. Einleitung

inwieweit solche Rekombinationsereignisse eine Rekonstitution des viralen Genoms bewirken können.

Konkret ergaben sich für diese Untersuchungen folgende Aufgabenstellungen:

- Herstellung von „in frame“ Deletionen in den ORFs TGB1 und TGB2 des PVX
- Überprüfung transgener *N. benthamiana* -Linien
- Identifizierung und Bestimmung des Ausmaßes von Rekombinationsereignissen, die zu einer Rekonstitution des viralen Genoms führten.

Darüber hinaus sollte durch eine weitere freisetzungsunabhängige Untersuchung die Frequenz des Auftretens intramolekularer, nicht-homologer Rekombinationen zwischen den Viren PVX und PVM festgestellt und die Fitness natürlich oder artifiziell entstandener rekombinanter Viren bewertet werden.

Hieraus ergaben sich folgende Aufgabenstellungen:

- Identifizierung natürlich entstehender rekombinanter Viren bei Vorliegen von PVX und PVM doppelinfizierten Pflanzen
- Bewertung der Fitness natürlich vorgefundener oder artifiziell erzeugter rekombinanter Viren
- Herstellung einer infektiösen cDNA Kopie des PVM, und Vergleich des Wirtspflanzenspektrums zwischen dem PVM-Volllängenklon und dem ursprünglichen Virus.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen

Bezeichnung	Abkürzung	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol		Merck
4 Nitrophenylphosphat di .Na-Salz		Serva
5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside	X-GAL	MBI
Acetosyringon		Sigma
Acrylamid		Serva
Adenosintriophosphat	ATP	Roth (100mM- Lösung)
Albumin für ELISA	Albumin	Loewe – Biochemica
Ampicillin	Amp.	Serva
Bovine Serum Albumin	BSA	Sigma
Bromphenolblau		Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂	Merck
Calciumnitrat-tetrahydrat	Ca(NO ₃) ₂	Merck
Celite		Serva
Chloramphenicol	Camp	Serva
Chloroform		Roth
Diethanolamin		Sigma
Dimethylformamid	DMF	Merck
Dimethyl-Sulfoxid	DMSO	Serva
Di-Natriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Merck
DNA		Sigma
D-Sorbitol		Serva
Dithiothreitol	DTT	Boehringer (100mM)
Eisessig (100%)		Roth
Ethidiumbromid Stammlösung	EtBr	Roth
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz	EDTA	Merck
Essigsäure (100%)		Roth
Ethanol absolut	EtOH (abs.)	Merck
Ethanol (99,6%)	EtOH (99,6%)	Roth
Ethanol (70%)	EtOH (70%)	Roth
Fast Red TR Salz	Fast Red	Sigma
Gelatine		Sigma

2. Material und Methoden

(Fortsetzung Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen)

Bezeichnung	Abkürzung	Bezugsquelle
Gibberellinsäure	GA ₃	Serva
Glucose		Sigma
Glycerin		Roth
Guanidin Hydrochlorid	G-HCl	Roth
Hefeextrakt		Roth
HEPES		Roth
Hexamincobalttrichlorid	HaCoCl ₃	Sigma
Isoamylalkohol		Merck
Isopropanol (99,7%)	Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	IPTG	BSA/bts/MBI
Kaliumacetat	KAc	Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck
Kaliumhydroxid	KOH	Merck
Kaliumjodid	KJ	Merck
Kaliummonohydrogenphosphat	KHPO ₄	Baker
Kaliumnitrat	KNO ₃	Merck
Kanamycin	Kn	Roth
LM-Agarose		Biozym
Magnesiumacetat	MgAc	Merck
Magnesiumchlorid hexahydrat	MgCl ₂	Roth
Magnesiumsulfat-heptahydrat	MgSO ₄	Merck
Manganchlorid-Dihydrat	MnCl ₂	Merck
Methanol	CH ₄ O	Roth
Methylammonium-hydroxid		Fluka
Morpholinethansulfonsäure	MES	Roth
Naphtol AS-Mx Phosphat, Dinatriumsalz	Naphtol AS	Sigma
Natriumacetat Trihydrat	NaAc	Roth
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumdodecylsulfat Ultra Pure	SDS	Roth
Natriumhydroxyd	NaOH	Merck
Natriumjodid	NaI	Sigma
Natriumsulfit	Na ₂ SO ₃	
NONIDET® P40		Fluka
Polyethylenglycol 6000	PEG	Merck
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	TWEEN® 20	Roth
Polyvinyl Polypyrrolidone K25	PVP K25	Loewe – Biochemica GmbH
Rifampicin		Serva
Roti Phenol	Phenol	Roth
Rubidiumchlorid	RbCl	Roth
Saccharose		Merck
Salzsäure	HCl	Merck
SEAKEM Agarose	Agarose	Biozym

(Fortsetzung Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen)

Bezeichnung	Abkürzung	Bezugsquelle
Select Agar	Agar	Gibco BRL
Select Peptone 140	Pepton	Gibco BRL
Select Yeast Extract	Hefeextrakt	Gibco BRL
Silica Partikel (0,5 – 10 µm, 80% 1-5 µm)	Silica	Sigma
Streptomycin		Serva
Tetramethylethylenediamin	TEMED	Serva
Trinatriumphosphat	Na ₃ PO ₄	Merck
Tris Pufferan [®] Ultra Pure	Tris-base	Roth
Tris-Acetat	Tris-Ac	Roth
Trishydrochlorid Pufferan [®]	Tris-HCl	Roth
Triton X-100		Sigma
Tricin		ICN Biomed
Uranylacetat	UAc	Merck
Wolframpartikel M17	Wolfram	Biorad

2.1.2. Geräte

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte

Verwendete Laborgeräte und Typen	Hersteller
Auto Stripe Washer ELx50	Bio-Tek Instruments INC.
Autoklav SANOKlav	Wolf
Autoklav	Webeco
Elektronenmikroskop EM 109	Zeiss
Elektrophoresekammern Horizontal Midi	Harnischmacher
Elektrophoresekammern Mini 440000	Polymehr
ELISA-Blattsaftpresse	Meku-Pollaehne
ELISA-Photometer Microplate Reader 550	Bio-Rad
DsRed Filter AHF _{DsRed}	AHF Analysetechnik
Feinwaage Analytic 200 S Satorius	Satorius
Kamera Cosucor TL Intas	Intas
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss
Minizentrifuge mit Ausschwingrotor Minifuge 2	Heraeus
Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor RC 5 B plus	Sorval

2. Material und Methoden

Fortsetzung von Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte

Verwendete Laborgeräte und Typen	Hersteller
Magnetrührer MR 2000	Heidolph
Magnetrührer RH basic	IKA Labortechnik
Mixer 5432	Eppendorf
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Pipetten (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson
UV-Tische TVL 312 A	Spectroline
Partikelkanone	IPP Uni Hannover (nach Gray <i>et al.</i> , 1994)
Schüttelapparat 3013	GFL
Schüttler Certomat M	Braun Biotech
Schüttler mit Temperaturregelung Certomat R + H	Braun Biotech
Spannungsquelle E 714	Consort
Spülmaschine Desinfector G7735CD MCU	Miele
Sterile Werkbank Lamina Air HA 2448 GS	Heraeus
Thermoblock	Stuart Scientific
Template Tamer	QBiogene
Thermoblock Thermostat 5320 Eppendorf	Eppendorf
Thermocycler PTC 200	MJ Research
Thermocycler T3	Biometra
Thermoschränke H-Inkubator Pt 100	Biometra
Tischzentrifuge 113	Sigma
Tischzentrifuge miniSpin	Eppendorf
Tischzentrifuge mit Kühlung 4 K 10	Sigma

2.1.3. Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits

Tabelle 3: Zusammenstellung der Verbrauchsmaterialien und der Reaktionskits

Material	Hersteller oder Bezugsquelle
Deckgläser (18x26x0,13-0,17 mm)	Roth
ELISA-Mikrotiterplatte (#655061)	Greiner Bio-One
Fruhstorfer Erden Typ P	Industrie Erdwerke Archut
Grids für die Elektronenmikroskopie	Dr. Lesemann, BBA
Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm)	Schleicher und Schuell
Objektträger (76x26x1 mm)	Menzel-Gläser
Parafilm „M“ [®]	American National Can TM
PCR Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozyme
Petrischalen (Typ: 94/16)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen (0,3-2 µl)	Omnilab Laborzentrum
Pipettenspitzen (2-200 µl)	Greiner Bio-One, Sarstedt
Pipettenspitzen (200-1000 µl)	Greiner Bio-One, Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2,2 ml)	Greiner Bio-One, Sarstedt
Thermopapier	Mitsubishi
pGEM [®] -T Easy	Promega
Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAex TM II Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick-Clean-Kit	BIOLINE

2. Material und Methoden

2.1.4. Software

Tabelle 4: Eingesetzte Software mit Hersteller- und Versionsangabe

Software	Hersteller	Version
Vector NTI	Informax Inc.	Demoversion 7
ClustalX	Higgins, D.G. & Sharp, P.M.	1.8
GeneDoc	Nicholas KB & Nicholas HB (1997)	2.5.002
SeqMan	DNASar	4.05
SAS	SAS Institute	9.1 TS Level 1M2
ELISA Microplate Manager	BioRad	
Gel Dokumentation Intas GDS	Intas	2002
Chromas	Technelysium	2.21

2.1.5. Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Unter Zuhilfenahme der Software VectorNTI (siehe Tabelle 4) wurden Oligonukleotide für die Amplifikationen verschiedener Fragmente ausgewählt. Zum Teil wurden deren 5'-Enden durch Zusatzsequenzen verlängert. Deren Aufgabe bestand nicht nur darin für verschiedene Klonierungsschritte Erkennungssequenzen von Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) in den Primer zu integrieren, sondern auch der Optimierung und der Angleichung der GC-Gehalte zur Verbesserung der Anlagerungseigenschaften der Primerpaare.

Tabelle 5: PVY spezifische Sequenzierprimer

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
PVYS1	MWG	GGAGTTTGGGTTATGATGGA
PVY_1	MWG	TTCCAAAGTGCCTTTGAG
PVY_Sfseq	MWG	ACCGTGCTAAACTTAGAAC
PVY_Seq	MWG	AAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGC

Tabelle 6: PVY spezifische Primer

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
PVYCP _{low}	MWG	AGGGAAGCTTCTAGAGTCTCCTGATTGAAGT <i>XbaI</i>
PVYCP _{up}	MWG	AAGGATCCGCTTTCCTGAAATGATGG <i>BamHI</i>

Tabelle 7: PVX spezifische Primer

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
PXTGB1 _{up}	GibcoBRL	ACCATGGATATTCTCATCAGT
PXTGB1 _{low}	GibcoBRL	AGGATCCCTATGGCCCTGCGCGGAC
PXTGB2 _{up}	GibcoBRL	CCCATGGCCGCGCAGGGCCAT
PXTGB2 _{low}	GibcoBRL	GGGATCCCTAATGACTGCTATGATT
TGB2 _{up}	MWG	CCGGTCAATTCTGAAAAAGTGTACATAG
TGB2 _{low}	MWG	TGCTATGATTGTTACCACAAGCACA
PVX _s	MWG	TAATCAAGTCAGGGAGAGGCACTG
PVX _{as}	MWG	ACCTCGAGTGACAGCTGCATCTAG
PVX _{up}	GibcoBRL	GCTGCCGTTTTGCTACTG
PVX _{low}	GibcoBRL	TGTGGGCACCTTCATGTC

Tabelle 8: Klonierungsprimer für die Herstellung des PVM Vollängenklons

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
PVMSF _{as}	MWG	GCTCTAGAGCCTGGCAGCCTTAAGTACTTCATCAATTCCAG <i>XbaI</i> <i>AflIII</i>
PVM1 _s	GibcoBRL	ATGGCGCGCCGGATAAAACAAACATACAATA <i>AscI</i>
PVM3 _{as}	GibcoBRL	AATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTAAA- <i>XbaI</i> AATAGTAAAAACCAA
PVMSF2 _S	MWG	AGTACTTAAGGTTACCAAGTGATCTAATCGAGGATTACA <i>AflIII</i>

Die in den Primern enthaltenen Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen.

2. Material und Methoden

Tabelle 9: weitere PVM spezifische Primer

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
PVM3400as	MWG	TCTAACAACGCAGATTCGC
PVM2280	MWG	CAGCAAGGAGATTCAGATGA

Tabelle 10: Primer zur Sequenzierung des PVM Volllängenklons

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
PVM1	MWG	CACGTAGCTTGAATGAGTGG
PVM2	MWG	GCCAAATAATCGCTGAGCC
PVM3	MWG	GTAGGTACAGTCCCCTTAG
PVM4	MWG	GGTGCTTAACCAATGGAGC
PVM5	MWG	GTGCGTCTGAGTTACAGCA
PVM6	MWG	CTGAGCGATATAAGCGGGT
PVM7	MWG	AGAAAGCGATGCTGTGAGG
PVM8	MWG	GCGTGAGAAATTCGTGCGT
PVM9	MWG	GATAGATTGGTGCTGGGAG
PVM10	MWG	GTGCTTTGTGAATTGTAGCGG
PVM11	MWG	ACTCACTGACGATCACACC
PVM12	MWG	GGTTCAGGGTTGCTAAAGC
PVM13	MWG	CTGGCCAATATGTTATTCACC
PVM14	MWG	CACCTCATTCGCTCTGATG
PVM15	MWG	GTTCGGTGACCCCATACAA
PVM16	MWG	GTGTCCTGATGCCACTTAC
PVM17	MWG	GCTGTATTTGATCTCTCAGGG
PVM18	MWG	GGCGCAATTCGAGTGACAA
PVM19	MWG	GCTGAAACACTACGAAGGG
PVM20	MWG	GCGAGAGCTATGTGTACTTC
PVM01	MWG	AATTTGGACAGTGTGCAGGTGG
PVM_3_4	MWG	ACGCAAGATTGGAGCCCATG
PVM_4_5	MWG	TGAGCATCTGGATGGAGGTT

Fortsetzung Tabelle 10

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
SFM_6_5	MWG	TGTGGTTCATAGTGCTCCGA
SFM_1-0	MWG	CGGCTTCGCCTTTTGTATC
SFMO	MWG	TGTCCAGACCAACTCCTTTGTG
BSEQ01	MWG	TATCTCCACTGACGTAAGGG

Tabelle 11: Klonierungsprimer für die PVX/M Hüllproteinchimäre

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
PVMXCPup	MWG	AAATCTAGAGATTCAACGAAGAAAGCTGA <i>XbaI</i>
PVMXCPlow	MWG	AAACTCGAGTTCTATTCGACTTTCATAAT <i>XhoI</i>

Die in den Primern enthaltenen Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen und bezeichnet.

2. Material und Methoden

2.1.6. Restriktionsendonukleasen (Enzyme)

Bei den in Tabelle 12 aufgeführten Enzymen wurden die spezifischen Spaltungsstellen innerhalb der spezifischen Schnittsequenz durch „^“ gekennzeichnet.

Tabelle 12: verwendete Restriktionsendonukleasen (RE)

RE	spezifische Schnittsequenz	Hersteller und Puffer	RE	spezifische Schnittsequenz	Hersteller und Puffer
<i>Afl</i> III	5'-G [^] TTTAA G-3' 3'-CAA TTT [^] C-5'	NEB (NEB 2)	<i>EcoRV</i>	5'-G A T [^] A T C-3' 3'-C T A [^] T A G-5'	NEB (NEB 3)
<i>AscI</i>	5'-GG [^] CGCGCCC-3' 3'-CCGCGC [^] GG-5'	NEB (NEB 4)	<i>HincII</i>	5'-G T Y [^] R A C-3' 3'-C A R [^] Y T G-5'	MBI (MBI Y ⁺ Tango™)
<i>AvaI</i>	5'-C [^] Y C G R G-3' 3'-G R G C Y [^] C-5'	NEB (NEB 4)	<i>HindIII</i>	5'-A [^] A G C T T-3' 3'-T T C G A [^] A-5'	MBI (MBI R ⁺)
<i>BamHI</i>	5'-G [^] AGATCC-3' 3'-CCTAG [^] G-5'	MBI (MBI BamHI ⁺)	<i>MseI</i>	5'-T [^] TA A-3' 3'-A A T [^] T-5'	NEB (NEB 2)
<i>BsmI</i>	5'-G A A T G C N [^] -3' 3'-C T T A C [^] G N-5'	NEB (NEB 2)	<i>NheI</i>	5'-G [^] C T A G C-3' 3'-C G A T C [^] G-5'	MBI (MBI Y ⁺ Tango™)
<i>Bsp120I</i>	5'-G [^] AGGCC C-3' 3'-C C C G G [^] G-5'	MBI (MBI B ⁺)	<i>PstI</i>	5'-C T G C A [^] T-3' 3'-G [^] A C G T C-5'	MBI (MBI O ⁺)
<i>BsrGI</i>	5'-T [^] GTACA-3' 3'-A C A T G [^] T-5'	NEB (NEB 2)	<i>PvuII</i>	5'-C A G [^] C T G-3' 3'-G T C [^] G A C-5'	MBI (MBI G ⁺)
<i>Bst1107I</i>	5'-G T A [^] T A C-3' 3'-C A T [^] A T G-5'	MBI (MBI O ⁺)	<i>RsaI</i>	5'-G T [^] A C-3' 3'-C A [^] T G-5'	MBI (NEB 1)
<i>Bsu36I</i>	5'-C C [^] T N A G G-3' 3'-G G A N T [^] C C-5'	NEB NEB 3	<i>ScaI</i>	5'-A G T [^] A C T-3' 3'-T C A [^] T G A-5'	MBI (MBI ScaI)
<i>ClaI</i>	5'-A T [^] C G A T-3' 3'-T A G C [^] T A-5'	NEB (NEB 4)	<i>SpeI</i>	5'-A [^] C T A G T-3' 3'-T G A T C [^] A-5'	NEB (NEB 2)
<i>DdeI</i>	5'-C [^] T N A G-3' 3'-G A N T [^] C-5'	NEB (NEB 3)	<i>XbaI</i>	5'-T [^] C T A G A-3' 3'-A G A T C [^] T-5'	MBI (MBI Y ⁺ Tango™)
<i>Eam1105I</i>	5'-G A C N N N [^] N N G T C-3' 3'-C T G N N [^] N N N C A G-5'	MBI (Eam1105 I)	<i>XhoI</i>	5'-C [^] T C G A G-3' 3'-G A G C T [^] C-5'	MBI (MBI R ⁺)
<i>EcoRI</i>	5'-G [^] A A T T C-3' 3'-C T T A A [^] G-5'	MBI (MBI O ⁺)			

Legende: MBI= MBI-Fermentas; NEB= New England Biolabs; die Zusammensetzung der Puffer sind unter (2.2.9) beschrieben.

2.1.7. DNA/RNA/Protein -modifizierende Enzyme

Tabelle 13: Nukleinsäure- oder proteinmodifizierende Enzyme mit Konzentrations- und Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkungen
Taq DNA Polymerase	Promega, Peqlab	5'→3' Polymeraseaktivität in Mg ²⁺ haltiger Lösung, 3'-Tailing mit Einzelnukleotiden, 5 U/μl
IPP-Taq (nach Pluthero (1993) hergestellt)	IPP	5'→3' Polymeraseaktivität in Mg ²⁺ haltiger Lösung, U/μl nicht bestimmt.
Pfu DNA Polymerase	Promega	5'→3' Polymeraseaktivität, 3'→5' Exonukleaseaktivität (<i>proofreading</i>), 2-3 U/μl
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes	5'→3' Polymeraseaktivität, 3'→5' Exonukleaseaktivität (<i>proofreading</i>), 2 U/μl Fehlerrate im HF-Puffer: 4,4x10 ⁻⁷
AMV-Reverse Transkriptase	Promega	cDNA-Synthese, 10U/μl
AMV-Reverse Transkriptase	Finnzymes	cDNA-Synthese, 20 U/μl (unverdünnt), 2,5 U/μl als Arbeitslösung (1:50 verdünnt in Taq-Verdünnungspuffer)
Expand Reverse Transcriptase	Roche	cDNA-Synthese (50 U/μl)
Klenow Fragment	MBI Fermentas	Großes Fragment der DNA Polymerase I aus <i>E. coli.</i> , das die 5'=>3' Polymeraseaktivität und die 3'=>5' Exonukleaseaktivität, aber keine 5'=>3' Exonukleaseaktivität besitzt. 10 U/μl
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas	Katalysiert in Abhängigkeit von ATP die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen benachbarten 5'Phosphat und 3'-Hydroxylenden in einer DNA oder RNA mit glatten oder kohäsiven Enden. 5 WeissU/μl
T4 Ligase	Promega	Katalysiert in Abhängigkeit von ATP die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen benachbarten 5'Phosphat und 3'-Hydroxylenden in einer DNA oder RNA mit glatten oder kohäsiven Enden. 3 WeissU/μl
RNase Inhibitor	Roche	40 U/μl

2. Material und Methoden

2.1.8. Verwendete Antiseren

Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten Antikörper (IgG) und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkungen
PVM-IgG / PVM-IgG-AP	LOEWE Biochemica	Polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS-ELISA Set
PVY-IgG/ PVY-IgG-AP	LOEWE Biochemica	Polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS-ELISA Set
PVS-IgG / PVS-IgG-AP	LOEWE Biochemica	Polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS-ELISA Set
PVX-IgG / PVX-IgG-AP	LOEWE Biochemica	Polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS-ELISA Set
PLRV-IgG / PLRV-IgG-AP	LOEWE Biochemica	Polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS-ELISA Set
Goat-Anti-Rabbit-IgG-AP	Sigma-Aldrich	Anti-Rabbit-IgG AP-konjugierter Antikörper ex goat

Legende: AP = konjugiert mit alkalischer Phosphatase

2.1.9. Plasmide und Nukleinsäuren

Tabelle 15: Verwendete Plasmide und Nukleinsäuren mit Referenzangaben

Bezeichnung	Hersteller/Referenz	Antibiotikaresistenz
pBluescript II KS(+)	Stratagene	Ampicillin
pGEM [®] -T	Promega	Ampicillin
pLITMUS38i	NEB	Ampicillin
pBIN_SN (Bin19 Derivat)	Prof. E. Maiß	Kanamycin
pe35S_Ribo	Prof. E. Maiß	Ampicillin
pBC-T	Prof. E. Maiß	Chloramphenicol
λ-Phagen DNA	MBI Fermentas	

2.1.10. Verwendete Marker

Tabelle 16: Übersicht über die verschiedenen Marker

Marker	Markerart	Hersteller/Referenz
Lambda- <i>Pst</i> I	DNA-Marker	Eigene Herstellung (siehe 2.3.5.4)
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Protein-Marker	MBI Fermentas (#SM0441)

2.1.11. Infektiöse Vollängenklone

Tabelle 17: verwendete PVX Vollängenklone

Plasmid	interne Bezeichnung	Hersteller/Referenz	Antibiotikaresistenz
pPVX0014	PVX1	Prof. E. Maiß	Ampicillin
pPVX-DsRed	PVX2	Prof. E. Maiß	Ampicillin

2.1.12. Bakterienstämme

Tabelle 18: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkung	Hintergrund
K12 NM522	Pharmacia	Transformationsbakterienstamm	<i>E. coli</i>
LBA4404	(Hoekema <i>et al.</i> , 1983)	Agrobakterienstamm, Helferplasmid pAL4404	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

2. Material und Methoden

2.1.13. Pflanzenmaterial

2.1.13.1. Test- und Erhaltungspflanzen für die unterschiedlichen Viren

Pflanzen verschiedener Arten (siehe Tabelle 19) dienten nach mechanischer Virusübertragung (siehe 2.3.15) dem Erhalt der unterschiedlichen Viren, oder wurden als Positivkontrollen für die serologischen Untersuchungen (vergleiche Punkt 2.3.4) verwendet.

Tabelle 19: Test- und Erhaltungspflanzen für die verschiedenen Pflanzenviren

Pflanze	Erhaltungs- oder Testpflanze für
<i>Dianthus barbatus</i>	PVM
<i>Dianthus caryophyllus</i>	PVM
<i>Nicotiana benthamiana</i>	PVY, PVX, PVM
<i>Nicotiana debneyi</i>	PVM
<i>Nicotiana glauca</i>	PVM, PVX
<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	PVM
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Oldenwalder Blaue	PVS, PVM, PVX
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Jubel	PLRV

2.1.13.2. Transgene *N. benthamiana* - Linien

Tabelle 20: Transgene *N. benthamiana* -Tabaklinien und ihre Herkünfte

Bezeichnung	Insert	Herkunft / Referenz
118	PVX-TGB2	Universität Hannover, BBA Braunschweig; Dr. R. Götz
1/23	PVX-TGB1	BBA Braunschweig, Frau Dr. U. Manske (Manske und Schiemann, 2005)

Legende: PVX = *Potato virus X*; TGB= Triple gene Block

2.1.13.3. Pflanzenmaterial der Freisetzungen

Während die Knollen der konventionellen Vergleichssorten (siehe Tabelle 21) als herkömmlich erzeugte Pflanzkartoffeln über den Handel für die Freisetzungen bezogen wurden, produzierte das Max - Planck - Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm jährlich für die kommende Freisetzung sowohl die Knollen der sechs transgenen Varianten als auch die der nicht transformierten Ausgangsvariante (Désirée WT1). Dazu wurden die aus Gewebekulturen stammenden Mutterpflanzen der Varianten 1-7 der Kartoffelsorte Désirée in Foliengewächshäusern weiter kultiviert. Die an ihnen neu gebildeten Knollen fanden als Pflanzgut für die Freisetzungen 2001-2004 Verwendung.

Tabelle 21: Kartoffelvarianten der Freisetzungen 2001-2004

Bezeichnung	Variante	Besonderheit	Referenz / Herkunft
V1	Désirée SST#18	transgen (E)	Max-Planck Institut für molekulare Züchtungsforschung in Golm (Hellwege <i>et al.</i> , 2000)
V2	Désirée SST#36	transgen (E)	
V3	Désirée SST#20	transgen (E)	
V4	Désirée SST/FFT#22/19	transgen (D)	
V5	Désirée SST/FFT#22/30	transgen (D)	
V6	Désirée SST/FFT#22/34	transgen (D)	
V7	Désirée WT 1	nicht-transgen	
V8	Désirée WT 2	nicht-transgen	Handel
V9	Granola	nicht-transgen	
V10	Agria	nicht-transgen	
V11	Linda	nicht-transgen	
V12	Solara	nicht-transgen	

Legende: V= Variante; E= Einfachtransformante; D= Doppeltransformante; SST= sucrose:sucrose-1-fructosyltransferase; FFT = fructose: fructose 1 fructosyltransferase (vergleiche Punkt 1.2)
 Die nicht-transgenen Varianten wurden grau unterlegt.

2. Material und Methoden

2.1.14. Verwendete Virusisolate und ihre Herkünfte

Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Virusisolate und deren Herkünfte

Virusisolat	Herkunft	Bemerkungen
PVM	DSMZ Nr. PV0273	
PVY	virusinfizierte Kartoffeln	keine Sequenzinformationen verfügbar
PVS	virusinfizierte Kartoffeln	keine Sequenzinformationen verfügbar
PVX	pPVX0014	siehe Tabelle 17
PLRV	virusinfizierte Kartoffeln	keine Sequenzinformationen verfügbar
PVY	BBA Braunschweig (Frau Dr. Lindner)	ELISA – Presssaftproben (0,2 g Blattmaterial zermörsert in 2 ml PBS-TPO) keine Sequenzinformationen verfügbar

2.1.15. Zuordnung der Datenbanksequenzen verschiedener Viren des Genus *Carlavirus*

Tabelle 23: Übersicht über verwendete Carlavirussequenzen aus der Datenbank (GenBank)

Bezeichnung	GenBank Eintragung	Virus und nähere Beschreibung
PVM-1	AJ437481	<i>Potato virus M</i> (PVM); China; Isolat Hangzhou, von <i>Solanum muricatum</i>
PVM-2	AY311395	<i>Potato virus M</i> (PVM); Polen; "mildes PVM-Isolat", Isolat „M57“
PVM-3	AY311394	<i>Potato virus M</i> (PVM); Polen; "starkes Isolat", Isolat "Uran"
PVM-4	NC_001361	<i>Potato virus M</i> (PVM); Ehem. USSR; Stamm "Russian Wild"
PVM-5	X57440	<i>Potato virus M</i> (PVM); Isolat „Deutsches Isolat“
PVM-6	AY692075	<i>Potato virus M</i> (PVM); Polen; von Tomate <i>S. lycopersicon</i>
PVM-7	X85114	<i>Potato virus M</i> (PVM); Italien; Stamm "Tomato"
PVM-8	AF023877	<i>Potato virus M</i> (PVM); USA; Stamm "Idaho"
PVM-9	DQ000230	<i>Potato virus M</i> (PVM); Tschechien
HpLV	NC_002552	<i>Hop latent virus</i> (HpLV)

Fortsetzung von Tabelle 23		
AcoLV	NC_002795	<i>Aconitum latent virus</i> (AcoLV) Isolat: D
DVS	AJ620300	<i>Daphne virus S</i> (DVS) Stamm: KT
PopMV-1	NC_005343	<i>Poplar mosaic virus</i> (PopMV) Isolat: PV-0341
PopMV-2	X65102	<i>Poplar mosaic virus</i> (PopMV) Isolat: ATCC PV275
LiSV	NC_005138	<i>Lily symptomless virus</i> (LiSV) Isolat: Sb
BIscV	NC_003499	<i>Blueberry scorch virus</i> (BIscV) Stamm: NJ-2
SPCFV	NC_006550	<i>Sweet potato chlorotic fleck virus</i> (SPCFV)
VeLV	AF271218	<i>Verbena latent virus</i> (VeLV)
KLV-1	AJ293571	<i>Kalanchoe latent virus</i> (KLV) Isolat: PV-0290
KLV-2	AJ293570	<i>Kalanchoe latent virus</i> (KLV) Isolat: 1452
PVS	Y15625	<i>Potato virus S</i> (PVS)
NCLV-1	AJ311376	<i>Narcissus common latent virus</i> (NCLV) Isolat: Zhangzhou
NCLV-2	AJ311375	<i>Narcissus common latent virus</i> (NCLV) Isolat: Chongming Island

2.2. Puffer und Lösungen

2.2.1. Gibberellinsäurelösungen zur Aufhebung der Keimruhe

2.2.1.1. Gibberellinsäurestammlösung

1 g GA₃ in 10 ml EtOH_(96%) lösen
ad 1 Liter mit A. dest.

2.2.1.2. Gibberellinsäurebad

3 ml Gibberellinsäurestammlösung
ad 1 Liter mit A. dest.

2. Material und Methoden

2.2.2. Abreibepuffer zur Virenübertragung

2.2.2.1. Inokulationspuffer (pH 7,0)

0,03 M HEPES

2.2.2.2. 0,1 M K/Na-Phosphatpuffer (pH 7,0)

61,2 ml Na₂HPO₄*2H₂O (500 mM)

38,8 ml KH₂PO₄ (500 mM)

ad 500 ml mit *A. bidest.*

2.2.3. Lösungen für die Agarosegelelektrophorese (modifiziert nach Sambrook und Russel, 2001):

2.2.3.1. Elektrophorese-Puffer (1x TAE)

40 mM Tris-Acetat

20 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

Den pH-Wert auf 8,4 mit Essigsäure einstellen.

2.2.3.2. Agarosegele

0,8 -1,5% Agarose

0,15 µg/ml Ethidiumbromid

1x TAE (2.2.3.1) ad Endvolumen

2.2.3.3. Ethidiumbromidlösung zum Nachfärben der Gele

0.5 ‰ (v/v) Ethidiumbromid

2.2.3.4. Gel-Ladepuffer

0,41 % (w/v)	Bromphenolblau
34,4 % (v/v)	Glycerin
65,6 % (v/v)	<i>A. bidest.</i>

2.2.4. Puffer für die DNA Extraktion (nach Edwards *et al.* 1991)

2.2.4.1. DNA Extraktionspuffer (pH 7,5)

0,2 M	Tris-HCl
0,25 M	NaCl
25 mM	EDTA
0,5 %	SDS

2.2.5. Puffer für die Lagerung von DNA bzw. RNA

2.2.5.1. TE-Puffer (10/0,1) (pH 8,0)

10 mM	Tris-HCl
0,1 mM	EDTA

2.2.5.2. RNase-TE (10/01) (pH 8,0)

0,1 mg RNase	(75 U/mg)
gelöst in 10 ml TE (10/0,1)	(2.2.5.1)

2. Material und Methoden

2.2.5.3. EB-Puffer (pH 8,5)

10 mM Tris-HCl

2.2.6. Puffer für die Silica RNA-Extraktionsmethode

2.2.6.1. Silica-Extraktionspuffer (pH 7,5)

6 M G-HCl
0,2 M NaAc
25 mM EDTA
1 M KAc
2,5 % PVP-K25

2.2.6.2. NaI-Lösung

6 M NaI
0,15 M Na₂SO₃

2.2.6.3. Silicasuspension (pH 2,0)

1 g Silica/ml *A. bidest.*

Nach dem Suspendieren der Partikel in *A. bidest.* wurde der pH-Wert mit HCl auf 2,0 eingestellt, und anschließend die Suspension in Aliquots lichtgeschützt gelagert.

2.2.6.4. Waschpuffer (pH 7,5)

10 mM Tris-HCl
0,05 mM EDTA
50 % EtOH_(abs.)

2.2.7. Puffer der DNA/RNA/Protein -modifizierenden Enzyme

2.2.7.1. *Taq*-Verdünnungspuffer (pH 8)

100 mM	KCl
20 mM	Tris-HCl
0,2 mM	EDTA
55 % (v/v)	wasserfreies Glycerin
0,5 % (v/v)	Tween [®] 20
0,5 % (v/v)	NONIDET [®] P40
250 µg/ml	Gelatine

2.2.7.2. 10x Ligationspuffer (pH 7,8) (MBI)

0,4 M	Tris-HCl
0,1 M	MgCl ₂
0,1 M	DTT
5 mM	ATP

2.2.7.3. 2x Rapid - Ligation Puffer (pH7,8) (Promega)

60 mM	Tris-HCl
20 mM	MgCl ₂
20 mM	DTT
2 mM	ATP
10 % (w/v)	PEG

2.2.7.4. 10x Klenow Puffer (pH 8,0, MBI)

500 mM	Tris-HCl
50 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT

2. Material und Methoden

2.2.7.5. 10x PCR Puffer (pH 8,8)

0,1 M	Tris-HCl
0,5 M	KCl
0,8 % (v/v)	NONIDET® P40

2.2.7.6. 5x RT Puffer (pH 8,3; Roche)

250 mM	Tris-HCl
200 mM	KCl
25 mM	MgCl ₂
2,5% (v/v)	Tween® 20

2.2.7.7. 10x PCR-Puffer (pH 9,9; Promega)

100 mM	Tris-HCl
500 mM	KCl
1% (v/v)	Triton®-100

2.2.8. Puffer und Lösungen für die Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

2.2.8.1. Magnesiumlösung

1 M	MgCl ₂
1 M	MgSO ₄

2.2.8.2. Transformationspuffer (pH 6,2)

0,1 M	RbCl
45 mM	MnCl ₂
10 mM	CaCl ₂
10 mM	MES (mit 10 M KOH auf pH 6,3 eingestellt)
3 mM	HaCoCl ₃

2.2.8.3.	DND-Lösung (pH 7,5)
153 mg/ml	DTT
90 % (v/v)	DMSO
1 % (v/v)	1M Kac

2.2.9. Zusammensetzungen der verwendeten Restriktionsenzympuffer

2.2.9.1.	MBI B⁺ (pH 7,5)	2.2.9.2.	MBI G⁺ (pH 7,5)
	10 mM Tris-HCl		10 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂		10 mM MgCl ₂
	0,1 mg/ml BSA		50 mM NaCl
			0,1 mg/ml BSA
2.2.9.3.	MBI O⁺ (pH 7,5)	2.2.9.4.	MBI R⁺ (pH 8,5)
	50 mM Tris-HCl		10 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂		10 mM MgCl ₂
	100 mM NaCl		100 mM KCl
	0,1 mg/ml BSA		0,1 mg/ml BSA
2.2.9.5.	MBI Y^{+/Tango}™ (pH 7,9)	2.2.9.6.	MBI BamHI⁺ (pH 8,0)
	33 mM Tris-Acetat		10 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂		5 mM MgCl ₂
	100 mM KCl		100 mM KCl
	0,1 mg/ml BSA		0,02 % Triton X-100
			0,1 mg/ml BSA

2. Material und Methoden

2.2.9.7.	MBI <i>Eco</i>RI (pH 7,5)	2.2.9.8.	MBI <i>Eam</i>115I (pH 7,5)
	50 mM Tris-HCl		10 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂		5 mM MgCl ₂
	100 mM NaCl		100 mM NaCl
	0,02 % Triton X-100		0,1 mg/ml BSA
	0,1 mg/ml BSA		
2.2.9.9.	MBI <i>Sca</i>I (pH6,5)	2.2.9.10.	NEB 1 (pH 7,0)
	10 mM Bis-Tris-Propan HCl		10 mM Bis-Tris-Propan HCl
	10 mM MgCl ₂		10 mM MgCl ₂
	100 mM KCl		1 mM DTT
	0,1 mg/ml BSA		
2.2.9.11.	NEB 2 (pH 7,9)	2.2.9.12.	NEB 3 (pH 7,9)
	10 mM Tris-HCl		0,1 M NaCl
	10 mM MgCl ₂		50 mM Tris-HCl
	50 mM NaCl		10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT		1 mM DTT
2.2.9.13.	NEB 4 (pH 7,9)		
	20 mM Tris-Acetat		
	10 mM MgAc		
	50 mM KAc		
	1 mM DTT		

2.2.10. Puffer und Lösungen für die Isolierung rekombinanter Plasmid - DNA (Minipräparation)

2.2.10.1.	Lösung A (pH 8)	2.2.10.2.	Lösung B
	15 mM Tris-HCl		0,2 M NaOH
	10 mM EDTA		1 % (w/v) SDS
	50 mM Glucose		

2.2.10.3. Lösung C (pH 5,2)

3 M NaAc

Den pH-Wert mit Eisessig einstellen.

2.2.10.4. Lösung D

10 ml Lösung D1 mit 10 ml Lösung D2 mischen, und auf 100 ml mit *A. bidest.* auffüllen

Lösung D1(pH 8): 0,5 M Tris-HCl

Lösung D2 (pH 7): 1 M NaAc

2.2.11. Puffer für die serologischen Untersuchungen (ELISA und TPIA)

2.2.11.1. Coating Buffer

1,59 g/l. Na₂CO₃

2,93 g/l. NaHCO₃

Den pH-Wert auf 9,6 einstellen und autoklavieren.

2. Material und Methoden

2.2.11.2. 10x PBS- Stammlösung

1,37 M	NaCl
0,08 M	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
0,0147 M	KH ₂ PO ₄
0,027 M	KCl

Auf pH 7,3 einstellen und autoklavieren.

2.2.11.3. 1x PBS (pH 7,3)

1:10 (v/v) Verdünnung der 10xPBS-Stammlösung (siehe 2.2.11.2) mit entionisiertem Wasser.

2.2.11.4. PBS-T (pH7,3)

1x PBS	(siehe 2.2.11.3)
0,05 % (v/v) TWEEN® 20	

2.2.11.5. PBS-TPO (pH 7,3)

1x PBS	(siehe 2.2.11.3)
2 % (w/v)	PVP K25
0,2 % (w/v)	Albumin

2.2.11.6. Blockierlösung (PBS-O; pH 7,3)

0,2 % (w/v) Albumin in 1x PBS (siehe 2.2.11.3)

2.2.11.7. Antikörperlösung

Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase [1:400 (v/v) verdünnt in PBS-TPO (siehe 2.2.11.5)]

2.2.11.8. ELISA-Substratpuffer (pH 9,6) (Angaben bezogen auf 1Liter)

97 ml	Diethanolamin
0,2 g	MgCl ₂ x6H ₂ O
1 mg/ml	4-Nitrophenyl Phosphat di-Na-Salz

2.2.11.9. Fast-Red Lösung (pH 8,0)

0,2 M	Tris-HCl
2 mM	MgCl ₂

2.2.11.10. Farbsubstrat (TPIA)

3 mg Naphtol AS in 7,5 ml *A. bidest.* lösen und gut mischen. 45 mg Fast-Red in 7,5 ml Fast-Red-Lösung (2.2.11.9) lösen und ebenfalls gut mischen. Beide Lösungen werden kurz vor Gebrauch getrennt hergestellt und anschließend sorgfältig vermischt.

2.2.12. Puffer für die SDS Gelelektrophorese und den Western - Blot

2.2.12.1. Berger-Puffer

750 mM	Tris-base (pH 8,8)
4 % (w/v)	SDS
4 % (w/v)	2-Mercaptoethanol
40 % (w/v)	Saccharose

2. Material und Methoden

2.2.12.2. 2x Probenpuffer

100 mM	Tris-HCl (pH 6,5)
4 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glyzerin
200 mM	DTT
0,2 % (w/v)	Bromphenolblau

2.2.12.3. Tricin-SDS-Polyacrylamid (PAA) Trenngel (15%)

10 ml	Acrylamid (37,5:1; 30%)
6,7 ml	Tricin-Gelpuffer (2.2.12.4)
2,3 ml	Glycerin (100%)
0,9 ml	<i>A. bidest.</i>
100 µl	Ammoniumpersulfat (10%)
10 µl	TEMED

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

2.2.12.4. Tricin-Gelpuffer (pH 8,45)

3 M	Tris-base
0,3 % (w/v)	SDS

ad gewünschtes Volumen mit *A. bidest*

2.2.12.5. Tricin-SDS-Polyacrylamid (PAA) Sammelgel (4%)

1,1 ml Acrylamid (37,5:1, 30%)

2,1 ml Tricin-Gelpuffer (2.2.12.4)

4,8 ml *A. bidest.*

66,7 µl Ammoniumpersulfat (10%)

6,7 µl TEMED

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

2.2.12.6. Kathodenpuffer (pH 8,25)

0,1 M Tris-base

0,1 M Tricin

0,1 % (w/v) SDS

ad gewünschtes Volumen mit *A. bidest.*

2.2.12.7. Anodenpuffer (pH 8,9)

0,2 M Tris-base

ad gewünschtes Volumen mit *A. bidest.*

2.2.12.8. Blotting-Puffer

200 ml 10x CAPS Puffer

400 ml Methanol

ad 2 Liter mit *A. bidest.*

2. Material und Methoden

2.2.13. Puffer für die Agroinfiltration

2.2.13.1. Inokulationspuffer für die Agroinfiltration

10 mM MgCl₂
10 mM MES
100 µM Acetosyringon
A. bidest. ad gewünschtes Volumen

2.2.14. Medien und Medienzusätze

2.2.14.1. Selektivmedienzusammensetzung (Feste Medien)

2.2.14.1.1. Lauria-Bertoni Medium (LB-Medium)

(modifiziert nach Sambrook und Russel, 2001).

15 g Select Agar
10 g Select Peptone 140
5 g Select Yeast Extract
10 g NaCl

In 1000 ml *A. dest.* lösen, auf pH 7,5 einstellen und anschließend autoklavieren.

2.2.14.1.2. LB-AP-Medium

1000 ml ca. 50°C warmes LB-Medium (siehe 2.2.14.1.1)
150 mg Ampicillin/ml *A. bidest.*

2.2.14.1.3.

LB-AIX-Medium

1000 ml ca. 50°C warmes LB-Medium (siehe 2.2.14.1.1)
150 mg Ampicillin/ml *A. bidest.*
40 mg X-Gal/ml DMF
46 mg IPTG/ml *A. bidest.*

2.2.14.1.4.

LB-Kn-Medium

1000 ml ca. 50°C warmes LB-Medium (siehe 2.2.14.1.2)
50 mg Kanamycin/ml *A. bidest.*

2.2.14.1.5.

LB-CIX-Medium

1000 ml ca. 50°C warmes LB-Medium (siehe 2.2.14.1.1)
150 mg Chloramphenicol/ml EtOH_(abs.)
40 mg X-Gal/ml DMF
46 mg IPTG/ml *A. bidest.*

2.2.14.1.6.

LBA-Medium

15 g/l	Agar
10 g/l	Select Peptone 140
5 g/l	Select Yeast Extract
5 g/l	NaCl
5 g/l	MgSO ₄

Autoklavieren und zu den 1000 ml ca. 50°C warmen Medium

50 mg Rifampicin/ml Methanol
25 mg Streptomycin/ml *A. bidest.*
hinzufügen.

2. Material und Methoden

2.2.14.2. Flüssigmedien

2.2.14.2.1. LB- Flüssigmedium

10 g Select Peptone 140

5 g Yeast Extract

10 g NaCl

In 1000 ml *A. dest.* lösen, auf pH 7,5 einstellen und anschließend autoklavieren.

2.2.14.2.2. LB-AP-Flüssigmedium

1000 ml ca. 50°C warmes LB-Flüssigmedium (siehe 2.2.14.2.1)

150 mg Ampicillin/ml *A. bidest.*

2.2.14.2.3. LB-Kn-Flüssigmedium

1000 ml ca. 50°C warmes LB-Flüssigmedium (siehe 2.2.14.2.1)

50 mg Kanamycin /ml *A. bidest.*

2.2.14.2.4. LB-CAM-Flüssigmedium

1000 ml ca. 50°C warmes LB-Flüssigmedium (siehe 2.2.14.2.1)

150 mg Chloramphenicol/ml EtOH_(abs.)

2.2.14.2.5. LBA-Flüssigmedium

10 g/l Select Peptone 140

5 g/l Select Yeast Extract

5 g/l NaCl

5 g/l MgSO₄

Autoklavieren und zu den 1000 ml ca. 50°C warmen Medium

50 mg Rifampicin/ml *A. bidest.*

25 mg Streptomycin/ml *A. bidest.* hinzufügen.

2.2.14.2.6.

SOB-Flüssigmedium

10 g	Select Peptone 140
5 g	Yeast Extract
584 mg	NaCl
186 mg	KCl

In 1000 ml *A. dest.* lösen, auf pH 6-7 einstellen und autoklavieren.

2.2.14.2.7.

SOC-Flüssigmedium

1 ml	2M Glucose
1 ml	2M MgCl ₂

Mit SOB-Medium auf 100 ml auffüllen.

2.3. Methoden

2.3.1. Anzucht und Kultur von Versuchspflanzen

2.3.1.1. Anzucht und Kultur von Pflanzen im Gewächshaus

In die mit feuchter Fruhstorfer Erde (Typ P) befüllten 12er Töpfe wurden die Samen der verwendeten Pflanzen (siehe Tabelle 19 und Tabelle 20) gesät. Die Töpfe wurden bis zur Keimung der Samen mit umgedrehten Bodenschalen von Petrischalen bedeckt und ins Gewächshaus gestellt. Hatten die Keimlinge eine pikierfähige Größe erreicht, wurden sie in 10-er Plastiktöpfe im gleichen Substrat vereinzelt. Die Kultur der Pflanzen erfolgte bei 20°C/22°C Heizungs-/Lüftungstemperatur und mindestens 5 klx (Assimilationszusatzbelichtung) zwischen 6 h und 22 h. Wöchentlich wurde einmal mit 0,02 %-igem Blattdünger (22+4+6 mit Spurennährstoffen) gedüngt.

2. Material und Methoden

2.3.2. Herstellung von Augenstecklingen aus Kartoffelknollen und Überwindung der natürlichen Keimruhe durch Gibberellinsäurebehandlung

Um die natürliche monatelange Keimruhe frisch geernteter Kartoffelknollen zu brechen, wurde zunächst aus jeder Knolle ein sogenannter „Augensteckling“ hergestellt. Dazu wurde aus dem Knollenende, an dem sich die Knospen („Augen“) befanden, mit einem sterilen Messer ein spitz zulaufender Kegel herausgeschnitten. Diese wurden für eine halbe Stunde in ein lauwarmes Gibberellinsäurebad (siehe 2.2.1.2) getaucht und anschließend über Nacht bei RT getrocknet. Am nächsten Tag wurden die so behandelten Stecklinge in mit feuchte P-Erde gefüllte 10-er Plastiktöpfe gedrückt, so dass die leicht verkorkten Schnittflächen Kontakt zum Substrat aufwiesen. Die Weiterkultur erfolgte im Gewächshaus, und nach ca. 14 Tagen entwickelten sich die ersten Sprosse aus den Knollen.

2.3.3. Freisetzungen der transgenen und nicht-transgenen Kartoffeln

2.3.3.1. Ort der Freisetzungen

Die Freisetzungen sowohl der transgenen Kartoffelvarianten der Sorte Désirée (siehe Tabelle 21), als auch der nicht-transgenen Vergleichssorten (Désirée, Granola, Agria, Linda und Solara) fanden in den Jahren 2001 bis 2004 auf dem Gelände der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) - Kleinmachnow im brandenburgischen Dahnsdorf statt. Die Auspflanzungen, Kultur und Ernte der verschiedenen Kartoffelpflanzen wurden von Mitarbeitern der BBA-Kleinmachnow durchgeführt. Entsprechend der geographischen Lage des „Hohen Flämings“ herrschte auf dem Versuchsgelände ein schwach lehmiger Sandboden vor. Je nach Witterung wurden die Knollen der verschiedenen Varianten Anfang April nach den Vorgaben der jeweiligen Anbaupläne ausgepflanzt. Die Ernte erfolgte im September.

2.3.3.2. Anbaupläne der Freisetzungen 2001 - 2004

Die Pflanzpläne der vier Freisetzungen wurden nach den Vorgaben einer Blockanlage entwickelt. Dazu wurde das gesamte Freisetzungsgelände in vier Blöcke (A bis D) mit jeweils drei Abschnitten unterteilt. Jedes dieser Teilstücke besaß eine Größe von 36 x 20 Metern, und aufgrund der jährlich wechselnden Fruchtfolge wurden immer zwei Abschnitte eines Blockes mit Getreide, und der dritte mit den 12 Kartoffelvarianten bepflanzt. Die Kartoffeln wurden in den jeweiligen Teilstücken der vier Blöcke in Reihen gepflanzt, deren Abstand zueinander 0,75 Meter betrug. Innerhalb einer Reihe waren die Knollen 0,33 Meter voneinander entfernt. Jeweils 96 Knollen pro Kartoffelvariante wurden in einer Parzelle (4 m x 6 m) innerhalb eines Abschnittes ausgepflanzt, welches acht Reihen zu je 12 Knollen entsprach. Nebeneinander liegende Parzellen wurden voneinander durch vier Reihen, und Parzellen innerhalb derselben Reihen durch jeweils 6 Knollen einer konventionellen Vergleichssorte (Zwischenbepflanzung) voneinander getrennt. Als Zwischenbepflanzungen wurden nur bei der Freisetzung 2001 Kartoffeln der Sorte Désirée verwendet, während es sich bei allen anderen Freisetzungen um Kartoffeln der Sorte Granola handelte. Die Anbaupläne der vier Freisetzungen sind in Abb. 7 und Abb. 8 schematisch dargestellt.

2. Material und Methoden

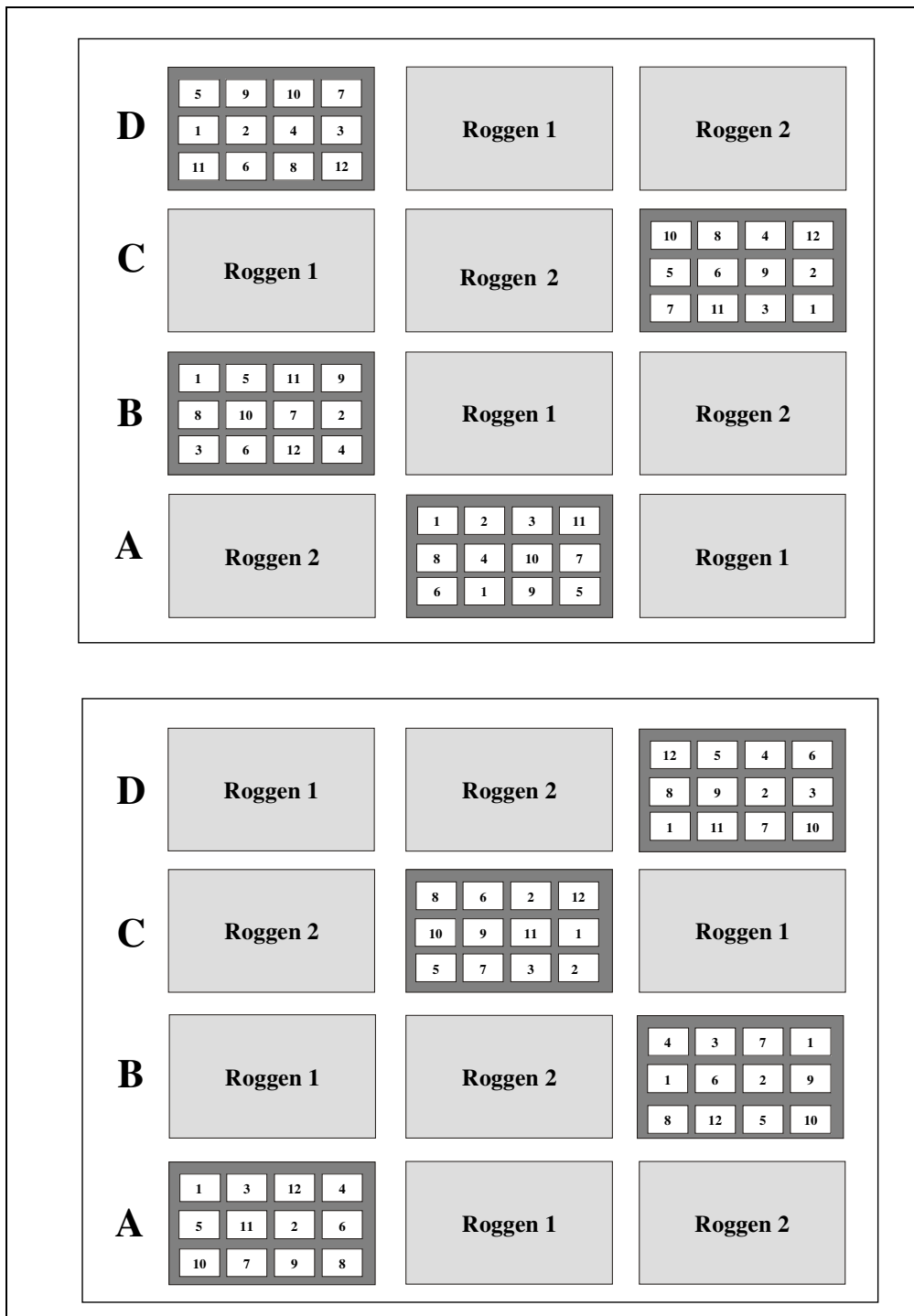


Abb. 7: Schematische Darstellungen der Anbaupläne der Freisetzungen 2001 (oben) und 2002 (unten)

Legende: 1-12 = Kartoffelvarianten 1-12 (siehe Tabelle 21)

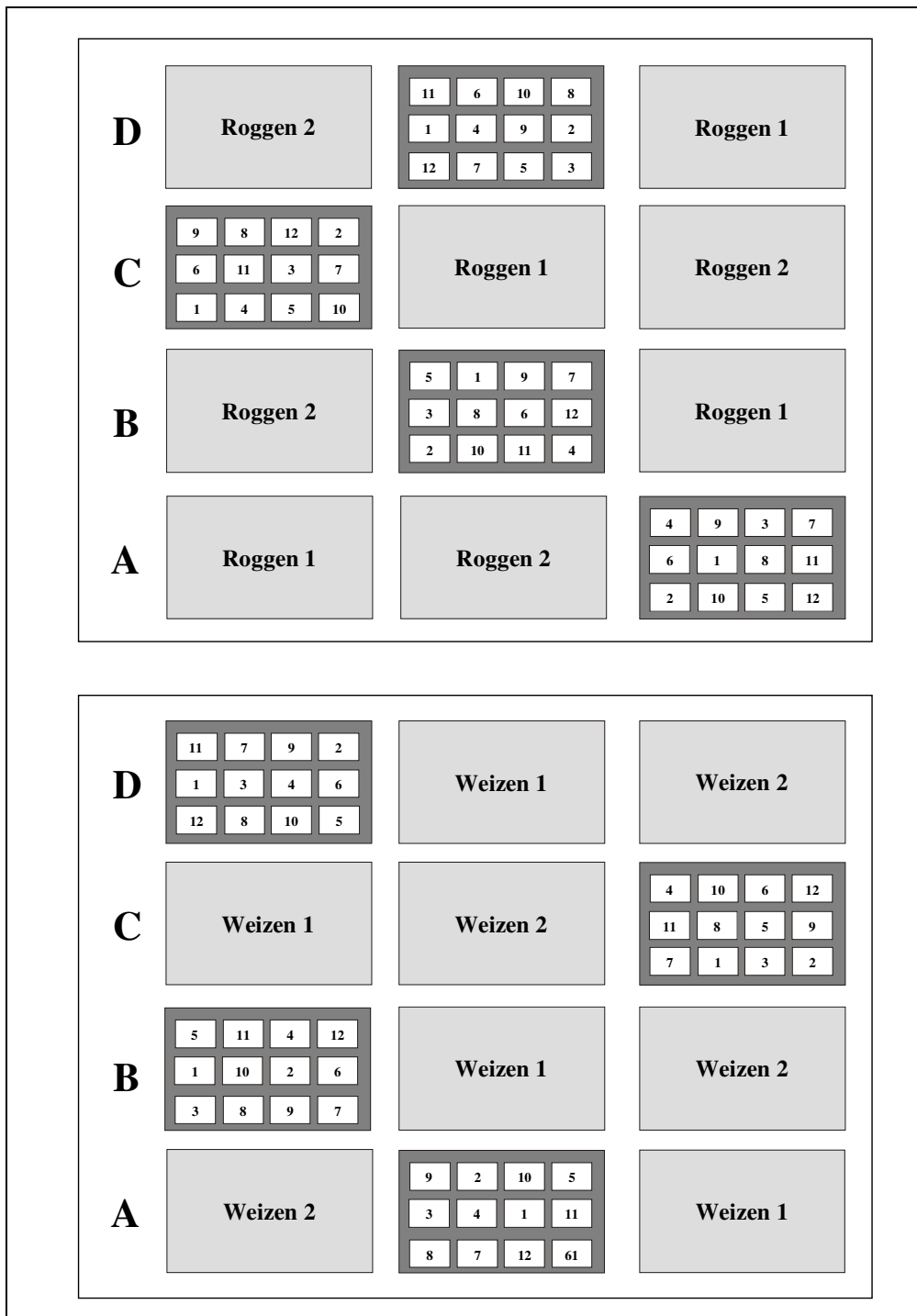


Abb. 8: Schematische Darstellungen der Anbaupläne der Freisetzung 2003 (oben) und 2004 (unten)

Legende: 1-12 = Kartoffelvarianten 1-12 (siehe Tabelle 21)

2. Material und Methoden

2.3.3.3. Kulturmaßnahmen während der Freisetzungen

Sämtliche Kulturmaßnahmen wurden von den Mitarbeitern der BBA - Kleinmachnow durchgeführt. Die wichtigsten Daten sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Termine über die Durchführung verschiedener Kulturmaßnahmen

Freisetzung	Auspflanzung	Termine der Insektizid-behandlungen, sowie Angabe des Insektizids und dessen Aufwandmenge	Termine der Krautabtötungen, sowie Angabe des Mittels und der Aufwandmenge	Ernte
2001	19.4.2001	11.6.2001: Nonodur* (5 l/ha)	22.8.2001: Basta (2,5 l/ha)	13.+14.9.2001
		29.6.2001: Tameron (1,2 l/ha)		
		11.7.2001: Ripcord 10 (300 ml/ha)		
2002	30.4.2002	26.6.2002: Ripcord 10 (300 ml/ha)	keine	5.+6.9.2002
2003	29.4.2003	13.6.2003: Ceom (32,5 ml/ha)	7.8.2003: Basta (2,5 l/ha)	4.+5.9.2003
2004	27.4.2004	keine	keine	9.+10.9.2004

*Zur Bekämpfung der Kartoffelkäfer, keine Wirkung auf Blattläuse

2.3.3.4. Visuelle Bonitur der Kartoffelpflanzen während der Freisetzungen

Entsprechend der Witterung wurden in einem Zeitraum zwischen Ende Juni und Anfang Juli alle 4608 Kartoffelpflanzen (96 Pflanzen pro Variante (12) je Block (4)) visuell auf Virusinfektionen hin bewertet. Dazu wurden bei den oberirdischen Pflanzenteilen der Versuchspflanzen besonders darauf geachtet, ob diese typische Symptome aufwiesen, die auf eine Virusinfektion hindeuteten. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Mosaiksymptome, Blattrollerscheinungen oder Wuchsdeformationen gelegt. Aufgrund der Symptome wurden die Pflanzen als „Gesund“ oder „Virusinfiziert“ eingestuft. Sowohl von virusinfiziert bonitierten Pflanzen, als auch von solchen, die aufgrund keiner erkennbaren Symptomen als nicht-virusinfiziert eingestuft worden waren, wurden Blattproben für eine sich anschließende serologische Untersuchung (siehe 2.3.4.2, 2.3.4.3 und 2.3.4.4) ins Labor überführt.

2.3.4. Serologische Nachweismethoden

2.3.4.1. Herstellung von Pflanzenpresssäften mit Hilfe einer Blattsaftpresse

Neben der Verwendung von Mörser und Pistill wurden bei hohen Probenaufkommen die Pflanzenpresssäfte mit Hilfe der Blattsaftpresse hergestellt. Zwischen den zwei parallel, gegeneinander gepresst laufenden und von einem Elektromotor angetriebenen Walzen der Maschine, wurden 0,2 g Blattmaterial mit Hilfe einer Pinzette mittig eingelegt. Aufgrund der Rotationen der Walzen wurde es automatisch eingezogen, so dass der Pressvorgang ausgelöst wurde. Durch Zugabe von 2000 µl PBS-TPO Puffer (siehe 2.2.11.5) vermischte sich dieser mit dem Pflanzenpresssaft zu einem homogenen Gemisch, das während des Pressvorganges an den schräg gestellten Walzen nach unten rann. Als große Tropfen sammelte sich dieses Gemisch an dem zu einem Dorn

2. Material und Methoden

gedrehten Ende der unteren Walze, und wurde in einem 2,2 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.3.4.2. DAS – ELISA nach Clark und Adams (1977)

In die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden jeweils 100 µl der ersten Antikörperlösung (Antikörper 1:400 verdünnt in Coating Buffer (siehe 2.2.11.1)) pipettiert. Anschließend wurde die Platte für drei Stunden bei 37°C im Inkubator aufbewahrt. Während dieser Zeit erfolgte die Bindung der Antikörper an die Plastikoberfläche. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die nicht gebundenen Antikörper aus den Vertiefungen der Platte durch einen Waschvorgang mit PBS-T (2.2.11.4) unter Zuhilfenahme des ELISA-Waschautomaten entfernt. Dabei wurden zunächst die Antikörperlösungen maschinell aus den Vertiefungen abgesaugt, und diese dann mit je 200 µl PBS-T befüllt. Nach einer Wartezeit von drei Minuten schloss sich ein zweiter Waschschrift an, indem der alte Waschpuffer automatisch aus den Vertiefungen entfernt, und durch neuen ersetzt wurde. Beim letzten von insgesamt fünf solcher Waschvorgänge wurden die Vertiefungen nach dem Absaugen des Waschpuffers nicht wieder befüllt. In diese wurden jeweils 100 µl des Überstandes der vorbereiteten Blattpresssäfte (siehe 2.3.4.1) gefüllt, nachdem diese zuvor für 90 sec. bei 13000 U/min. zentrifugiert worden waren. Die mit den Proben versehene Platte wurde anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Gleichzeitig wurden die noch freien Proteinbindungsstellen an den Plastikoberflächen der Vertiefungen der ELISA-Platte durch das sich im Probenpuffer befindende Albumin abgesättigt.

Am nächsten Tag wurden die Pflanzenpresssäfte aus den Vertiefungen der ELISA-Platte durch einen erneuten Spülvorgang mit dem ELISA-Waschautomaten entfernt und diese fünf Mal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden in die Vertiefungen jeweils 100 µl einer zweiten Antikörperlösung gefüllt. Bei dieser Antikörperlösung handelte es sich um Antikörper, bei denen das Enzym „Alkalische Phosphatase“ konjugiert gebunden war, und die in einem Verhältnis von 1:400 in PBS-TPO (siehe 2.2.11.5) verdünnt worden waren.

Während der nun folgenden Inkubationszeit (drei Std. bei 37°C) konnten sich die Antikörper - Antigen - Antikörper - Komplexe ausbilden. Durch einen sich anschließenden Waschvorgang mit dem ELISA - Waschautomaten, wurden alle nicht gebundenen Antikörper entfernt. In die gewaschenen Vertiefungen wurden jeweils 100 µl Substratlösung (2.2.11.8) gefüllt. Nach einiger Zeit entstand durch die Phosphataseaktivität der Alkalischen Phosphatase in allen Vertiefungen, bei denen sich ein Antikörper - Antigen - Antikörper - Komplex ausbilden konnte eine Gelbfärbung des Substrats. Nach ca. 60 min. wurden die Absorptionswerte der einzelnen Vertiefungen mit dem ELISA - Photometer bei 405 nm gemessen. Die objektive Auswertung erfolgte nach Rek (1987).

2.3.4.3. PTA - ELISA

Die Durchführung des PTA-ELISAs erfolgte nach Hampton *et al.* (1990). Nach einem Zentrifugationsschritt (90 sec. bei 13000 U/min. bei RT) wurden 100 µl vom Überstand des Pflanzenpresssaftes (0,2 g Pflanzenmaterial zermörsert in 2000 µl PBS-TPO) in die Vertiefungen einer ELISA-Platte pipettiert. Nach der Inkubation der Platte bei 4°C über Nacht wurden die Presssäfte aus den Vertiefungen durch einen Spülvorgang mit dem ELISA-Waschautomaten entfernt und diese fünf Mal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden in die Vertiefungen jeweils 100 µl einer Antikörperlösung gefüllt. Bei dieser handelte es sich um Antikörper, bei denen das Enzym „Alkalische Phosphatase“ konjugiert gebunden war, und die in einem Verhältnis von 1:400 in PBS-TPO (siehe 2.2.11.5) verdünnt worden waren.

Während der nun folgenden Inkubationszeit (drei Std. bei 37°C) konnten sich die Antikörper - Antigen - Antikörper - Komplexe ausbilden. Durch einen sich anschließenden Waschvorgang mit dem ELISA - Waschautomaten, wurden alle nicht gebundenen Antikörper entfernt. In die gewaschenen Vertiefungen wurden jeweils 100 µl Substratlösung (2.2.11.8) gefüllt. Nach einiger Zeit entstand durch die Phosphataseaktivität der Alkalischen Phosphatase in allen Vertiefungen, bei denen sich ein Antikörper - Antigen - Antikörper - Komplex ausbilden konnte eine Gelbfärbung

2. Material und Methoden

des Substrats. Nach ca. 60 min. wurden die Absorptionswerte der einzelnen Vertiefungen mit dem ELISA - Photometer bei 405 nm gemessen. Die objektive Auswertung erfolgte nach Rek (1987).0

2.3.4.4. Tissue - Print Immunosorbent Assay (TPIA)

Die Durchführung des TPIA erfolgte weitgehend wie bei Lin *et al.* (1990) beschrieben. Zunächst wurde mit einer Rasierklinge oder einem Skalpell ein Blattstiel oder ein Stängel von einer zu untersuchenden Pflanze abgeschnitten, und die Schnittfläche so auf eine Nitrozellulosemembran gedrückt, dass von dieser ein möglichst vollständiger Abdruck (Querschnitt) auf der Membran entstand. Auf diese Weise wurden die Antigene (Viren) aufgrund der Proteinbindungskapazität der Membran an diese gebunden. Die restlichen noch freien Proteinbindungsstellen der Membran wurden mit Blockierlösung (PBS-O, siehe 2.2.11.6), bei RT (60 min.) abgesättigt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran gewaschen, indem sie drei Mal für je fünf Minuten in PBS-T getaucht wurde. Nach diesem Waschschrift erfolgte die Inkubation der Membran mit der Antikörperlösung bei Raumtemperatur für eine Stunde. Bei der Antikörperlösung lagen die mit dem Enzym „Alkalische Phosphatase“ gekoppelten Antikörper 1:400 in PBS-TPO (2.2.11.5) verdünnt vor. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit PBS-T (2.2.11.4) für jeweils fünf Minuten gewaschen. Nach Zugabe des Farbsubstrates (2.2.11.10) trat nach ca. 15 min. bei den Proben, die mit dem nachzuweisenden Virus infiziert waren, eine Rotfärbung des Blattstielquerschnittes ein. Die Färbung entstand aufgrund der Substratumsetzung durch die alkalische Phosphatase an den Orten der Antigen (Virus)-Antikörper Bindungen auf der Membran.

2.3.4.5. Nachweis von viralen Hüllproteinen (PVM-CP) durch Western-Blot Analyse

Für den Nachweis von PVM Hüllproteinen aus Pflanzen wurde zunächst eine Gesamt-Protein Extraktion (siehe 2.3.4.5.1) aus Pflanzen nach Berger *et al.* (1989) durchgeführt. Diese Proteinextrakte wurden durch eine analytische Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow (1987) aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels eines Western-Blots durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran überführt und an dieser durch Adsorption immobilisiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Nachweis der an die Nitrozellulosemembran gebundenen PVM Hüllproteine erfolgte über spezifische mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper.

2.3.4.5.1. Gesamtprotein-Extraktion aus Pflanzen

Die Gesamtprotein-Extraktion aus Pflanzen wurde nach einer modifizierten Methode nach Berger *et al.* (1989) durchgeführt.

300 mg Pflanzenmaterial wurden in 750 µl auf 95°C erhitztem Berger-Puffer (2.2.12.1) gemörsert und der Presssaft anschließend in ein 2,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei der 10-minütigen Inkubation der Probe bei 95°C wurden diese regelmäßig geschüttelt, anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min. bei 13000 U/min.. 10 µl des Überstandes wurden mit ebenfalls 10 µl 2x Probenpuffer (2.2.12.2) vermischt und durch eine Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (siehe 2.3.4.5.2) aufgetrennt.

2.3.4.5.2. Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung des Gesamtproteinextrakts erfolgte durch die Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow (1987). Diese Methode ermöglicht eine gleichmäßige Auftrennung von Proteinproben (1-100 kDa) mit hoher Bandenschärfe in einem 15%-igen Trenngel (2.2.12.3). Hierbei werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen unabhängig von ihrer Ladung auf Basis ihrer

2. Material und Methoden

Molekülgröße aufgetrennt. Durch parallel aufgetragene Markerproteine können die Molekulargewichte der Proteine annähernd bestimmt werden. Die Auftrennung erfolgt in einer Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur.

Nachdem zwei vorher gründlich gereinigte Glasplatten mit den entsprechenden Abstandhaltern versehen worden waren und in den Gelgiessstand eingesetzt worden waren, wurde in der so entstandenen Kammer zwischen den Glasplatten zunächst das Trenngel (2.2.12.3) gegossen. Das noch flüssige Trenngel wurde sofort mit 2 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation dieses Gels wurde das Isopropanol entfernt, und der Kammerbereich drei mal gründlich mit *A. bidest.* gewaschen. Nachdem das Wasser entfernt worden war, wurde auf dem festen Trenngel das 4%-ige Sammelgel (2.2.12.5) gegossen, und ein Gelkamm in das noch flüssige Gel platziert.

Nach der Polymerisation des Trenn- und Sammelgels wurde dieses in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt, die anschließend mit Kathoden- (2.2.12.6) und Anodenpuffer (2.2.12.7) befüllt wurde. Die mit 2x Probenpuffer (2.2.12.2) versetzten Proteinproben wurden in die mit Kathodenpuffer beschichteten Taschen des Sammelgels überführt, ebenso wurde in einer weiteren Tasche ein prestained-Proteinmarker (siehe Tabelle 16) aufgetragen. Dieser Marker wurde bei dem nachfolgenden Western-Blot auf die Nitrozellulosemembran übertragen und ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine ohne Färbung des Proteingels. Nach Anschluss der Wasserkühlung an die Elektrophorese-Apparatur wurde eine Spannung von 80 V/260 mA angelegt. Nach Erreichen der gewünschten Auftrennungsweite wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und für den Elektrotransfer in die Western-Blot Apparatur überführt.

2.3.4.5.3. Western-Blot von Proteingelen

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

Hierzu wurde zunächst das Polyacrylamidgel auf eine mit *A. bidest.* getränkte Nitrozellulosemembran gleicher Größe platziert. Daraufhin wurde das Gel zusammen mit der Nitrozellulosemembran zwischen zwei Filterpapiere gelegt, die zuvor mit Blotting-Puffer (2.2.12.8) angefeuchtet worden waren. Dieser Blot wurde so in die Kammer positioniert, dass ein Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran in Richtung der Anode (+) stattfinden konnte. Die an eine Wasserkühlung angeschlossene Kammer war vollständig mit Blotting-Puffer gefüllt, der während der gesamten Dauer des Transfers in Bewegung gehalten wurde.

Nach 14 Stunden wurde die Nitrozellulosemembran aus der Apparatur entnommen, und zunächst zwei Mal für je drei Minuten in PBS-T (2.2.11.4) gewaschen. Anschließend wurden die noch freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran in PBS-O (2.2.11.6) abgesättigt.

Nach anschließendem Waschen der Membran in PBS-T wurde diese für 90 Minuten in der Antikörperlösung ((PVM IgG konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, 1:300 verdünnt in PBS-TPO (2.2.11.5)) gelegt. Nach einem erneuten Waschvorgang konnte der Nachweis der an die Nitrozellulosemembran gebundenen PVM Hüllproteine erfolgen, indem die Membran in das Farbsubstratlösung (2.2.11.10) für 10-15 min. inkubiert wurde.

2.3.5. Molekularbiologische Grundtechniken

2.3.5.1. Sterilisationsverfahren

Medien, Lösungen, Reaktions- und Kulturgefäße wurden zur Sterilisation 20 min. bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Reaktions- und Kulturgefäße aus Glas oder Metall sowie Mörser konnten alternativ bei 160°C für 3 Stunden durch Hitze sterilisiert werden. Hitzeempfindliche Lösungen, wie z.B. Antibiotika oder Enzymlösungen wurden sterilfiltriert.

2. Material und Methoden

2.3.5.2. Alkoholpräzipitation von DNA (modifiziert nach Sambrook und Russel, 2001)

Der wässrigen DNA enthaltenden Lösung wurden 1/10 Vol. 3M Natriumacetatlösung (pH 5,5) sowie 2,5 Vol. EtOH_(abs.) zugegeben. Die DNA fiel nach kurzem Mischen bei RT aus. Durch eine anschließende Zentrifugation (20 min. bei 13000 U/min. und 4°C) lag die DNA pelletiert vor. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem 70%-igen EtOH gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (fünf min. bei 13000 U/min. und 4°C). Nach Verwerfung des Überstandes, wurde das gewaschene Pellet in der Speed-Vac getrocknet und in dem gewünschten Volumen *A. bidest.* oder in TE-Puffer (10/01) (siehe 2.2.5.1) aufgenommen. Alternativ konnten zur Präzipitation anstelle des EtOH_(abs.) auch 0.7 Vol. 100%iges Isopropanol verwendet werden.

2.3.5.3. Agarosegelelektrophorese (modifiziert nach Sambrook und Russel, 2001)

Eine biochemische Standardmethode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von Nukleinsäurefragmenten stellt die Agarosegelelektrophorese dar. Abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente wurden standardmäßig Gele mit Agarosekonzentrationen von 1% oder 1,5% hergestellt. Dazu wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1x TAE-Puffer (vergleiche 2.2.3.1) durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurde der lauwarmen Lösung die entsprechende Menge an Ethidiumbromid zugefügt. Diese Agaroselösung wurde in ein vorbereitetes Gelbett mit Gelkamm gegossen, welcher später die Taschen im Gel erzeugte. Das erstarrte Gel wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer gegeben und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Durch vorsichtiges Entfernen des Kammes aus dem Gel, entstanden die Taschen, in welche die mit Gel-Ladepuffer (2.2.3.4) versetzten DNA-Proben gefüllt wurden. Ebenso wurde in eine Tasche der Größenstandard (λ -*Pst*I DNA Marker, siehe 2.3.5.4) gegeben. Mit seiner Hilfe konnten später die relativen Größen der aufgetrennten Fragmente bestimmt werden. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte für die ersten drei Minuten bei 80 V und 250 mA, anschließend bei 120 V. Nach ausreichender

Wanderung der DNA-Fragmente wurden diese durch UV-Licht sichtbar gemacht und ihre relativen Größen mit Hilfe des Größenstandards bestimmt.

2.3.5.4. Herstellung des λ -*Pst*I DNA-Markers

140 μ l λ -Phagen-DNA (0,4 mg/ml), 4 μ l *Pst*I (10 U/ μ l) und 30 μ l 10x NEB-3 Puffer (siehe 2.2.9.12) wurden mit *A. bidest.* auf 300 μ l aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert. Durch eine anschließende Temperaturerhöhung für 10 min. auf 70°C wurde eine Enzymdeaktivierung erreicht. Zuletzt wurden diesem Ansatz noch 100 μ l Gel-Ladepuffer (vergleiche 2.2.3.4) zugegeben. Die Lagerung des fertigen λ -*Pst*I DNA Markers erfolgte bei -20°C. Durch die enzymatische Restriktion entstanden aus der 48502 bp langen λ -Phagen-DNA 28 Fragmente mit folgenden Längen (Angabe in bp):

11497, 5077, 4749, 4507, 2838, 2560, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72, 15

2.3.5.5. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelen stellt eine Möglichkeit dar, spezifische DNA Fragmente in gereinigter Form für Klonierungsarbeiten zu gewinnen. Hierfür stand das „QIAEXTM II“ - Kit von Qiagen zur Verfügung. Ein zu eluierendes DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit Hilfe eines sterilen Skalpell möglichst genau aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte nach dem Firmenprotokoll.

Zum ausgeschnittenen Gelstück wurden 300 μ l QX 1-Puffer und 8 μ l Glasmilch, an die sich die Nukleinsäuren reversibel binden sollen, gegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min. bei 56°C im Heizblock inkubiert und alle zwei min. geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 30 sec. bei 13000 U/min. wurde der Überstand mit einer Pipette

2. Material und Methoden

entfernt, und das Pellet in 500 µl QX 1-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 sec. bei 13000 U/min.) wurde das Pellet zweimal gewaschen, indem es in 500 µl PE-Puffer resuspendiert und anschließend zentrifugiert (30 sec. bei 13000 U/min.) wurde. Die Trocknung des Pellets erfolgte im Heizblock bei 50°C. Zum Lösen der DNA wurde es mit 25 µl EB-Puffer (siehe 2.2.5.3) resuspendiert und für 10 min. bei RT inkubiert. Die Glasmilch wurde anschließend abzentrifugiert (30 sec. bei 13.000 U/min.) und der Überstand, der die DNA enthielt, abgenommen. Nach der Aufreinigung lag das DNA-Fragment schließlich gelöst in EB Puffer vor und konnte für weitere Klonierungsarbeiten verwendet werden. Die Zusammensetzungen der meisten Puffer werden von der Herstellerfirma nicht genannt.

2.3.6. Nukleinsäure Extraktionsmethoden

2.3.6.1. Gesamtnukleinsäure-Schnellextraktion

Diese DNA-Extraktionsmethode, beschrieben von Edwards *et al.* (1991), wurde aufgrund ihres minimalen Zeitaufwandes (ca. 30 min.) standardmäßig für die Überprüfung potenziell transgener Tabakpflanzen (siehe Tabelle 20) mittels PCR verwendet.

Für eine Extraktion wurden zunächst 25 mg Blattmaterial mit 400 µl DNA - Extraktionspuffer (2.2.4.1) homogenisiert. Nach gründlicher Durchmischung dieser Probe schloss sich eine Zentrifugation für zwei min. bei 13000 U/min. an.

Hiernach wurden 300 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol vermischt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten bei RT folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min. bei 13000 U/min. an. Im Anschluss hieran wurde der Überstand entfernt, und das im Vakuum getrocknete Pellet in 100 µl TE (10/0,1) (siehe 2.2.5.1) aufgenommen.

2.3.6.2. Gesamtribonukleinsäureextraktion mit Silica Partikel

Basierend auf einer Gesamtnukleinsäureextraktion für Nukleinsäuren aus Serum (Boom *et al.*, 1990) wurde diese Methode für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzen von MacKenzie *et al.* (1997), Malinowski *et al.* (1998) und Rott und Jelkmann (2001) adaptiert, und von Menzel (2003) für die Anwendung für Routineuntersuchungen weiter modifiziert.

100 mg Blattmaterial wurden für die Extraktion in 1 ml Silica-Extraktionspuffer (2.2.6.1) homogenisiert. 500 µl des Homogenats wurden mit 100 µl SDS (10%) versetzt und unter wiederholtem Schütteln für 10 min. bei 70°C inkubiert. Nach einer Abkühlphase von fünf min. auf Eis erfolgte eine Zentrifugation von 10 min. bei 13000 U/min. In deren Anschluss wurden 300 µl des Überstandes mit 300 µl 6M NaI-Lösung (2.2.6.2), 150 µl EtOH_(abs.) und 25 µl Silicasuspension (2.2.6.3) für 10 Minuten bei RT unter wiederholtem Schütteln zur Bindung der Nukleinsäuren an die Silicapartikel inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für eine Minuten bei 6000 U/min. zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das im Reaktionsgefäß verbleibende Silicapellet wurde insgesamt zwei mal mit jeweils 500 µl Waschpuffer (2.2.6.4) gewaschen. Dabei wurde es komplett suspendiert. Nach der Zentrifugation des letzten Waschschrilles wurde der Überstandes entfernt, und der Ansatz ein weiteres Mal bei 6000 U/min. für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Restüberstand mit einer Pipette entfernt. Das Pellet wurde für fünf Minuten bei RT getrocknet, und dann in 150 µl TE 10/0,1 (2.2.5.1) oder EB (2.2.5.3) gelöst. Das Eluieren der Nukleinsäuren erfolgte für vier Minuten bei 70°C. Abschließend wurden die Silicapartikel durch einen Zentrifugationsschritt (fünf Minuten bei 13.000 U/min.) auf den Boden des Reaktionsgefäßes zentrifugiert und 100 µl des Nukleinsäureextraktes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäureextrakte wurden bei -20°C gelagert.

2. Material und Methoden

2.3.6.3. Gesamtribonukleinsäureextraktion aus ELISA Presssäften

Von der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig wurden ELISA Presssaftreste (0,2 g Blattmaterial gemörsert in 2000 µl PBS-TPO) von PVY infizierten Kartoffeln für die molekularen Untersuchungen der PVY-Hüllproteinregionen zur Verfügung gestellt.

Für die Gesamt-RNA-Extraktion wurden Teile der unter dem Punkt 2.3.6.2 beschriebenen Methode verwendet: Zunächst wurden die ELISA-Presssaftproben für 15 Minuten bei RT bei 13000 U/min. zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden mit 300 µl der 6 M NaI-Lösung (2.2.6.2), 150 µl EtOH_(abs) und 25 µl Silicasuspension (2.2.6.3) vermischt. Alle weiteren Arbeitsabläufe und verwendete Lösungen stimmten mit der bereits beschriebenen Methode (siehe 2.3.6.2) überein.

2.3.7. Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR und RT-PCR

2.3.7.1. Herstellung der Arbeitslösung der IPP-*Taq* DNA-Polymerase

Die IPP-*Taq* DNA-Polymerase wurde nach (Pluthero, 1993) hergestellt und lag als Stammlösung vor. Für die Verwendung dieser IPP-*Taq* DNA-Polymerase in den verschiedenen PCR-Ansätzen wurde von der Stammlösung eine Arbeitslösung hergestellt, indem die Stammlösung in einem Verhältnis von (1:50 (v/v)) mit *Taq*-Verdünnungspuffer verdünnt wurde (2.2.7.1). Die Arbeitslösung (im Folgenden als IPP-*Taq* bezeichnet) wurde vor jedem Gebrauch kräftig durchmischt.

2.3.7.2. Standard-PCR zur Amplifikation eines Fragments aus extrahierter Pflanzen - DNA

Für die Amplifikation von DNA Fragmenten wurde im Normalfall ein 50 µl Reaktionsansatz (siehe 2.3.7.2.1) und das PCR-Programm, das unter 2.3.7.2.2 beschrieben ist, verwendet.

Als Ausgangs-DNA wurden dabei entweder 3 μl DNA Lösung (siehe 2.3.6.1) oder 1 μl einer Plasmid-Lösung (siehe Punkt 2.3.10.2), von der zuvor mit *A. bidest.* eine 1:50 (v/v) Verdünnung hergestellt wurde, eingesetzt.

2.3.7.2.1. Standard - PCR - Mix

X μl	Ausgangs-DNA	(siehe 2.3.7.2)
5 μl	10x PCR-Puffer	(siehe 2.2.7.5)
5 μl	MgCl ₂	(25 mM)
0,5 μl	dNTP-Mix	(je 25 mM)
1 μl	Primer (s)	(10 μM)
1 μl	Primer (as)	(10 μM)
1 μl	IPP- <i>Taq</i>	(siehe 2.3.7.1)

ad 50 μl mit *A. bidest.*

2.3.7.2.2. Standard - PCR - Programm

1. Schritt:	94°C für 3 min.
2. Schritt (35 Zyklen):	94°C für 30 sec., 55°C für 30 sec. 72°C für 90 sec.
3. Schritt:	72°C für 10 min.
4. Schritt:	4°C (unendlich)

2.3.7.3. Standard - RT - PCR zur Amplifikation eines DNA Fragments aus RNA

Sowohl die cDNA Synthese als auch die Amplifikation eines DNA Fragments fand im Normalfall im selben Reaktionsgefäß statt. Dazu wurde ein 50 μl Reaktionsansatz (wie unter 2.3.7.3.1 beschrieben) und ein RT-PCR-Programm (siehe 2.3.7.3.2) verwendet.

2. Material und Methoden

2.3.7.3.1. Standard - RT - PCR zur Amplifikation eines Fragments aus RNA

1 µl	RNA - Lösung	(siehe 2.3.6.2, 2.3.6.3)
5 µl	10x PCR-Puffer	(siehe 2.2.7.5)
5 µl	MgCl ₂	(25 mM)
0,5 µl	dNTP-Mix	(je 25 mM)
1 µl	Primer (s)	(10 µM)
1 µl	Primer (as)	(10 µM)
1 µl	IPP- <i>Taq</i>	(siehe 2.3.7.1)
0,1 µl	AMV - RT	(siehe Tabelle 13)
35,4 µl	<i>A. bidest.</i>	

2.3.7.3.2. Standard - RT-PCR - Programm

1. Schritt:	42°C für 40 min.
2. Schritt:	94°C für 4 min.
3. Schritt (35 Zyklen):	94°C für 30 sec. 55°C für 30 sec. 72°C für 90 sec.
4. Schritt:	72°C für 10 min.
5. Schritt:	4°C (unendlich)

2.3.8. Modifikationen von DNA Fragmenten

2.3.8.1. A-Tailing von DNA-Fragmenten

Wurden für die Amplifikation von PCR-Fragmenten bestimmte *Taq*-DNA Polymerasen wie die *Taq*-Pfu DNA Polymerase oder die PhusionTM-High Fidelity DNA Polymerase (siehe Tabelle 13) verwendet, entstanden aufgrund deren „proofreading“ Aktivitäten

stumpfe DNA-Fragmente. Vor Klonierung dieser Fragmente in einen T-Vektor, wurden diese zunächst gereinigt und dann einem „A-Tailing“ (siehe 2.3.8.1.1) unterzogen.

2.3.8.1.1. A-Tailing - Ansatz

7,3 µl	eluiertes DNA-Fragment	(siehe 2.3.5.5)
1 µl	10x PCR-Puffer	(siehe 2.2.7.5)
1 µl	MgCl ₂	(25 mM)
0,5 µl	IPP- <i>Taq</i>	(siehe 2.3.7.1)
0,2 µl	dATP	(10 mM)

Dieser Ansatz wurde für 60 min. in einem Thermozykler bei 70°C inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.8.2. Klenow-Ansatz (Fill-In Reaktion)

Um nach einer enzymatischen Restriktion eines DNA Fragments die 5'-überhängenden Enden aufzufüllen, wurde eine „Fill-In Reaktion“ (20 µl-Anstz) durchgeführt.

2.3.8.2.1. Klenow-Reaktionsansatz

10 µl	DNA	(siehe 2.3.12)
2 µl	10x Klenow Puffer (MBI)	(siehe 2.2.7.4)
0,5 µl	Klenow Fragment	(siehe Tabelle 13)
0,4 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)	
7,1 µl	<i>A. bidest.</i>	

2.3.8.2.2. Klenow (Fill-In) Reaktion

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für zehn Minuten bei 37°C inkubiert, und anschließend eine Deaktivierung des Enzyms bei 70°C für zehn Minuten herbeigeführt.

2. Material und Methoden

2.3.9. Ligationsansätze

Je nach Beschaffenheit der DNA Fragmente wurden diese nach enzymatischer Restriktion mit einem in gleicher Weise geschnittenen Plasmid ligiert. Besaßen die DNA-Fragmente ein überstehendes Adenosin, konnte eine Ligation dieser Fragmente mit einem T-Vektor durchgeführt werden.

2.3.9.1. Ligation von DNA Fragmenten über gemeinsame Schnittstellen

Die DNA Konzentrationen der DNA Fragmente wurde nach der enzymatischen Restriktion (2.3.12.3) während der Elution der Fragmente aus dem Gel (siehe 2.3.5.5) geschätzt und daraufhin die einzusetzenden Mengen für die Ligationsansätze bestimmt. Die Ligation fand über Nacht bei 4°C statt. Im Anschluss daran schloss sich eine 10-minütige Erhitzung der Ligationsansätze auf 65°C an, um die Ligasekomplexe von den DNA Molekülen zu entfernen.

2.3.9.1.1. Ligationsansatz (gemeinsame Restriktions-Sites)

4-6 µl	Fragment-DNA	
2 µl	Vektor DNA	
1 µl	10x Ligationspuffer	(siehe 2.2.7.2)
0,5 µl	T4-Ligase (MBI, 5 Weiss U/µl)	(siehe Tabelle 13)
ad 10 µl mit <i>A. bidest.</i>		

2.3.9.2. Ligationen von DNA-Fragmenten mit dem pGEM[®]-T Easy Vector

DNA Fragmente, die mit der IPP-*Taq* amplifiziert worden waren, oder nach deren Modifikation durch ein A-Tailing (siehe 2.3.8.1.1), konnten nach Elution aus einem

Agarosegel (vergleiche 2.3.5.5) mit dem „pGEM[®]-T Easy“ Vektor ligiert werden. Die Ligation fand über Nacht bei 4°C statt.

2.3.9.2.1. Ligationsansatz mit dem pGEM[®]-T Easy Vector System I

2-3,5 µl	DNA Fragment	
5 µl	2x Rapid - Ligation Puffer	(siehe 2.2.7.3)
1 µl	pGEM [®] -T-Easy Vektor	(50 ng/µl)
0,5 µl	T4-DNA Ligase (Promega)	(vgl. Tabelle 13)
ad 10 µl mit <i>A. bidest.</i>		

2.3.9.3. Ligation von DNA-Fragmenten mit dem T-Vektor (pBC-T)

A-getailte DNA-Fragmente (siehe Punkt 2.3.8.1.1) oder solche, die durch die mit der IPP-*Taq* amplifiziert worden waren, konnten über Nacht bei 4°C in den T-Vektor pBC-T ligiert werden. Dazu wurde das Plasmid pBC-T zunächst einer Restriktionsspaltung durch die Enzyme *Eam115I* und *EcoRV* unterzogen. Von Einzelfällen abgesehen, wurde es hauptsächlich für die Klonierung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe bis zu 1500 bp benutzt. Der Restriktionsansatz zur Herstellung dieses T-Vektors ist in (2.3.9.3.1) wiedergegeben.

2.3.9.3.1. Restriktionsansatz des Plasmids pBC-T

6,25 µl	pBC-T Lysat	(siehe Tabelle 15)
2,5 µl	10x <i>Eam115I</i> -Puffer (MBI)	(siehe 2.2.9.8)
1 µl	<i>Eam115I</i>	(10 U/µl)
1 µl	<i>EcoRV</i>	(10 U/µl)
ad 25 µl mit <i>A. bidest.</i>		

2. Material und Methoden

Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei 37°C wurden die Enzymtätigkeiten durch Einwirkung von 80°C für 20 Minuten aufgehoben.

2.3.9.3.2. Ligationsansatz

2,5 µl	A-getailtes DNA Fragment	(siehe 2.3.8.1.1)
5 µl	2x Rapid - Ligation Puffer	(siehe 2.2.7.3)
2 µl	pBC-T	(vgl. 2.3.9.3.1)
0,5 µl	T4-DNA Ligase (MBI-Fermentas)	(siehe Tabelle 13)

2.3.10. Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

Bei der verwendeten Transformationsmethode (modifiziert nach Hanahan, 1983), wurde der als Dauerkultur vorliegende Bakterienstamm K12 NM522 (siehe Tabelle 18), auf Platten aus LB-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Mehrere Einzelkolonien wurden in je 1 ml SOB-Flüssigmedium (2.2.14.2.6) suspendiert und anschließend in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 30 ml SOB-Flüssigmedium und 300 µl Magnesiumlösung (2.2.8.1) überführt. Die Bakterien werden bei 180 U/min. und 37°C im Schüttler bis zu einer Optischen Dichte (OD_{550nm}) von etwa 0,5 angezogen. Das Bakterienwachstum wurde gestoppt, indem die Bakteriensuspension für 10 min. auf Eis gestellt wurde. Nach einer anschließenden Zentrifugation (12 min. bei 4°C und 1.130 U/min. (Kühlzentrifuge RC 5 B plus mit Ausschwingrotor)) wurde der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Transformationspuffer (2.2.8.2) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis schloss sich wieder ein Zentrifugationsschritt unter obigen Bedingungen an und der Überstand wurde wiederum verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml Transformationspuffer aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 140 µl DND-Lösung (2.2.8.3) dazugegeben, und dann die Bakteriensuspension für 15 min. auf Eis inkubiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Anschließend waren die Bakterienzellen kompetent, um Plasmide aufnehmen zu können. Je 200 µl der Bakteriensuspension

wurden zu einem 10 µl Ligationsansatz (2.3.9) gegeben. Ebenso wurde bei der Transformationskontrolle verfahren, bei der 10 ng eines Kontrollplasmids zu der Bakteriensuspension gegeben wurde. Die Ansätze wurden 30 min. auf Eis inkubiert und anschließend für 90 sec. auf 42°C erhitzt. Danach wurden die Ansätze für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Flüssigmedium (2.2.14.2.7) wurden die Proben für 1 h bei 37°C im Schüttler bei 180 U/min. kultiviert.

2.3.10.1. Selektion transformierter Zellen

Auf Selektivmedien (2.2.14.1) wurden Aliquots der Ansätze (100 µl je Platte, siehe 2.3.10) ausplattiert, wobei die Antibiotikaresistenzigenschaften der verwendeten Plasmide (siehe Tabelle 15) ausgenutzt wurde. Zusätzlich besaßen die Vektoren ein *lacZ*-Gen, in dessen Sequenz sich die „multiple cloning site“ (MCS) befand. Auf antibiotikahaltigen Medien konnten sich nur solche Bakterienkolonien entwickeln, deren Zellen entweder das intakte Plasmid oder ein Konstrukt aus Plasmid und ligierter DNA (Insert) besaßen. Aufgrund des *lacZ*-Gens, entstand in den Bakterien, die das unveränderte Plasmid besaßen ein aktives Enzym, die β-Galaktosidase, die das in verschiedenen Medien enthaltene Substrat X-Gal umsetzte. Dadurch kam es bei diesen Kolonien zu einer Blaufärbung des Mediums. Kolonien, die ein rekombinantes Plasmid in sich trugen, zeichneten sich durch die ausbleibende Blaufärbung des Substrats aus. Die Platten mit den entsprechenden Selektivmedien und den ausplattierten Bakterien wurden bei 37°C über Nacht angezogen. Vom Kontrollansatz wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4}). Es wurden 100 µl jeder Verdünnungsstufe auf antibiotikahaltigem Medium ausplattiert und ebenfalls bei 37°C über Nacht angezogen.

Da nicht alle weißen Kolonien das gewünschte Insert enthielten, war es notwendig, die erwünschten Kolonien durch Kolonie-PCR (siehe 2.3.10.3), oder nach Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA (vergleiche 2.3.10.2) durch anschließende enzymatische Restriktionsspaltungen (2.3.12.4) zu überprüfen.

2. Material und Methoden

2.3.10.2. Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA (Minipräparation)

Bei der Isolierung der Plasmid-DNA (modifiziert nach Birnboim und Doly (1979)) wurden jeweils 3 ml LB-Flüssigselektivmedien (2.2.14.2) mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Nach der Kultur der Bakterien für 6 Std. bei 37°C auf dem Schüttler wurden 2 ml abgenommen und 90 sec. bei 10000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl Lösung A (2.2.10.1) resuspendiert. Anschließend wurden 400 µl Lösung B (2.2.10.2) zugegeben, kurz gemischt und mit 300 µl Lösung C (2.2.10.3) versetzt. Nachdem der Ansatz für 20 Minuten auf Eis gestellt worden war, wurde dieser anschließend für 10 Minuten bei 13000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 10 Minuten bei 13000 U/min. zentrifugiert. Für die Präzipitation der Plasmid-DNA wurden zum Überstand 600 µl Isopropanol zugegeben und vorsichtig gemischt. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 13000 U/min. an. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl Lösung D (2.2.10.4) resuspendiert und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 400 µl EtOH_(abs.) hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 Minuten bei 13000 U/min.). Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der Speed-Vac getrocknet. Das trockene Pellet wurde zum Schluss in 60 µl RNase-TE (10/01) (siehe 2.2.5.2) resuspendiert, und als klares Lysat bezeichnet.

2.3.10.3. Kolonie-PCR

Dieses Selektionsmethode wurde verstärkt angewendet, wenn eine große Anzahl von Bakterienkolonien auf Vorhandensein des erwünschten rekombinanten Plasmids überprüft werden sollte. Dazu wurde jeweils eine Bakterienkolonie mit einem Zahnstocher in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen, in dem sich 100 µl des entsprechenden LB-Flüssigselektivmediums (siehe 2.2.14.2) befanden. Nach der Überimpfung der Kolonie, wurde das Reaktionsgefäß kräftig geschüttelt, um eine gute Verteilung der Bakterien im Kulturmedium zu erreichen. Eine kleine Menge (1 µl) dieser Suspension wurde für eine PCR eingesetzt. Der PCR-Mix ist unter 2.3.10.3.1 und

das PCR-Programm unter Punkt 2.3.10.3.2 angegeben. Der Rest der Bakteriensuspension wurde zunächst bis zum Vorliegen des PCR-Ergebnisses bei 4°C gelagert. Von den gelagerten Bakteriensuspensionen, bei denen die Kolonie-PCR ein positives Ergebnis lieferte, wurden 50 µl in je 3 ml desselben LB-Flüssigmedium für eine sich anschließende Minipräparation (2.3.10.2) überführt.

2.3.10.3.1. Kolonie-PCR - Mix

Für die Kolonie-PCR wurden fragmentspezifische Primer eingesetzt.

1 µl	Bakteriensuspension	(siehe 2.3.10.3)
1 µl	Primer (s)	(10 µM)
1 µl	Primer (as)	(10 µM)
0,25 µl	Tween [®] 20	(10 %)
0,25 µl	dNTP-Mix	(je 25 mM)
2,5 µl	10x PCR Puffer	(siehe 2.2.7.5)
2,5 µl	MgCl ₂	(25 mM)
0,5 µl	IPP- <i>Taq</i>	siehe (2.3.7.1)
ad 25 µl mit <i>A. bidest.</i>		

2.3.10.3.2. Kolonie-PCR-Programm

1. Schritt (34 Zyklen):	94°C für 30 sec. 60°C für 30 sec. 72°C für 90 sec.
2. Schritt:	72°C für 10 min.
3. Schritt:	4°C (unendlich)

2. Material und Methoden

2.3.11. Aufarbeitung der Plasmide für die Auftragssequenzierung

Für die Auftragssequenzierung wurden die durch die Minipräparation erzeugten Plasmidlösungen (klaren Lysate, siehe 2.3.10.2) noch einmal gereinigt. Dieses geschah entweder mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kits (Qiagen, vgl. 2.3.11.1) oder mit Hilfe der unter Punkt 2.3.11.2 beschriebenen Quick-Clean Methode von BIOLINE.

2.3.11.1. Reinigen der Lysate mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kits

Die zu reinigende Plasmidlösung (klares Lysat) wurde mit dem 5-fachen Volumen des Puffers PB vermischt und anschließend auf eine QIAprep[®] Spin Miniprep Säule gegeben. Nach einer Zentrifugation (2 min. bei 13000 U/min.) wurde auf die Membran der Säule 750 µl Puffer PE gegeben und diese durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (30 sec. für 13.000 U/min.) gewaschen. Nach Entfernung des Durchflusses wurde die Säule durch eine sich anschließende Zentrifugation (1 min. bei 13000 U/min.) getrocknet. Abschließend wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl Puffer EB (2.2.5.3) für eine min. eluiert. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Puffer sind vom Hersteller nicht angegeben.

2.3.11.2. Aufarbeitung von klaren Lysaten mit Hilfe des Quick-Clean Verfahrens von BIOLINE

Zu den 20 µl eines zu reinigenden klaren Lysats (Plasmidlösung) wurde dasselbe Volumen der Quick-Clean Lösung zugegeben, und der Ansatz gründlich durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min. bei RT wurde der Ansatz bei 13000 U/min. für 10 min. bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Beim folgenden Waschvorgang wurde 100 µl EtOH_(70%) in das Reaktionsgefäß gefüllt und dann für 30 sec. gründlich gemischt. Nach einer Zentrifugation (13000 U/min. bei RT für 10 Minuten) wurde der Überstand entfernt und das Reaktionsgefäß im 50°C warmen Heizblock getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 20 µl TE (10/01) (siehe

2.2.5.1) resuspendiert. Die Zusammensetzung der Quick-Clean Lösung wird vom Hersteller nicht beschrieben.

2.3.12. Restriktion von DNA-Fragmenten

Bei den Restriktionsansätzen unterschiedlicher DNA-Fragmente mit jeweils nur einer Restriktionsendonuklease wurden stets der mit dem Enzym mitgelieferte Puffer verwendet. Bei gleichzeitiger Spaltung von DNA Fragmenten mit zwei unterschiedlichen Enzymen (Doppelspaltung) richtete sich die Auswahl des verwendeten Puffers nach den Empfehlungen der Hersteller. Konnte kein gemeinsamer Puffer für eine Doppelspaltung verwendet werden, wurden die Restriktionen nacheinander mit den jeweiligen Puffern der verwendeten Enzymen durchgeführt. Dabei wurde im Anschluss an die erste Restriktion eine DNA Präzipitation (siehe 2.3.5.2) und anschließend die zweite Restriktionsreaktion durchgeführt. Die Restriktionsbedingungen betragen (falls nicht anders angegeben) 90 min. bei 37°C.

2.3.12.1. Hitzedeaktivierung der Restriktionsendonukleasen (RE)

Die Restriktionsaktivitäten wurden in den Ansätzen, die für Klonierungen verwendet werden sollten, in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Enzymen unter Berücksichtigung der Herstellerangaben durch Inkubationen bei 65°C oder 80°C für 20 min. deaktiviert.

2. Material und Methoden

2.3.12.2. Restriktion von PVY-hüllproteingehaltenden Fragmenten im Rahmen der RFLP Untersuchungen

0,2 µl	RE (10 U/µl)	(vgl. Tabelle 12)
1 µl	10x Puffer	(siehe 2.2.9)
5-6 µl	PCR-Fragment	
ad 10 µl mit <i>A. bidest.</i>		

2.3.12.3. Restriktion von DNA-Fragmenten im Rahmen von Klonierungsarbeiten

Für die Restriktion von DNA-Fragmenten, die anschließend in ein Plasmid kloniert werden sollten, wurde folgender Restriktionsansatz verwendet:

1 µl	je RE (10 U/µl)	(vgl. Tabelle 12)
2 µl	10x Puffer	(siehe 2.2.9)
3 - 10 µl	DNA - Fragment	
ad 20 µl mit <i>A. bidest.</i>		

2.3.12.4. Kontrollspaltung von rekombinanten Plasmiden

Zur Überprüfung rekombinanter Plasmide durch enzymatische Restriktion wurde folgender Ansatz verwendet:

0,5 µl	je RE (10U/µl)	(vgl. Tabelle 12)
1,5 µl	10x Puffer	(siehe 2.2.9)
3 µl	klares Lysat	(vgl.2.3.10.2)
ad 15 µl mit <i>A. bidest.</i>		

2.3.13. Partikel - Bombardement

Für den Beschuss ganzer Pflanzen mit Wolframpartikeln, an denen DNA angelagert worden war, wurde eine nach Gray *et al.* (1994) selbstgebaute Partikelkanone verwendet, deren Aufbau aus der Abb. 9 entnommen werden kann.

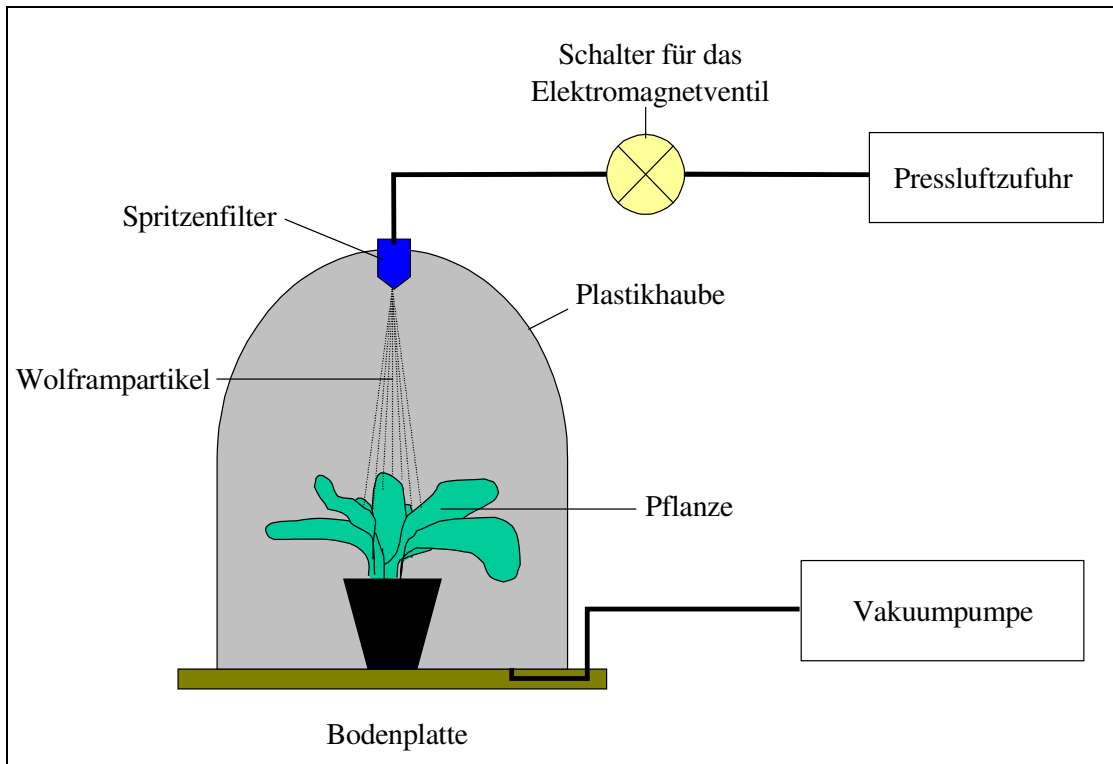


Abb. 9: Schematische Darstellung der Partikel-Kanone. Ganze Pflanzen wurden mit DNA behafteten Wolframpartikel beschossen.

In der Kammer herrscht ein Unterdruck von 800 mbar. Für 0,1 sec. wird elektrisch ein Magnetventil geöffnet, das den Weg für einen Luftstrom von 3 bar durch den Spritzenfilter in die Kammer mit der Pflanze freigibt. Durch diesen Luftimpuls werden die Wolframpartikel mit der auf ihnen haftenden DNA vom Sieb des Spritzenfilters in das pflanzliche Gewebe verbracht.

2.3.13.1. Vorbereitung der Wolframpartikel

100 mg Wolframpartikel wurden mit 1 ml EtOH_(abs.) im 1,5 ml Reaktionsgefäß gründlich vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min. bei RT schloss sich ein Zentrifugationsschritt (10 min. bei 13.000 U/min.) an. Der Überstand wurde vollständig mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurden die Partikel insgesamt fünf Mal mit *A. bidest.* gewaschen, indem die Wolframpartikel zunächst mit 1 ml *A. bidest.* gründlich

2. Material und Methoden

durchmischt wurden, und anschließend der nach einem Zentrifugationsschritt (10 min. bei 13000 U/min.) aufgetretene Überstand mit einer Pipette entfernt wurde.

Nach den Waschvorgängen, wurden die Wolframpartikel abschließend in 1 ml *A. bidest.* aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Schon nach kurzer Lagerung sedimentierten die Wolframpartikel, so dass der Ansatz vor jeder Verwendung zunächst gut durchmischt werden musste.

2.3.13.2. Präzipitation von Nukleinsäuren an Wolframpartikel

Für die Präzipitation der Plasmid-DNA an Wolframpartikel (2.3.13.1) wurden pro Schuss zunächst drei µl Plasmid-DNA-Lösung (siehe 2.3.10.2) mit drei µl Wolframpartikelsuspension (2.3.13.1) gründlich vermischt. Zur Präzipitation der DNA an die Wolframpartikel wurden zu diesem Ansatz abschließend drei µl 1M Ca(NO₃)₂ hinzugefügt. Nach gründlichem Durchmischen schloss sich eine fünfminütige Inkubationszeit bei RT an, während dessen die Wolframpartikel langsam sedimentierten. Nach Ablauf der Zeitspanne wurden 6 µl des Überstandes mit einer Pipette entfernt, und die Wolframpartikel mit der verbliebenen Flüssigkeit ein weiteres Mal gründlich aufgemischt.

2.3.13.3. Vorbereitung der Pflanzen für das Partikelbombardement

Mit der verwendeten Partikelkanone war es möglich, nicht nur einzelne Blätter, sondern ganze Pflanzen mit der an die Wolframpartikel aufgebrachten DNA zu inokulieren. Dazu wurden zunächst die Pflanzen vorbereitet. Zunächst wurde eine Papiermanschette direkt über der Substratoberfläche um den Stängel befestigt. Diese deckte somit die Substratoberfläche ab, um das Substrat bei den sich plötzlich ändernden Druckverhältnissen während des Beschussvorganges in den Töpfen zurückzuhalten.

Um den Stängel der Pflanze wurde zur Stabilisierung in Höhe der zu inokulierenden jüngsten Blättern und des Vegetationskegels ein 1,5 cm dicker Schaumstoffblock geklemmt, auf dessen Oberfläche sich ebenfalls eine Papiermanschette befand. Ältere Blätter lagen somit auf dem Schaumstoffblock auf, und wurden durch dessen stabilisierende Wirkung vor einem ungewollten Abknicken während des Schussvorganges bewahrt.

2.3.13.4. Durchführung des Partikelbombardements

Eine vorbereitete Pflanze (siehe 2.3.13.3) wurde in der Unterdruckkammer (vergleiche Abb. 9) positioniert, so dass während des Beschusses nicht nur einzelne Blätter, sondern auch ihr Vegetationskegel von den Wolframpartikeln getroffen wird. 3 µl der mit der zu übertragenden DNA versehenen Wolframpartikel (2.3.13.2) wurden nach gründlicher Vermischung auf ein sich im vorher autoklavierten Spritzenfilter befindliches Netz pipettiert. Der Spritzenfilter wurde im Deckel der Vakuumkammer an der Pressluftzufuhrvorrichtung eingeschraubt. Der Abstand zwischen der Ausgangsöffnung des Spritzenfilters und der Pflanze betrug ca. 5 cm.

Nachdem der Deckel mit dem Spritzenfilter über die Pflanze gestülpt worden war, wurde in der geschlossenen Kammer ein Unterdruck von 800 mbar erzeugt. Sobald dieser erreicht war, wurde für 0,1 sec. elektrisch ein Magnetventil geöffnet, das den Weg für einen Luftstrom von 3 bar durch den Spritzenfilter in die Kammer mit der Pflanze freigab. Durch diesen Luftimpuls wurden die Wolframpartikel mit der auf ihnen haftenden DNA vom Sieb des Spritzenfilters in das pflanzliche Gewebe verbracht.

Nach Abgabe des Schusses wurde der Unterdruck in der Kammer zügig aufgehoben, und die Pflanze nach erfolgtem Druckausgleich entnommen und unter Gewächshausbedingungen weiter kultiviert.

2. Material und Methoden

2.3.14. Agroinfektion

Die Infektion verschiedener Testpflanzen (*N. benthamiana*, *S. lycopersicon* cv. Lizzy und *N. hesperis*) mit mehreren hergestellten PVM Vollängenklonen (siehe 2.4.3) erfolgte nicht nur mittels Partikel-Bombardement (vergleiche Punkt 2.3.13), sondern auch durch Agroinfektion (nach Grimsley *et al.*, 1986).

Hierbei wurde die Fähigkeit von *Agrobacterium tumefaciens* genutzt, die in die T-DNA integrierten Sequenzen der PVM-Vollängenklone in die Pflanzenzellen zu übertragen. Einer Virusinfektion kann einerseits eine Integration der T-DNA in das Pflanzengenom und anschließender Expression des Transgens, wie auch einer im Vorfeld ablaufenden Bildung replikationsfähiger viraler Zwischenstufen zugrunde liegen. Für einen erfolgreichen Transfer der T-DNA muss die *vir*-Genkette induziert werden, die durch Temperaturen unter 28°C, bei niedrigem pH-Wert und in Anwesenheit von phenolischen Substanzen wie das in dieser Arbeit verwendete Acetosyringon stimuliert wird (Stachel *et al.*, 1985; Alt-Mörbe *et al.*, 1988, 1989). Für die Agroinfektionen wurden die oben genannten Versuchspflanzen im 6- Blattstadium verwendet. Die Applikation der Bakteriensuspension erfolgte sowohl auf voll ausgebildeten, wie auch auf jüngeren Blättern.

2.3.14.1. Herstellung kompetenter Agrobakterien

Von der Dauerkultur der Agrobakterien (LBA4404) wurde ein fraktionierter Ausstrich auf eine LBA-Platte (siehe 2.2.14.1.6) durchgeführt, und dieser für 48 Stunden bei 28°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 20 ml LBA Flüssigmedium (siehe 2.2.14.2.5) überführt, und über Nacht auf einem Schüttler bei 28°C und 250 U/min. inkubiert. Von dieser Kultur wurden 10 ml in einen 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 500 ml LBA Flüssigmedium übertragen und wiederum auf einem Schüttler bei 28°C und 250 U/min. für drei bis vier Stunden bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bis 0,8 inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Kolben für 30 min. auf Eis gestellt und die Bakteriensuspension anschließend bei 4000 g für 15 min. zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes, wurde das Pellet in 100

ml kaltem 1 mM HEPES (pH 7,0) resuspendiert und anschließend nochmals bei 4000 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet ein zweites Mal mit 100 ml kaltem 1 mM HEPES (pH 7,0) resuspendiert und es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4000 g. Nachdem der gesamte Überstand entfernt worden war, wurde das Pellet in 10 ml kaltem 10%igem Glycerol resuspendiert, und dann für 15 min. bei 4000 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml kaltem 10%igem Glycerol resuspendiert und Aliquots der Bakteriensuspension von jeweils 40 µl in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt. Diese wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

2.3.14.2. Elektroporation von Agrobakterien mit den binären Plasmiden

Nachdem ein 40 µl Aliquot gefrorener kompetenter Agrobakterienzellen (siehe Punkt 2.3.14.1) auf Eis aufgetaut worden war, wurde zu diesen Zellen 3 µl der Plasmidlösung (bestehend aus dem rekombinanten binären Vektor pBIN19SN+PVM) zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurde der Ansatz zunächst für eine Minute auf Eis inkubiert, und anschließend in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde in den Elektroporator eingesetzt, und ein elektrischer Impuls (1500 V, 25 mA, 25 W) ausgelöst. Im Anschluss daran wurde die Küvette wieder aus dem Elektroporator genommen und 1 ml SOC-Lösung (2.2.14.2.7) zu der Agrobakteriensuspension dazugegeben, und mit dieser gründlich vermischt. Nachdem dieser Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt worden war, wurde dieser für vier Stunden bei 28°C auf einen Schüttler bei 250 U/min. inkubiert.

Abschließend wurden jeweils 100 µl dieser Bakteriensuspension auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz (2.2.14.1) (hier LB-Kn) ausplattiert und für 48 Stunden bei 28°C inkubiert.

2. Material und Methoden

2.3.14.3. Herstellung der Inokulationssuspension

Nach der Inkubationszeit von 48 Std. 28°C wurden Einzelkolonien in 30 ml LB-Kn Flüssigmedium (2.2.14.2.3) überführt und für 14 bis 16 Std. (OD₆₀₀ von 1,0) bei 28°C und 250 U/min. angezogen. Von dieser Agrobaktériensuspension wurden 2 ml in ein 2,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (13000 U/min. für eine Minute) wurde der Überstand verworfen und 2 ml Inokulationspuffer (2.2.13.1) zugegeben. Zur Induktion der *vir*-Genkette wurde das gelöste Bakterienpellet bei Raumtemperatur für vier Stunden unter gelegentlichem leichten Schwenken inkubiert.

2.3.14.4. Agroinfektion durch Injektion

Mit einer 2 ml Einwegspritze ohne Nadel wurde die Inokulationssuspension (2.3.14.3) aufgenommen und von der Blattunterseite her in das Blattgewebe einer Versuchspflanze injiziert. Dabei wurde mit leichtem Druck die Öffnung der Spritze gegen die Blattunterseite gepresst und gleichzeitig das Blatt mit einem Finger von der Blattoberseite stabilisiert. Durch einen langsam verlaufenden Spritzvorgang wurden jeweils etwa 3 cm² große Blattflächen mit der Bakteriensuspension infiltriert. Die 2 ml der Inokulationssuspension (2.3.14.3) wurden pro Versuchspflanze auf mindestens zwei Blätter unterschiedlichen Alters verteilt.

2.3.15. Mechanische Virusübertragung

Bei der mechanischen Inokulation von Pflanzenviren auf neue Pflanzen wurden zunächst einige Blätter der neu zu inokulierenden Pflanzen leicht mit dem Abrasiv „Celite-545“ bestäubt. Von einer virusinfizierten Pflanze wurde Blattmaterial gewonnen, und dieses im 0,03 M HEPES-Puffer (pH 7,0) oder im 0,1 M K/Na-Phosphatpuffer (Puffer siehe Punkt 2.2.2) in einem Verhältnis von 1:5 (v/v) gemörsert. Der so gewonnene Pflanzenpresssaft der virusinfizierten Ausgangspflanze wurde auf die mit dem Abrasiv bestäubten Pflanzen verteilt. Durch die Verwendung der Celite-545 wurden der Blattoberfläche Verletzungen zugefügt, durch die Viren in die Pflanze gelangen und zu einer Infektion führten.

2.3.16. Elektronenoptische Darstellung von Pflanzenviren

2.3.16.1. Herstellung eines Tropfpräparates

Von einer virusinfizierten Pflanze wurde ein Blattstückchen (0,1 g) in 500 µl 0,1 M K/Na-Phosphatpuffer (siehe 2.2.2.2) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Plastikpistill zermörsert. Nach anschließender Zentrifugation (2 min. bei 13000 U/min.) wurden 50 µl des Überstandes auf einen Parafilmstreifen pipettiert. Auf diesen Tropfen wurde ein mit Formvar befilmtes und mit einer Kohleschicht bedampftes Kupfernetz (300 mesh) (siehe Punkt 2.1.3) für 5 min. gelegt. Das Netz wurde anschließend mit einer feinen Pinzette abgenommen und sofort mit 40 Tropfen *A. bidest.* überspült. Die überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig am Netzrand mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurde das Netz mit 7 Tropfen einer 2%igen Uranylacetat-Lösung betropft. Das elektronendichte Material legt sich dabei um die Partikel, so dass später im Elektronenmikroskop ein Negativbild der eigentlichen Struktur beobachtet werden kann. Die überschüssige Flüssigkeit wurde wieder durch Absaugen mit Filterpapier vom Rand her vollständig entfernt, so dass das so vorbereitete Kupfernetz in das Elektronenmikroskop eingesetzt werden konnte.

Mit einer im Elektronenmikroskop eingebauten Kamera konnten Aufnahmen der beobachteten Viren bei einer 58000 fachen Vergrößerung gemacht werden.

2.3.17. Herstellung von Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie

Ein ca. 6 mm² großes Blattstückchen einer *N. benthamiana* -Pflanze, die zuvor mit einem DsRed markierten PVX Vollängenklon (2.1.11) oder den Deletionsmutanten PVX2-Del1 oder PVX2-Del2 (siehe 2.4.1.3 und 2.4.1.4) inokuliert worden war, wurde auf den auf einem Objektträger vorgelegten Tropfen *A. dest.* platziert. Nachdem ein Deckgläschen auf das Blattstück gelegt wurde, konnte die DsRed Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes unter Verwendung eines DsRed Filters beobachtet werden.

2.4. Spezielle Methoden

2.4.1. Erzeugung von „in frame“ Deletionsmutanten des PVX

2.4.1.1. Herstellung der Deletionsmutante PVX1-Del1

Vor der eigentlichen Herstellung dieser Deletionsmutante wurde zunächst der Vektor pLITMUS38i dahingehend modifiziert, indem die vektoreigene *AvaI* Restriktionsschnittstelle durch enzymatischem Verdau, anschließender Klenow-Reaktion (siehe 2.3.8.2) und Religation beseitigt wurde. Dieser so modifizierte Vektor wird im folgenden als pLit-ava bezeichnet.

Nach Restriktion des Volllängenkons pPVX0014 mit den Enzymen *NgoMIV* und *NheI* entstanden zwei Fragmente (7544 bp und 2584 bp), von denen das kleinere über diese Schnittstellen in den Vektor pLit-ava integriert wurde. Anschließend wurde das rekombinante Plasmid einem gleichzeitigen Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *AvaI* und *Bst1107I* unterzogen, gefolgt von einer Klenow-Reaktion. Durch Ligation der stumpfen Enden dieses so modifizierten DNA Fragments, entstand eine Deletion von 27 bp im TGB1 Bereich des PVX-Fragments. Nach Klonierung dieses modifizierten PVX-Fragments in den verbliebenen PVX-Volllängenkons über die Restriktionsschnittstellen *NgoMVI* und *NheI* entstand die PVX-Deletionsmutante PVX1-Del1.

2.4.1.2. Herstellung der Deletionsmutante (PVX1-Del2)

Zunächst wurde eine Modifizierung des Vektors pLITMUS38i vorgenommen, indem die vektoreigene *BsrGI* Restriktionsschnittstelle durch enzymatischem *BsrGI* Verdau, sich anschließender Klenow-Reaktion und Religation entfernt wurde. Der so entstandene Vektor wird im Folgenden pLit-Bsr genannt.

Sowohl der PVX-Volllängenkons (pPVX0014), als auch der Vektor pLit-Bsr wurden einem Verdau mit den Enzymen *NgoMIV* und *NheI* unterzogen. Durch diese Spaltung entstanden aus den PVX-Volllängenkons zwei Fragmente (7544 bp und 2584 bp) von

denen das kleinere über die genannten Restriktionsschnittstellen in den Vektor pLit-Bsr kloniert wurde.

Im Anschluss daran wurde dieses rekombinante Plasmid einem enzymatischen *BsrGI* Verdau unterzogen. Aufgrund der doppelt vorkommenden Restriktionsschnittstelle im Bereich der PVX-TGB2 Sequenz entstand nach Religation dieses Fragments eine Deletion von 141 bp. Dieses modifizierte PVX Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *NgoMIV* und *NheI* mit dem am Anfang erhaltenen unveränderten 7544 bp PVX-Fragment religiert.

2.4.1.3. Herstellung der Deletionsmutante PVX2-Del1

Durch einen gleichzeitigen enzymatischen Verdau des Vollängenklons pPVX-DsRed durch die Restriktionsendonukleasen *Bsp120I* und *Bsu36I* entstanden drei Fragmente, von denen die beiden kleineren verworfen wurden. Das größte Fragment wurde nach Elution aus einem Agarosegel einer Klenow Reaktion unterzogen. Durch anschließender Religation dieses stumpf-endenden DNA Fragments entstand eine Deletion von 342 bp im Bereich der PVX-TGB1 Sequenz.

2.4.1.4. Herstellung der Deletionsmutante PVX2-Del2

Sowohl der Vollängenklon pPVX-DsRed als auch der Vektor pBluescript II KS(+) wurden zunächst einem enzymatischen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bsp120I* und *ClaI* unterzogen. Aus dem PVX-Vollängenklon entstanden zwei Fragmente (9839 bp und 724 bp), von denen das kleinere über die gemeinsamen Schnittstellen in den Vektor pBluescript II KS(+) integriert wurde. Dieses rekombinante Plasmid wurde anschließend mit dem Enzym *BsrGI* verdaut. Aufgrund des zweimaligen Vorkommens der *BsrGI* Restriktionsschnittstelle innerhalb der TGB2 Sequenz konnte nach diesem enzymatischen Verdau und der sich anschließenden Religation eine Deletion von 141 bp im PVX-TGB2 Genombereich erzeugt werden.

2. Material und Methoden

2.4.2. Herstellung der PVM-PVX Chimären

Aus Blattmaterial einer PVM infizierten Tomate (*S. lycopersicon* cv. Lizzy) wurde zunächst die Gesamt-RNA extrahiert (vgl. Punkt 2.3.6.2). Diese wurde in einer RT-PCR unter Verwendung der Primer PVMXup und PVMXlow (Tabelle 11) und eines Polymerasemixes eingesetzt. Dieser bestand aus einer 10:1 (v/v) Mischung aus *Taq*-DNA-Polymerase und *Pfu*-DNA-Polymerase (beide von Promega, siehe Tabelle 13), und wird im Folgenden bei der Angabe der Zusammensetzung des PCR-Mixes als *Taq* / *Pfu* Mix bezeichnet.

PCR-Mix:

1 µl	RNA-Lösung	(siehe 2.3.6.2).
5 µl	10x PCR-Puffer (Promega)	(vgl. 2.2.7.7)
5 µl	MgCl ₂ -Lösung	(25 mM)
1 µl	PVMXC Pup	(10 µM)
1 µl	PVMXC Plow	(10 µM)
0,5 µl	dNTP-Mix	(je 25 mM)
0,5 µl	Taq / PFU Mix (5 U/µl)	(Tabelle 13)
0,1 µl	AMV-RT (10 U/ µl; Promega)	(Tabelle 13)
ad 50 µl mit <i>A. bidest.</i>		

Folgendes PCR Programm fand für die Amplifikation des PVM-CP Fragments Verwendung:

PCR-Programm:

1. Schritt:	42°C für 40 min.
2. Schritt:	94°C für 3 min.
3. Schritt (35 Zyklen):	94°C für 40 sec. 58°C für 30 sec. 72°C für 70 sec.
4. Schritt:	72°C für 10 min.
5. Schritt:	4°C (unendlich)

Dieses 922 bp große PVM-CP Fragment wurde zunächst über die in den Primern enthaltenen Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Xho*I in den Vektor pBluescript II KS(+) kloniert und sequenziert.

In einem daran anschließenden Klonierungsschritt wurde dieses Fragment über die oben genannten Restriktionsschnittstellen in das zuvor mit den Restriktionsendonukleasen *Nhe*I und *Xho*I verdaute Plasmid pPVX0014 integriert. Der so entstandene hüllproteinchimäre Vollängenklon (pPVX/M-CP) wurde durch mehrere enzymatische Restriktionsverdaue überprüft und bestätigt.

2.4.3. Herstellung eines PVM Vollängenklons

Aus Blattmaterial einer PVM infizierten *N. hesperis* Pflanze wurde zunächst die Gesamt-RNA extrahiert (siehe Punkt 2.3.6.2).

In zwei getrennten Ansätzen wurde die virale RNA mit Hilfe des Enzyms „Expand Reverse Transcriptase“ (Roche) und unter Verwendung der Primer PVM3as bzw. PVMSFas (siehe Tabelle 8) in cDNA transkribiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.4.3.1. cDNA Synthese

Für jede cDNA Synthese wurden zunächst zwei getrennte Teilansätze hergestellt. Zur Denaturierung der RNA und der Primer wurden diese Lösungen in einem ersten PCR-Reaktionsgefäß (Tube 1) zusammen mit *A. bidest.* vermischt und für 10 min. bei 65°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz sofort schlagartig durch Überführung in ein Eisbad abgekühlt.

Währenddessen wurde ein zweiter Teilreaktionsansatz (Tube 2, siehe unten) hergestellt. Nach gründlichem Durchmischen wurde dieser in das Tube mit der denaturierten RNA überführt, und es erfolgte eine Inkubation für 60 min. bei 43 °C.

2. Material und Methoden

Tube 1:

1 µl	RNA Lösung	(siehe 2.3.6.2)
1 µl	Primer (as)	(10 µM)
10,2 µl	<i>A. bidest.</i>	

PVM3as und PVMSFas (Tabelle 8) fanden als antisense Primer Verwendung.

Tube 2:

4 µl	5x RT-Puffer	(siehe 2.2.7.6)
2 µl	DTT - Lösung	(100 mM)
0,8 µl	dNTP- Mix	(je 25 mM)
0,5 µl	RNAse Inhibitor	(40 U/µl, siehe Tabelle 13)
0,5 µl	Expand-RT (Roche)	(50 U/µl, siehe Tabelle 13)

2.4.3.2. Amplifikation von DNA Fragmenten des PVM

Nach erfolgter cDNA Synthese (siehe 2.4.3.1) wurden mit Hilfe der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Phusion-DP) ein ca. 3,2 kbp und ein ca. 5,5 kbp Fragment amplifiziert. Der PCR Ansatz und das verwendete PCR-Programm sind im Folgenden beschrieben.

2.4.3.2.1. PCR Ansatz für die Amplifikation der PVM Fragmente

0,4 µl	cDNA	(siehe 2.4.3.1)
0,2 µl	dNTP - Mix	(je 25 mM)
0,4 µl	Primer (s)	(10 µM)
0,4 µl	Primer (as)	(10 µM)
0,6 µl	DSMO	
0,2 µl	Phusion-DP	(siehe Tabelle 13)
4 µl	5x HF Puffer	
ad 20 µl mit <i>A. bidest.</i>		

Die Zusammensetzung des 5x HF Puffers wird vom Hersteller nicht angegeben.

Für die Amplifikation des ca. 3,2 kbp langen PVM-Fragments fanden die Primer PVMSF2s und PVM3as Verwendung, während für die Amplifikation des ca. 5,5 kbp langen PVM-Fragments die Primer PVM1s und PVMSFas benutzt wurden. Es wurde jeweils die cDNA eingesetzt, bei deren Synthese zuvor derselbe Primer (as) verwendet worden war. Die Sequenz der Primer kann aus Tabelle 8 entnommen werden.

2.4.3.2.2. PCR-Programm zur Amplifikation der PVM-Fragmente

- | | |
|-------------------------|--|
| 1. Schritt: | 98°C für 30 sec. |
| 2. Schritt (35 Zyklen): | 98°C für 10 sec.
Y°C für 20 sec.
72°C für X sec. |
| 3. Schritt: | 72°C für 10 min. |
| 4. Schritt: | 4°C (unendlich) |

Bei der Amplifikation des ca. 3,2 kbp langen Fragments betrug die Dauer des „Elongationsschrittes“ (X) 180 sec. und die „Annealingtemperatur“ (Y) 60°C. Bei der Amplifikation des ca. 5,5 kbp langen Fragments betrug X 315 sec. und Y 65 °C.

2.4.3.3. Klonierung der PVM Fragmente

Das ca. 3,2 kbp lange PVM-Fragment, welches das hintere Drittel und das 3'-Ende des Virusgenoms repräsentierte, wurde aus einem Agarosegel eluiert (2.3.5.5) und anschließend einem A-Tailing unterzogen (2.3.8.1). Das so modifizierte DNA Fragment wurde in den T-Vektor (pBC-T) kloniert (siehe 2.3.9.3) und nachfolgend sechs rekombinante Plasmide zu einer Mischprobe vereinigt (pBC-T-PVM-3kb).

2. Material und Methoden

Das ca. 5,5 kbp PVM-Fragment, welches das 5'-Ende und die ersten zwei Drittel des PVM Genoms widerspiegelt, wurde über die in den Primern PVM1s und PVMSFas integrierten Restriktionsschnittstellen (*AscI* und *XbaI*) in den Vektor pe35AscIRibo.2 kloniert. Fünf rekombinante Plasmide (pe35AscIRibo.2-PVM-5kb, kurz: pe35-PVM-5kb) wurden zu einer Mischprobe vereinigt.

2.4.3.4. Ligation der PVM Fragmente

Die beiden Mischproben der rekombinanten Plasmide (pBC-T-PVM-3kb und pe35-PVM-5kb) wurden einem gleichzeitigen enzymatischen Verdau mit den Restriktionsendonukleasen (*AflIII* und *XbaI*) unterzogen. Nach Elution des ca. 3,2 kb großem PVM Fragments aus einem Agarosegel (2.3.5.5), wurde dieses über die gemeinsamen Restriktionsschnittstellen in das rekombinante Plasmid pe35-PVM-5kb direkt hinter das ca. 5,5 bp große PVM Fragment kloniert.

Auf dieser Weise konnten insgesamt 21 rekombinante Plasmide hergestellt werden, bei denen das vollständige PVM Genom im Vektor pe35AscIRibo.2 integriert werden konnte. Diese werden im Folgenden als pe35+PVM_1 bis pe35+PVM_21 bezeichnet.

2.4.3.5. Integration der PVM-Sequenz in den binären Vektor

Eine Mischprobe aus den 21 rekombinanten Plasmiden pe35+PVM (siehe 2.4.3.4) wurde zunächst mit dem „Plasmid Purification Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Nach einem sich daran anschließenden enzymatischem Verdau (*ClaI* und *XbaI*) entstanden zwei Fragmente (9365 bp und 2855 bp), von denen nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel die ca. 9,4 kbp Bande eluiert (2.3.5.5) wurde. Dieses Fragment enthielt sowohl die vorgelagerten 35S CaMV Promotorensequenzen als auch die vollständige PVM Sequenz und wurde über die oben genannten Restriktionsschnittstellen in den modifizierten binären Vektor pBIN-SN integriert.

Auf dieser Weise entstanden insgesamt 10 rekombinante Plasmide, die als pBIN+PVM bezeichnet werden.

3. Ergebnisse

3.1. Abundanz und Variabilität der natürlicherweise auftretenden Viruspopulationen während den Freisetzungen 2001-2004

Zur Ermittlung der jährlichen Abundanzen der fünf verschiedenen Kartoffelviren in den Pflanzen der transgenen und nicht-transgenen Linien wurde zunächst eine stichprobenartige serologische Überprüfung des Pflanzgutes der transgenen und der nicht-transgenen Vergleichsvariante der Sorte Désirée durchgeführt. Während der Wachstumsphase wurden sämtliche Kartoffelpflanzen auf dem Freisetzungsgelände visuell auf Virusinfektionen hin überprüft, und zusätzlich fanden jährlich serologische Nachernteuntersuchungen von Knollen aller 12 Kartoffelvarianten statt, die von der Freisetzungsfäche geerntet worden waren.

3.1.1. Stichprobenartige Überprüfung des Pflanzgutes

Aus Miniknollen der sechs transgenen Kartoffelvarianten, sowie der nicht-transgenen Vergleichsvariante Désirée WT 1 wurden jährlich Augenstecklinge hergestellt, aus denen sich nach Keimruhebrechung, hervorgerufen durch eine Gibberellinsäurebehandlung, binnen weniger Wochen Kartoffelpflanzen entwickelten. Blattmaterial dieser Pflanzen wurde vor den Freisetzungen 2002 bis 2004 serologisch auf Infektionen mit PVM, PVY, PVS, PVX und PLRV hin untersucht. Zusätzlich gab es von den Freisetzungen 2003 und 2004 Knollen aus dem Pflanzgut der übrigen Vergleichsvarianten, die auf herkömmliche Art erzeugt und über den Handel für die Freisetzungen zugekauft worden waren.

Während für die Freisetzung 2002 jeweils 100 Knollen pro transgener Variante und deren nicht transformierter Vergleichslinie (Désirée WT 1) zur Verfügung gestellt wurden, betrug die Knollenanzahl dieser Linien für die Freisetzung 2003 nur 25 und im dritten Jahr 50 Knollen pro Variante. Zusätzlich verringerte sich die Anzahl an zu untersuchenden Knollen, da viele trotz Gibberellinsäurebehandlung nicht zum Keimen gebracht werden konnten (ca. 17% der untersuchten Kartoffeln der Freisetzung 2003).

3. Ergebnisse

Von den herkömmlich erzeugten Linien Désirée (WT 2), Agria, Granola und Solara, konnten nur für die Freisetzungen 2003 und 2004 jeweils 40 Knollen pro Variante des auf der Freisetzungsfäche verwendeten Pflanzgutes überprüft werden.

Die Untersuchungen sollten einen Überblick liefern, in welchem Umfang die Knollen für die Freisetzungen bereits mit verschiedenen Kartoffelviren belastet waren. Eine zusammenfassende Übersicht der Knollenvortestungen gibt Tabelle 25.

Die ermittelten Anteile an virusinfizierten Knollen waren in den einzelnen Jahren unterschiedlich hoch. Während bei den Untersuchungen für die Freisetzung 2002 und 2003 gelegentlich PVX und in etwas stärkerem Umfang PVY Infektionen festgestellt wurden, waren bei der Überprüfung der Knollen für die Freisetzung 2004 die transgenen Varianten der Sorte Désirée und ihre nicht transformierte Vergleichslinie (WT 1), sowie die beiden konventionellen Vergleichsvarianten Agria und Solara frei von Virusinfektionen.

Der Anteil virusbefallener Knollen variierte von Jahr zu Jahr. Von insgesamt 652 untersuchten Knollen für die Freisetzung 2002 wiesen nur 13 Knollen Virusinfektionen auf, was einem Anteil von 2% entspricht. Bei den Knollen für die Freisetzung 2003 wurden 308 Knollen untersucht, von denen ca. 8,4% (26 Knollen) eine Virusinfektion aufwiesen, während bei den Untersuchungen für die Freisetzung 2004 insgesamt 13 infizierte Knollen von insgesamt 535 untersuchten als virusinfiziert eingestuft wurden und sich so ein Anteil von 2,4% ergab.

Tabelle 25: Ergebnisse der Knollenvortestungen für die Freisetzen 2002 - 2004

Kartoffelvariante	Testung für die Freisetzung	Anzahl testbarer / gelieferter Knollen	Anzahl Knollen ohne Befund	Anzahl virusinfizierter Knollen	Art der Virusinfektion
Désirée SST#18	2002	93/100	92	1	PVS+PVY
	2003	19/25	17	2	PVX, PVY
	2004	50/50	50	0	
Désirée SST#36	2002	99/100	99	0	
	2003	21/25	20	1	PVY
	2004	50/50	50	0	
Désirée SST#20	2002	89/100	87	2	2x PVY
	2003	15/25	15	0	
	2004	50/50	50	0	
Désirée SST/FFT#22/19	2002	90/100	90	0	
	2003	20/25	18	2	PVX, PVY+PVX
	2004	50/50	50	0	
Désirée SST/FFT#22/30	2002	93/100	92	1	PVY
	2003	23/25	21	2	2xPVY
	2004	50/50	50	0	
Désirée SST/FFT#22/34	2002	93/100	89	4	2x PVY, 1x PVS, 1x PVX
	2003	24/25	20	4	2xPVY+PVX, PVX, PVY
	2004	50/50	50	0	
WT 1 zu Désirée SST/FFT	2002	95/100	90	5	5x PVY
	2003	20/25	18	2	PVX, PVY
	2004	50/50	50	0	
WT 2 zu Désirée	2003	32/40	30	2	2xPVY
	2004	39/40	32	7	1xPVS+PVY, 6xPVY
Granola	2003	38/40	37	1	PVY
	2004	38/40	34	4	4xPVY
Agria	2003	33/40	26	7	7xPVY
	2004	36/40	36	0	
Linda	2003	35/40	32	3	3xPVY
	2004	35/40	33	2	2xPVY
Solara	2003	28/40	28	0	
	2004	37/40	37	0	

Die Anteile an infizierten Knollen aller transgenen, wie auch aller nicht-transgenen Knollen, wiesen zwischen den Untersuchungsjahren deutliche Schwankungen auf. So lagen die Anteile virusinfizierter Knollen in der Gruppe der nicht-transgenen Kartoffeln

3. Ergebnisse

in den einzelnen Jahren zwischen 5% und 8%, während die Anteile bei den transgenen Knollen für die Freisetzung 2002 bei 1,5%, 2003 bei ca. 9% lagen und für die Freisetzung 2004 bei 0%, da keine infizierten Knollen gefunden wurden (siehe Abb. 10). Bei den konventionellen Vergleichssorten (Désirée WT 2, Agria, Granola, Linda und Solara) konnte in beiden Untersuchungs Jahren bei der Sorte Solara keine virusinfizierte Knolle gefunden werden, während bei den übrigen konventionell produzierten Kartoffeln Schwankungen bezüglich des Virusbefalls festgestellt wurden.

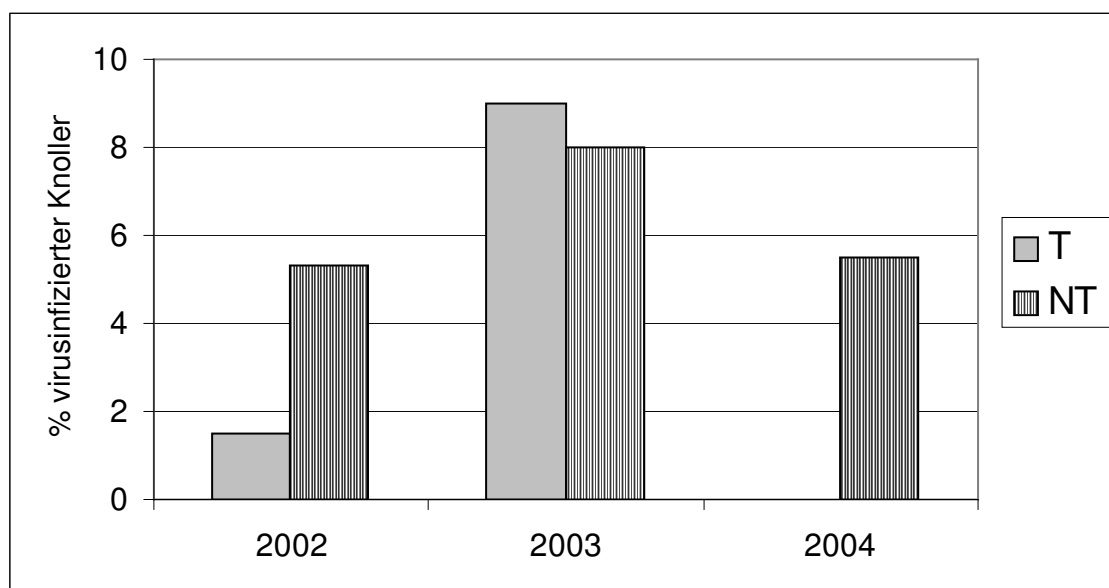


Abb. 10: Schematische Darstellung der Anteile (in %) an virusinfizierten Knollen innerhalb aller untersuchten Knollen der transgenen Linien (T) und aller nicht-transgenen Linien (NT).

Für die Freisetzung 2002 standen von den nicht-transgenen Varianten nur Knollen der Variante Désirée WT 1 zur Verfügung. Während von den konventionellen nicht-transgenen Varianten jeweils 40 Knollen für die Untersuchungen zur Verfügung standen, variierte die Anzahl Knollen der transgenen Varianten und ihrer nicht-transformierten Vergleichslinie (WT 1) von Jahr zu Jahr.

3.1.2. Ermittlung virusinfizierter Pflanzen in den Freisetzungen

Jährlich wurden alle 4608 Pflanzen [96 Pflanzen je Variante (*12) pro Block (*4)] der Freisetzungen im Rahmen einer visuellen Bonitur auf Virusinfektionen hin überprüft. Dabei wurde bei den Pflanzen besonders auf Blatt- und Wuchsdeformationen sowie auf Mosaiksymptome auf den Blättern geachtet. Bei den Vollerhebungen zeigte sich immer,

dass nur ein sehr geringer Teil aller untersuchten Pflanzen eine erkennbare Virusinfektion aufwies. Dieser Anteil lag bei den Freisetzungen 2001 und 2003 jeweils bei 2% der Pflanzen und war bei der Freisetzung 2004 mit 1,2% noch geringer (siehe Tabelle 26).



Abb. 11: Aufnahme von der Freisetzung 2003. Im Vordergrund ist ein Teilbereich der Kartoffelparzelle des Blockes C zu erkennen. Im Hintergrund können die Parzellen des Blockes B erkannt werden.

3. Ergebnisse

Tabelle 26: Visuelle Bonitur des Gesamtbefalles (Pflanzen mit Symptomen sowie Anzahl serologisch überprüfter Blattproben, die als virusverdächtig eingestuft wurden)

Variante	Freisetzung	Block				Summe
		A	B	C	D	
		B (P)	B (P)	B (P)	B (P)	B (P)
Désirée SST#18	2001	0	0*	0	0	0 (0)
	2003	2 (2)	0	0	0	2 (2)
	2004	0	1 ^{SY} (1)	0	0	1 (1)
Désirée SST#36	2001	0	0*	0*	0	0 (0)
	2003	4 (4)	2 (2)	5 (4)	2 (2)	13 (12)
	2004	0	0	0	0	0 (0)
Désirée SST#20	2001	2	4 (2)	1*	1 (1)	8 (3)
	2003	0	0	2 (2)	0	2 (2)
	2004	1 (1)	0	1 (1)	0	2 (2)
Désirée SST/FFT#22/19	2001	2	0*	4	1 (1)	7 (1)
	2003	0	0	0*	0	0 (0)
	2004	0	0*	0*	0	0 (0)
Désirée SST/FFT#22/30	2001	3	2 (1)	0	2 (2)	7 (3)
	2003	0	0	1 (1)	0	1 (1)
	2004	0	0*	0	0*	0 (0)
Désirée SST/FFT#22/34	2001	2 (2)	0	0*	0*	2 (2)
	2003	5 (4)	12 (5)	7 (5)	4 (2)	28 (16)
	2004	0	0	0	0	0 (0)
WT 1 zu Désirée SST/FFT	2001	11	1 (1)	1	0*	13 (1)
	2003	1 (1)	1 (1)	2 (2)	0	4 (4)
	2004	0	0	0	0	0 (0)
WT 2 zu Désirée	2001	3 (2)	5 (2)	1 (0)	6 (2)	15 (6)
	2003	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	6 (6)
	2004	5 ^{LY} (4)	4 (3)	2 (2)	6 (4)	17 (13)
Granola	2001	1	0	0*	0*	1 (0)
	2003	0*	0	0*	0*	0 (0)
	2004	1 (1)	4 (2)	1 (1)	6 (5)	12 (9)
Agria	2001	2	1	1	0	4 (0)
	2003	4 (4)	1 (1)	8 (6)	7 (4)	20 (15)
	2004	0	0	1 (1)	1 (1)	2 (2)
Linda	2001	9 (4)	9 (1)	6	13 (2)	37 (7)
	2003	6 (4)	4 (4)*	5 (3)	1 (1)	16 (12)
	2004	0	4 (2)	11 (6)	7 (5)	22 (13)
Solara	2001	1 (0)	1 (0)	0	0	2 (0)
	2003	0	0*	0	0	0 (0)
	2004	0	0	1 ^M (1)	0*	1 (1)

Legende: B = virusinfiziert bonitiert, P = Blattprobe(n) serologisch positiv

* = es wurden einzelne Blattproben entnommen, die nicht als virusinfiziert galten, bei denen serologisch auch kein Virus nachgewiesen werden konnte.

M = eine Pflanze mit einer PVM Infektion; SY = eine Pflanze mit einer PVS+PVY-Doppelinfektion; LY = eine Pflanze mit einer PLRV+PVY –Doppelinfektion

Bei den visuellen Bonituren der Freisetzungen 2001, 2003 und 2004 wurden die Anzahl viruskranker Pflanzen pro Variante und Block festgestellt. Von den insgesamt 96

Pflanzen (2,1% aller 4608 Kartoffelpflanzen), die bei der Freisetzung 2001 als virusinfiziert eingestuft worden waren, gehörten die Meisten (72) nicht-transgenen Vergleichslinien an. Bei der Freisetzung 2003 war die Zahl transgener und nicht-transgener virusinfizierter Pflanzen mit jeweils 46 gleich hoch. Der Gesamtanteil an virusinfizierten Knollen lag wieder bei ca. 2%. In der Freisetzung 2004 konnten insgesamt 57 Pflanzen (1,2%) mit einer Infektion festgestellt werden, von denen nur drei transgenen Kartoffelvarianten angehörten.

3.1.3. Ermittlung der Häufigkeit verschiedener Viren im Freisetzungsversuch

Von der Freisetzung 2001 sind insgesamt 34 Blattproben stichprobenhaft durch eine serologische Untersuchung analysiert worden. 23 Proben wurden als potenziell PVY-infiziert eingestuft, bei 11 Blattproben lag ein Verdacht auf eine PLRV Infektion vor, da die Pflanzen ein starkes Blattrollen zeigten.

Bei der Überprüfung der Proben mittels DAS-ELISA (Test auf PVM, PVX, PVY, PLRV, PVS) konnten nur bei den ersten 23 Proben PVY-Einfachinfektionen und bei den übrigen Blattproben keine Virusinfektionen festgestellt werden.

Da sich die Übrigen als virusinfiziert eingestuften Pflanzen der Freisetzung 2001 nicht durch ihre Symptomausprägung von denjenigen unterschieden, deren Blattmaterial für die serologische Untersuchung verwendet worden war, kann davon ausgegangen werden, dass diese auch eine PVY-Infektion aufgewiesen haben. In den übrigen Jahren wurde von fast sämtlichen als virusinfiziert bonitierten Pflanzen eine Blattprobe serologisch im Labor untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass alle untersuchten Proben der Freisetzung 2003 nur PVY-Einfachinfektionen aufwiesen. Ebenfalls konnten im Rahmen dieser serologischen Untersuchung der Proben aus der Freisetzung 2004 fast ausschließlich PVY-Infektionen festgestellt werden. Wie aus Tabelle 26 zu entnehmen ist, wies lediglich eine Pflanze der Sorte Solara aus dem Block C eine PVM Infektion auf, während in zwei weiteren Pflanzen neben der PVY-Infektion zusätzlich eine weitere Virusinfektion identifiziert werden konnte (Désirée SST#18 (Block B): PVS+PVY (SY)) und eine Pflanze des WT 2 zu Désirée (Block A): PLRV+PVY (LY).

3. Ergebnisse

PVX Infektionen konnten in keiner Blattprobe festgestellt werden (Tabelle 26).

Von jeder Freisetzung wurden zusätzlich einige Blattproben von solchen Pflanzen, die bei den Bonituren aufgrund ihrer ungewöhnlichen Wachstums- oder Blattrollerscheinungen ins Auge fielen, serologisch auf Infektionen mit den oben genannten Viren untersucht (vergleiche Tabelle 26). Diese Pflanzen wurden während der Bonitur als nicht-infiziert eingestuft, was sich durch die Laboruntersuchungen bestätigte. Bei keiner dieser Proben konnte eines der o. g. Viren festgestellt werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass diese Erscheinungen andere physiologische oder abiotische Ursachen haben mussten.

3.1.3.1. Korrelation zwischen erwarteten und vorgefundenen Befallshäufigkeiten

Die durch die Knollenvortestungen errechneten Anteile virusinfizierter (Gesamtbefall) und nur PVY infizierter Knollen (bzw. Pflanzen) wurden denjenigen der Feldbonituren gegenübergestellt und miteinander verglichen (siehe Tabelle 27). Da bei den serologischen Untersuchungen im Rahmen der Knollenvortestungen zum überwiegenden Teil nur PVY Infektionen festgestellt werden konnten, liegen in den meisten Fällen Übereinstimmungen zwischen den erwarteten Häufigkeiten des Gesamtbefalls und den erwarteten PVY-Infektionshäufigkeiten vor. Nur bei der Freisetzung 2003 konnten bei den Varianten Désirée SST#18 und Désirée SST/FFT#22/19 und Désirée WT 1 größere Unterschiede zwischen diesen Werten vorgefunden werden (siehe Tabelle 27).

Während für die Freisetzungen 2001 und 2002 nicht verfügbare Daten keine Vergleiche zwischen erwarteten und vorgefundenen Befallshäufigkeiten erlaubten, zeigten die Daten für die Freisetzung 2003, dass nur bei den Varianten Désirée SST#36, Désirée SST#20 und Solara der auf der Freisetzung vorgefundene Gesamt- und PVY-Befall mit denen durch die Knollenvortestungen erwarteten relativ gut übereinstimmten. Bei allen übrigen Kartoffelvarianten wurden auf der Freisetzung deutlich weniger infizierte Pflanzen bonitiert, als aufgrund der Knollenvortestung erwartet worden wären. Der

Vergleich zwischen den erwarteten und vorgefundenen PVY Infektionshäufigkeiten zwischen den einzelnen Varianten wird in Abb. 12 gezeigt.

Obwohl der Probenumfang bei den konventionell erzeugten Sorten bei der Knollenvortestung für die Freisetzung 2003 deutlich höher lag als bei den übrigen Varianten, überstieg der Anteil erwarteter infizierter Kartoffelpflanzen deutlich den visuell als virusinfiziert eingestuften Pflanzen innerhalb dieser Varianten. Bei den nicht transgenen Vergleichsvarianten konnte nur bei der Sorte Solara eine Übereinstimmung zwischen den erwarteten und vorgefundenen Befallshäufigkeiten des Gesamt- und PVY- Befalls ermittelt werden. In allen Untersuchungen und in allen Jahren konnte immer wieder festgestellt werden, dass die Sorte Solara mit Abstand die niedrigsten Befallswerte aufwies.

Im Rahmen der Knollenvortestungen für die Freisetzung 2004 konnten fast nur PVY Infektionen festgestellt werden (vergleiche Tabelle 25), so dass die Gesamt- und PVY- Befallsdaten identisch sind. Diese deckten sich gut mit denen auf der Freisetzung ermittelten Boniturdaten der transgenen Varianten, ihrer nicht transformierten Vergleichslinie (Désirée WT 1) und den konventionellen Varianten Linda, Agria und Solara (vergl. Abb. 13). Bei den beiden übrigen Varianten (Désirée WT 2 und Granola) konnten bei Durchführung der visuellen Bonitur deutlich weniger infizierte Kartoffelpflanzen als erwartet vorgefunden werden.

3. Ergebnisse

Tabelle 27: Vergleich der Anteile (in %) an infizierten Pflanzen (bzw. Knollen) pro Variante und Jahr bei der Knollenvortestung und bei der visuellen Bonitur

Variante	Jahr	Gesamtbefall* (und davon abweichender PVY-Befall) in % [Knollenvortestungen]	Gesamtbefall * (und davon abweichender PVY-Befall) in % [Bonitur Freisetzung]
Désirée SST#18	2003	10,5 (5,6)	0,5
	2004	0	0,3
Désirée SST#36	2003	4,8	3,4
	2004	0	0
Désirée SST#20	2003	0	0,5
	2004	0	0,5
Désirée SST/FFT#22/19	2003	10 (5)	0
	2004	0	0
Désirée SST/FFT#22/30	2003	8,7	0,3
	2004	0	0
Désirée SST/FFT#22/34	2003	16,7 (12,5)	7,3
	2004	0	0
WT 1 zu Désirée SST/FFT	2003	10 (5)	1
	2004	0	0
WT 2 zu Désirée	2003	6,3	1,6
	2004	18	4,4
Granola	2003	2,6	0
	2004	10,5	3,1
Agria	2003	21,2	5,2
	2004	0	0,5
Linda	2003	8,6	4,2
	2004	5,7	5,7
Solara	2003	0	0
	2004	0	0,3 (0)

* = In den Fällen, bei denen der Gesamtbefallswert nicht mit dem PVY-Befallswert identisch war, wurde letzterer in Klammern hinter dem Gesamtbefallswert aufgeführt.

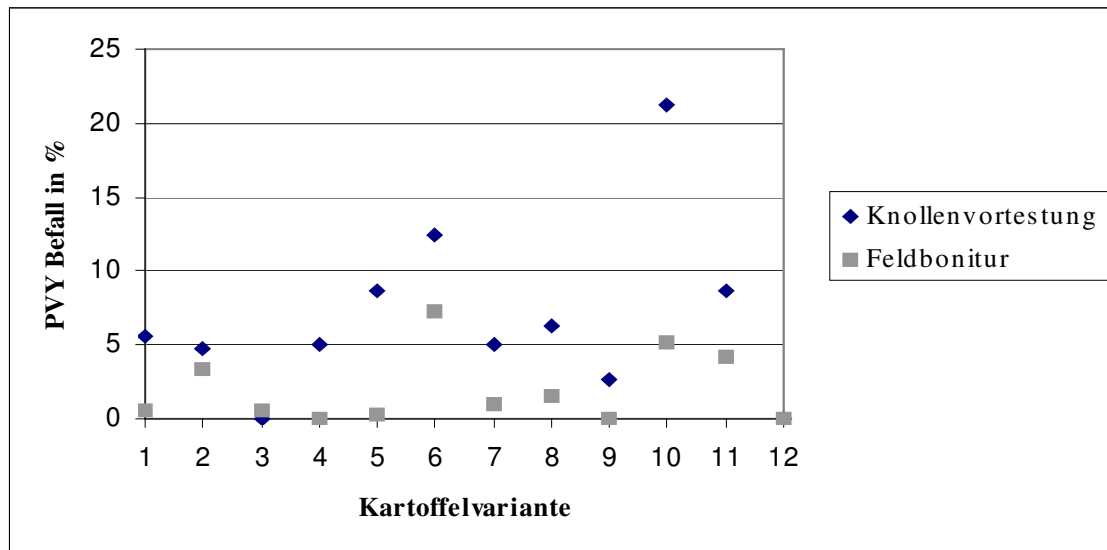


Abb. 12: Vergleich der Ergebnisse der Knollenvortestung mit denen der visuellen Bonitur von PVY Infektionen in der Freisetzung 2003

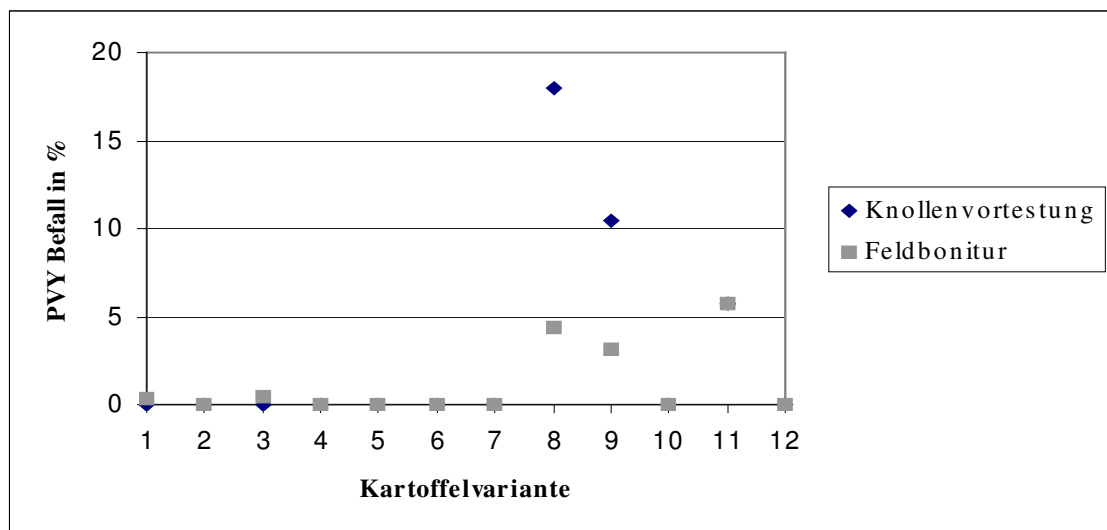


Abb. 13: Vergleich der Ergebnisse der Knollenvortestung mit denen der visuellen Bonitur von PVY Infektionen in der Freisetzung 2004

Legende zu Abb. 12 und Abb. 13:

1 = Désirée SST#18, 2 = Désirée SST#36, 3 = Désirée SST#20, 4 = Désirée SST/FFT#22/19, 5 = Désirée SST/FFT#22/30, 6 = Désirée SST/FFT#22/34; 7 = Désirée WT 1, 8 = Désirée WT 2, 9 = Granola, 10 = Agria, 11 = Linda, 12 = Solara

3. Ergebnisse

Im Laufe einer Vegetationsperiode können Pflanzenviren im Bestand von Blattläusen und durch Kulturmaßnahmen auf andere Pflanzen übertragen werden (Sekundärinfektion). Durch eine systemische Ausbreitung der Viren innerhalb der Pflanze gelangen diese schließlich auch in die neu gebildeten Knollen. Im Rahmen einer serologischen Nachernteuntersuchung einer Stichprobe solcher Knollen können Rückschlüsse auf die während einer Freisetzung vorgekommenen Pflanzenviren, sowie auf ihre relativen Häufigkeiten gezogen werden. Außerdem lassen sich so Unterschiede in den Befallshäufigkeiten der verschiedenen Kartoffelvarianten herausfinden.

3.1.4. Nachernteuntersuchungen

Es wurden jeweils 25 Augenstecklinge pro Variante und Block mittels DAS-ELISA, PTA-ELISA oder TPIA auf Vorhandensein der Viren PVM, PVY, PVS, PVX und PLRV untersucht. Die 1200 Stecklinge gingen aus zufällig geernteten Knollen der Freisetzungsfläche hervor. Die Ergebnisse der Sekundärinfektionstestung für das Jahr 2001 zeigt Tabelle 28.

Aufgrund der Zerstörung der Freisetzung 2002 konnten keine Knollen von der eigentlichen Freisetzung untersucht werden. Da aber die begehbaren Käfige für die Kartoffelkäferuntersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe des Fructankartoffelverbundes von der Zerstörung verschont blieben, in denen sich auch wenige Pflanzen jeder Variante befanden, konnten aus ihnen Knollen geerntet und serologisch auf Infektionen mit den verschiedenen Viren überprüft werden. Allerdings standen für diese Untersuchungen insgesamt nur 300 Knollen (25 Knollen pro Variante) zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Sekundärinfektionstestungen sind in Tabelle 29 gezeigt.

Die Tabelle 30 und die Tabelle 31 zeigen die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der Sekundärinfektionstestungen der Jahre 2003 und 2004, die wiederum im vollem Umfang mit insgesamt 1200 Knollen durchgeführt werden konnten. Aus den Tabellen der einzelnen Sekundärinfektionen lässt sich ersehen, dass PVY bei allen Freisetzungen der Hauptvertreter war. Deshalb werden die PVY-Infektionen pro Block noch einmal gesondert in Tabelle 32 aufgelistet.

Tabelle 28: Virusbefall von Kartoffelknollen anhand der Nacherntetesting 2001

Variante	Block	Einfachbefall				Mehrfachbefall			Summe
		PVY	PVM	PVS	PVX	PVY+PVS	PLRV+PVY	PVY+PVS+PVX	
Désirée SST#18	A	1				1			2
	B	8				3			11
	C	9		2					11
	D	7		1					8
Désirée SST#36	A	13							13
	B	10							10
	C	11							11
	D	11							11
Désirée SST#20	A	12	1	1		1			15
	B	8				5			13
	C	17				2			19
	D	16				1	1		18
Désirée SST/FFT#22/19	A	12		1		3		1	17
	B	8				2			8
	C	5							5
	D	13							13
Désirée SST/FFT#22/30	A	12							12
	B	11		1		2			14
	C	17							17
	D	14		1					15
Désirée SST/FFT#22/34	A	13	4			1			18
	B	13		1					14
	C	8		2					10
	D	7		4		1			12
Désirée WT1	A	11			1	4			16
	B	9		1		1			11
	C	11		1					12
	D	15							15
Désirée WT2	A	9				1			10
	B	20		1		3			24
	C	11				3			14
	D	18							18
Granola	A			6					6
	B	8							8
	C	6							6
	D			1					1
Agria	A	11		4		1			16
	B	8							8
	C	14							14
	D	4							4
Linda	A	18		1		1			20
	B	12				9			21
	C	23					1		24
	D	24				1			25
Solara	A	2							2
	B			1					1
	C			2					2
	D								0

3. Ergebnisse

Tabelle 29: Virusbefall von Kartoffelknollen anhand der Nacherntetestung 2002

Variante	PVY	PLRV	Summe
Désirée SST#18	10		10
Désirée SST#36	11	1	12
Désirée SST#20	13		13
Désirée SST/FFT#22/19	12		12
Désirée SST/FFT#22/30	15		15
Désirée SST/FFT#22/34	12		12
Désirée WT 1	16		16
Désirée WT 2	4		4
Granola	6		6
Agria	3		3
Linda	11		11
Solara	0		0

Tabelle 30: Virusbefall von Kartoffelknollen anhand der Nacherntetestung 2003

Variante	Block	Einfachbefall			Mehrfachbefall	Summe
		PVY	PVM	PVS	PVY+PVS	
Désirée SST#18	A	11				11
	B	4				4
	C	5				5
	D	0				0
Désirée SST#36	A	19				19
	B	16			1	17
	C	18				18
	D	20				20
Désirée SST#20	A	7				7
	B	6				6
	C	2				2
	D	5				5
Désirée SST/FFT#22/19	A	2				2
	B	5				5
	C	10				10
	D	8				8
Désirée SST/FFT#22/30	A	17				17
	B	10				10
	C	5				5
	D	8				8
Désirée SST/FFT#22/34	A	12				12
	B	21	1			22
	C	16				16
	D	19				19
Désirée WT 1	A	9				9
	B	13				13
	C	10				10
	D	0				0
Désirée WT 2	A	10				10
	B	9				9
	C	12				12
	D	15				15
Granola	A	0				0
	B	2				2
	C	0				0
	D	0				0
Agria	A	17				17
	B	14				14
	C	15				15
	D	14				14
Linda	A	11				11
	B	17				17
	C	10				10
	D	10				10
Solara	A	0		1		1
	B	1				1
	C	0		1		1
	D	0				0

3. Ergebnisse

Tabelle 31: Virusbefall von Kartoffelknollen anhand der Nacherntetestung 2004

Variante	Block	Einfachbefall			Mehrfachbefall		Summe
		PVY	PVM	PVS	PVY+PVS	PLRV+PVY	
Désirée SST/FFT#18	A	15					15
	B	17					17
	C	13					13
	D	20					20
Désirée SST/FFT#36	A	22					22
	B	21					21
	C	21					21
	D	21					21
Désirée SST/FFT#20	A	24					24
	B	22					22
	C	19					19
	D	21					21
Désirée SST/FFT#22/19	A	23		1	1		25
	B	25					25
	C	21					21
	D	10					10
Désirée SST/FFT#22/30	A	19					19
	B	22				1	23
	C	22					22
	D	18					18
Désirée SST/FFT#22/34	A	19					19
	B	21					21
	C	19		1			20
	D	13					13
Désirée WT 1	A	20			2		22
	B	23					23
	C	20					20
	D	21					21
Désirée WT 2	A	20					20
	B	22					22
	C	17		1			18
	D	11					11
Granola	A	10					10
	B	21					21
	C	23					23
	D	20					20
Agria	A	7					7
	B	9					9
	C	9					9
	D	1					1
Linda	A	21			1		22
	B	23					23
	C	19					19
	D	18			3		21
Solara	A	1		2			3
	B						0
	C		5				5
	D						0

Tabelle 32: Zusammenstellung aller PVY-Infektionen der Nacherntetestungen

Variante	Block	Anzahl PVY-Infektionen			
		2001	2002	2003	2004
Désirée SST#18	A	2	10	11	15
	B	11		4	17
	C	9		5	13
	D	7		0	20
Désirée SST#36	A	13	11	19	22
	B	10		17	21
	C	11		18	21
	D	11		20	21
Désirée SST#20	A	13	13	7	24
	B	13		6	22
	C	19		2	19
	D	18		5	21
Désirée SST/FFT#22/19	A	16	12	2	24
	B	10		5	25
	C	5		10	21
	D	13		8	10
Désirée SST/FFT#22/30	A	12	15	17	19
	B	12		10	23
	C	17		5	22
	D	13		8	18
Désirée SST/FFT#22/34	A	10	12	12	19
	B	12		20	21
	C	6		16	18
	D	4		19	13
Désirée WT 1	A	14	16	9	22
	B	9		13	23
	C	10		10	20
	D	15		0	21
Désirée WT 2	A	10	4	10	20
	B	22		9	22
	C	14		12	17
	D	18		15	11
Granola	A	0	6	0	10
	B	8		2	21
	C	6		0	23
	D	0		0	20
Agria	A	8	3	17	7
	B	8		14	9
	C	14		15	9
	D	4		14	1
Linda	A	18	11	11	22
	B	21		17	23
	C	24		10	19
	D	25		10	21
Solara	A	2	0	0	1
	B	0		1	0
	C	0		0	0
	D	0		0	0

3. Ergebnisse

Es stellte sich heraus, dass PVY das am häufigsten auftretende Virus war. Größtenteils wiesen die Knollen nur Einzelinfektionen mit diesem Virus auf. Während sich bei 49 Knollen (4,1%) der Freisetzung 2001 Mehrfachinfektionen feststellen ließen, wurde bei keiner Knolle von der Freisetzung 2002 und lediglich bei einer Kartoffel von der Freisetzung 2003 eine Doppelinfektion vorgefunden. Acht Knollen (0,7%) der Freisetzung 2004 wiesen eine Doppelinfektion auf, von denen sechs den konventionellen Vergleichssorten angehörten. Die übrigen Viren (PVX, PVM, PLRV und PVS) kamen nur in 87 Knollen (7,25%) der Testungen 2001 vor. In diesen trat das PVM in 5 (0,4%), das PVS in 79 (6,6%) und die Viren PLRV und PVX in je 2 (0,2%) Fällen auf.

In den Testungen der Knollen (2002) konnte lediglich eine Knolle mit einer PLRV Infektion festgestellt werden. Auch in der Testung 2003 wurden in lediglich einer Probe PVM und in drei weiteren PVS identifiziert. Bei den Untersuchungen der Knollen der Freisetzung 2004 wurden insgesamt 18 Knollen (1,5%) identifiziert, von denen 12 (1%) eine PVS-, 5 (0,4%) eine PVM- und eine weitere (0,08%) eine PLRV- Infektion aufwiesen. Tabelle 33 zeigt den prozentualen Anteil PVY infizierter Knollen der verschiedenen Varianten.

Tabelle 33: PVY-Infektionen in den geernteten Knollen aus den einzelnen Freisetzungen

Freisetzung	2001	2002	2003	2004
Knollenanzahl	1200	300	1200	1200
Anzahl transgener PVY- infizierter Knollen (Anteil in %, bezogen auf alle transgenen Knollen)	265 (44,2)	73 (48,7)	246 (41)	469 (78)
Anzahl nicht-transgener PVY- infizierter Knollen (Anteil in %, bezogen auf alle nicht-transgenen Knollen)	250 (41,7)	40 (23,7)	189 (31,5)	342 (57)
Summe aller infizierten Pflanzen (Anteil in %, bezogen auf alle untersuchten Knollen)	517 (43)	113 (37,6)	435 (36,3)	811 (68)

Der Anteil PVY-infizierter Knollen in den einzelnen Jahren bewegte sich in einer Größenordnung zwischen 37% und 67%. Infektionen mit anderen Viren wurden nur sehr selten (PVS) oder gar nicht festgestellt. Im Gegensatz zu den untersuchten Knollen der Freisetzung 2001, bei denen etwa gleich viele transgene wie nicht-transgene Kartoffeln eine PVY Infektion aufwiesen, konnte bei den Untersuchungen der übrigen Freisetzen immer beobachtet werden, dass der Anteil PVY infizierter Knollen bei den transgenen Kartoffeln über dem der nicht-transgenen Varianten lag.

Die stichprobenartigen serologischen Überprüfungen von geernteten Knollen der verschiedenen Varianten der drei Freisetzen sollten einen Überblick geben, in welchem Ausmaß virusinfizierte Knollen vorlagen. Der ermittelte Befall aus den Sekundärinfektionstestungen wurde den bonitierten Befallswerten gegenübergestellt (siehe Tabelle 34 und Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16).

Sowohl die Gesamtbefallsdaten, wie auch die reinen PVY-Befallsdaten der visuellen Bonituren deckten sich kaum mit denen der Knollentestungen. Lediglich die Werte für die Sorte Solara ergaben eine relativ gute Übereinstimmung. Die Gegenüberstellungen der Gesamtbefallsdaten sind in Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16 für die einzelnen Freisetzen dargestellt.

3. Ergebnisse

Tabelle 34: Gegenüberstellung des bei der visuellen Bonitur und bei der Nachernteuntersuchung vorgefundenen Gesamtbefalls an virusinfizierter Pflanzen

Variante	Jahr	Befall in % (Bonitur Freisetzung*)	Befall in % (Nachernteuntersuchung*)
Désirée SST#18	2001	0	32 (29)
	2002	n. g.	40
	2003	0,5	20
	2004	0,3	65
Désirée SST#36	2001	0	45 (35)
	2002	n. g.	48 (44)
	2003	3,4	74
	2004	0	85
Désirée SST#20	2001	2,1	65 (63)
	2002	n. g.	52
	2003	0,5	20
	2004	0,5	86
Désirée SST/FFT#22/19	2001	1,8	44
	2002	n. g.	48
	2003	0	25
	2004	0	80
Désirée SST/FFT#22/30	2001	1,8	58 (54)
	2002	n. g.	60
	2003	0,3	40
	2004	0	82
Désirée SST/FFT#22/34	2001	0,5	54 (32)
	2002	n. g.	48
	2003	7,3	69 (67)
	2004	0	73 (71)
WT 1 zu Désirée SST/FFT	2001	3,4	54 (48)
	2002	n. g.	64
	2003	1	32
	2004	0	86
WT 2 zu Désirée	2001	3,9	66 (64)
	2002	n. g.	16
	2003	1,6	46
	2004	4,4	71 (70)
Granola	2001	0,3	21 (14)
	2002	n. g.	24
	2003	0	2
	2004	3,1	74
Agria	2001	1,0	42 (34)
	2002	n. g.	12
	2003	5,2	60
	2004	0,5	26
Linda	2001	9,6	90 (88)
	2002	n. g.	44
	2003	4,2	48
	2004	5,7	85
Solara	2001	0,5	5 (2)
	2002	n. g.	0
	2003	0	3 (1)
	2004	0,3 (0)	8 (1)

*Die vom Gesamtbefall abweichenden PVY Befallshäufigkeiten wurden zusätzlich in Klammern angegeben.

n.g.= nicht getestet

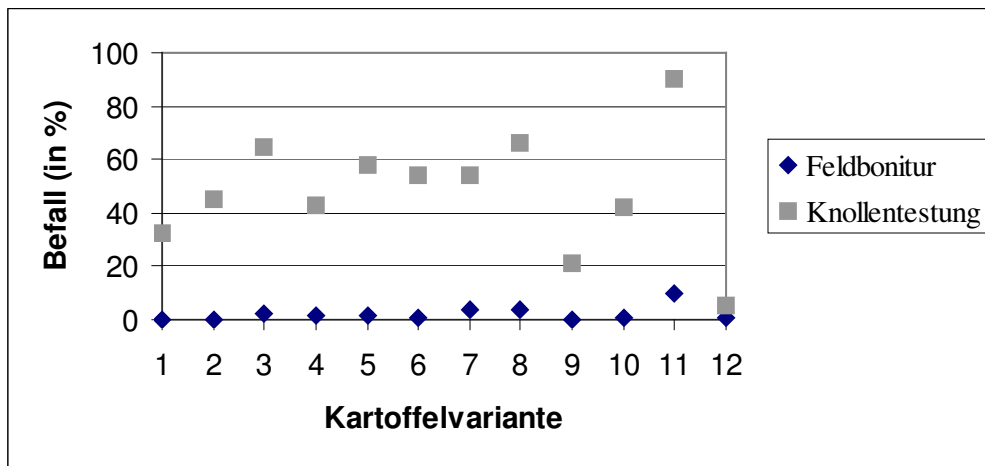


Abb. 14: Vergleich der visuellen Bonitur mit der Knollentestung der Freisetzung 2001

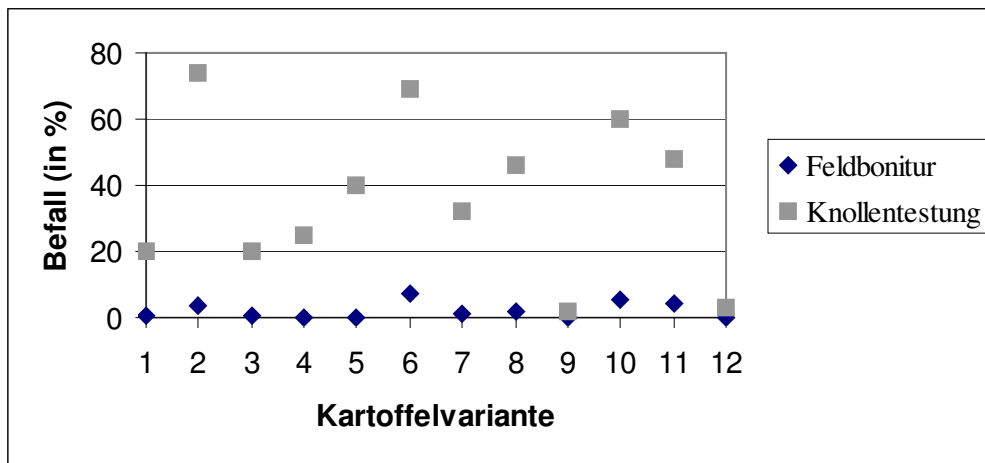


Abb. 15: Vergleich der visuellen Bonitur mit der Knollentestung der Freisetzung 2003

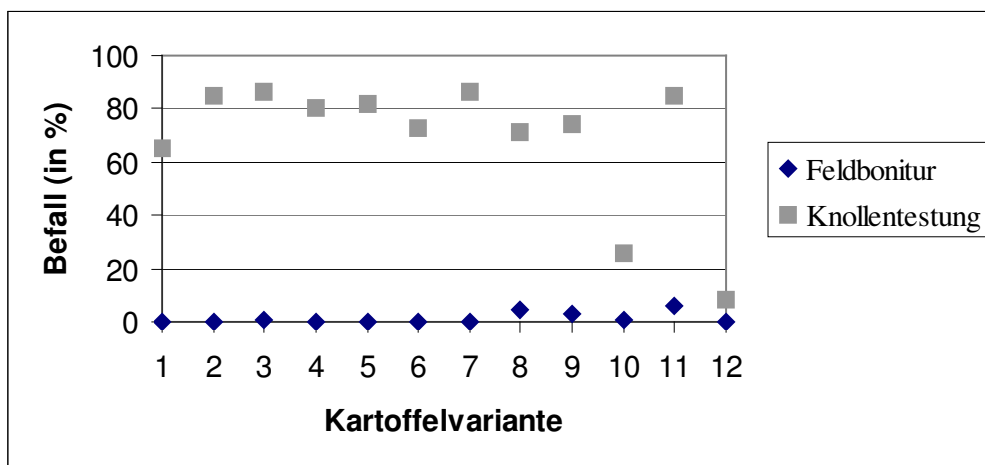


Abb. 16: Vergleich der visuellen Bonitur mit der Knollentestung der Freisetzung 2004

Legende zu Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16: Die Zuordnung der Kartoffelvarianten 1-12 sind in Tabelle 21 aufgeführt.

3.1.4.1. Statistische Analyse der PVY-Befallshäufigkeiten der einzelnen Varianten im Rahmen der Nachernteuntersuchungen

PVY war bei allen Freisetzung das am häufigsten vorkommende Virus. Um Unterschiede bezüglich der PVY Befallshäufigkeiten zwischen einzelnen transgenen oder nicht-transgenen Varianten zu identifizieren, wurden die PVY-Befallsdaten der Knollennacherntetestungen einer statistischen Analyse unterzogen. Bei diesen Überprüfungen wurden die Anzahlen PVY-infizierter Knollen pro Variante und Block als Zählraten verwendet. Eine Alternativhypothese wurde formuliert, die annimmt, dass kein Unterschied in den PVY-Befallshäufigkeiten zwischen transgenen und nicht-transgenen Varianten besteht.

Da die Fallzahlen jeder Variante pro Block konstant waren (jeweils 25 Knollen), wurde die Anzahl PVY-infizierter Pflanzen mit Hilfe eines Bootstrap-Tests analysiert (Munzel und Hothorn, 2001), wobei die Entscheidungen an Hand eines p-Wert Kriteriums (unbedenklich, falls $p > 0,1$) vorgenommen wurden. Die Ergebnisse zeigen Abb. 17 und Tabelle 35.

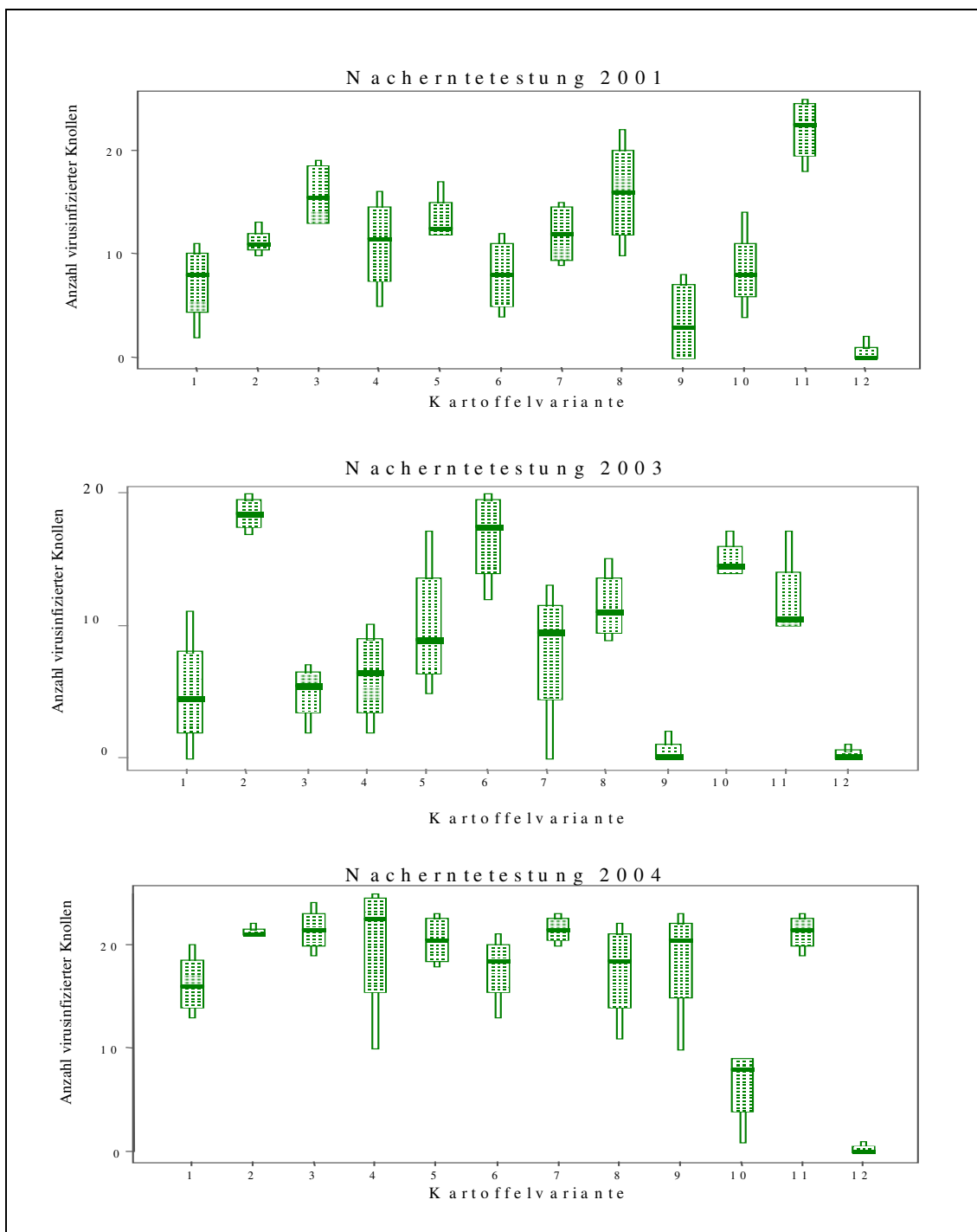


Abb. 17: Darstellung der PVY-Befallswerte der einzelnen Varianten je Freisetzung als Box-Plots
 Die Befallswerte entstammen aus den Nachernteuntersuchungen der Freisetzungen 2001, 2003 und 2004. Die Zuordnung der Kartoffelvarianten (1-12) zeigt Tabelle 21.

3. Ergebnisse

Tabelle 35: Ergebnis der statistischen Analyse von PVY Infektionen ermittelt in serologischen Untersuchungen von geernteten Knollen der Freisetzung der Jahre 2001 bis 2004

Vergleich	2001		2003		2004	
	p-Wert	Entscheidung	p-Wert	Entscheidung	p-Wert	Entscheidung
Alle T gegen alle N	0,4808	nicht bedenklich	0,0149	bedenklich	<0,0001	bedenklich
Alle T gegen WT 1	0,6409	nicht bedenklich	0,2033	nicht bedenklich	0,2571	nicht bedenklich
SST gegen FFT	0,6807	nicht bedenklich	0,2607	nicht bedenklich	0,8469	nicht bedenklich
Alle SST gegen WT 1	0,7709	nicht bedenklich	0,4244	nicht bedenklich	0,3200	nicht bedenklich
Alle FFT gegen WT 1	0,5611	nicht bedenklich	0,1148	nicht bedenklich	0,2594	nicht bedenklich
Alle SST gegen alle N	0,4169	nicht bedenklich	0,1615	nicht bedenklich	<0,0001	bedenklich
Alle FFT gegen alle N	0,7342	nicht bedenklich	0,0093	bedenklich	<0,0001	bedenklich
V1 gegen WT 1	0,0589	bedenklich	0,1953	nicht bedenklich	0,0239	bedenklich
V2 gegen WT 1	0,7599	nicht bedenklich	<0,001	bedenklich	0,9112	nicht bedenklich
V3 gegen WT 1	0,1323	nicht bedenklich	0,1953	nicht bedenklich	1,000	nicht bedenklich
V4 gegen WT 1	0,6838	nicht bedenklich	0,4465	nicht bedenklich	0,5049	nicht bedenklich
V5 gegen WT 1	0,5418	nicht bedenklich	0,3849	nicht bedenklich	0,6561	nicht bedenklich
V6 gegen WT 1	0,1092	nicht bedenklich	0,0005	bedenklich	0,1008	nicht bedenklich
V8 gegen WT 1	0,1092	nicht bedenklich	0,1324	nicht bedenklich	0,0808	bedenklich
V9 gegen WT 1	0,0013	bedenklich	0,0022	bedenklich	0,1863	nicht bedenklich
V10 gegen WT 1	0,1593	nicht bedenklich	0,0040	bedenklich	<0,0001	bedenklich
V11 gegen WT 1	0,0002	bedenklich	0,0870	bedenklich	0,9112	nicht bedenklich
V12 gegen WT 1	<0,0001	bedenklich	0,0016	bedenklich	<0,0001	bedenklich
Alle T gegen alle N (ohne Agria und Solara)	0,0504	bedenklich	0,0368	bedenklich	0,8867	nicht bedenklich
Alle SST gegen alle N (ohne Agria und Solara)	0,1452	nicht bedenklich	0,2298	nicht bedenklich	0,9863	nicht bedenklich
Alle FFT gegen alle N (ohne Agria und Solara)	0,0612	bedenklich	0,01	bedenklich	0,8231	nicht bedenklich
Alle FFT gegen alle N (ohne Granola und Solara)	0,5303	nicht bedenklich	0,0752	bedenklich	0,0074	bedenklich
Alle SST gegen alle N (ohne Granola und Solara)	0,2886	nicht bedenklich	0,5452	nicht bedenklich	0,0043	bedenklich

Fortsetzung der Tabelle 35: Ergebnis der statistischen Analyse von PVY Infektionen ermittelt in serologischen Untersuchungen von geernteten Knollen der Freisetzungen der Jahre 2001 bis 2004

Vergleich	2001		2003		2004	
	p-Wert	Entscheidung	p-Wert	Entscheidung	p-Wert	Entscheidung
Alle T gegen alle N (ohne Granola + Solara)	0,0033	bedenklich	0,1935	nicht bedenklich	0,0080	bedenklich
Alle T gegen alle N (ohne Linda und Solara)	0,3183	nicht bedenklich	0,1575	nicht bedenklich	0,0013	bedenklich
Alle transgenen gegen alle nicht transgenen (ohne Solara)	0,2294	nicht bedenklich	0,3884	nicht bedenklich	0,0130	bedenklich

Legende: T = Transgene Varianten; N = nicht-transgene Varianten Die Zuordnungen der Kartoffelvarianten (V1-V12) können aus Tabelle 21 entnommen werden.

Im Vergleich der PVY-Befallszahlen aller transgenen und aller nicht-transgenen Varianten wurde bei den Freisetzungen 2003 und 2004 ein bedenklicher Unterschied beobachtet. Der Begriff „bedenklich“ wird hier im Zusammenhang mit der Ablehnung der Alternativhypothese gebraucht und nicht im Sinne eines sicherheitsrelevanten Ereignisses, d.h. in diesem Fall ist ein statistisch gesicherter Unterschied im Virusbefall der transgenen verglichen mit allen nicht-transgenen Knollen gegeben. Dieser Unterschied konnte bei den Knollen der Freisetzung 2003 auf die Befallswerte der Vergleichssorten Granola und Solara zurückgeführt werden, die sich im Gegensatz zu allen übrigen Varianten durch sehr geringe Befallswerte auszeichneten. Bei den Knollen der Freisetzung 2004 zeichneten sich die Sorten Solara und Agria durch sehr geringe PVY-Befallshäufigkeiten aus, so dass diese beiden Sorten als Ursache für den festgestellten Unterschied zwischen den transgenen und nicht-transgenen Varianten angesehen werden können.

Bei sämtlichen Untersuchungen der Knollen der drei Freisetzungen konnten im Vergleich aller transgenen Varianten gegen die Variante Désirée WT 1 keine Unterschiede festgestellt werden. Die Variante Désirée WT 1 wurde als Kontrollvariante ausgesucht, da sie auf gleicher Weise wie die transgenen Varianten hergestellt wurde. Zwar konnten bei diesen Freisetzungen in den Einzelvergleichen (jede Variante gegen Désirée WT 1) bei einigen transgenen Linien ein Unterschied zur

3. Ergebnisse

Vergleichsvariante Désirée WT 1 entdeckt werden, hauptsächlich zeigten jedoch die konventionellen Sorten einen Unterschied zur Variante Désirée WT 1 auf.

Im Vergleich zu der nicht-transformierten Variante Désirée WT 1 konnten, über die drei Freisetzungsbefallsunterschiede statistisch festgestellt werden. Durch niedrigere PVY Befallshäufigkeiten fiel die transgene Linie Désirée SST#18 besonders dadurch auf, dass bei ihr bei zwei Nachernteuntersuchungen der Freisetzungsbefallsunterschiede (2001 und 2004) ein feststellbarer Unterschied vorzufinden war. Bis auf die Vergleichssorte Désirée WT 2 wiesen alle übrigen nicht-transgenen konventionell erzeugten Kartoffelvarianten im Vergleich zur Kontrollvariante Désirée WT 1, bei mehreren Freisetzungsbefallsunterschieden in den PVY-Befallsstärken auf. Diese Unterschiede kamen beispielsweise bei den Sorten Granola und Solara dadurch zustande, dass diese einen deutlich geringeren Virusbefall aufwiesen, während die Sorte Linda bei der Freisetzung 2001 eine höhere PVY-Infektionshäufigkeit zeigte.

Im Folgenden sollte durch molekulare Untersuchungsmethoden geklärt werden, inwieweit sich die transgenen Kartoffelvarianten von den nicht-transgenen Varianten in Bezug auf die in ihnen vorkommenden PVY-Isolate, unterscheiden. Dazu wurden PVY-Isolate ausgewählter Proben der verschiedenen Varianten molekulare Analysen unterzogen.

3.1.5. RFLP-Untersuchungen und Sequenzanalysen von PVY-Fragmenten zur Bestimmung der verschiedenen PVY-Stämme

Mit Hilfe der Primer PVYCPup und PVYCPlow (Sequenzen siehe Tabelle 6) wurden zunächst aus einigen PVY-infizierten Pflanzen der Sekundärinfektionstestung 2001 nach Gesamt-RNA-Extraktion mittels RT-PCR Fragmente (1224 bp) amplifiziert. Dadurch dass diese Primer in konservierten Regionen des N1b und der 3'-UTR lokalisiert waren, enthielten diese Fragmente die vollständige Sequenz des CPs.

Einige von diesen Amplifikaten wurden kloniert und sequenziert. Aus den Sequenzdaten ergab sich, dass die meisten von ihnen dem PVY^{NTN} Stamm zuzuordnen

waren, während nur wenige dem PVY^O Stamm angehörten. Zwei rekombinante Plasmide, von denen das eine ein PVY^{NTN} - Fragment und das zweite ein PVY^O Fragment enthielt, dienten für die Untersuchungen weiterer Fragmente als Kontrollen. Ein Vergleich dieser ausgewählten Sequenzen mit bekannten Sequenzen der Datenbank „GenBank“ ergab, dass das PVY^{NTN} Kontrollisolat mit einem bekannten Isolat mit der Accessionbezeichnung AJ3890289 und das PVY^O Fragment nahezu identisch mit einer Sequenz mit der Bezeichnung AJ390306 waren.

Aufgrund des Sequenzvergleiches dieser Fragmente untereinander wurden Restriktionsendonukleasen für eine RFLP Untersuchung weiterer Fragmente ausgewählt.

Um einerseits die Stammzugehörigkeiten der in den Pflanzen vorgefundenen PVY-Isolate schnell bestimmen zu können, andererseits aber auch aus der großen Anzahl von PVY-Hüllproteinfragmenten interessante Proben herauszufiltern, wurden die Fragmente Restriktionen mit den Enzymen *DdeI*, *MseI*, *RsaI*, *XhoI*, *HincII*, *Bsu36* und *BsmI* unterzogen. Die Lage der Restriktionsendonukleaseschnittstellen im amplifizierten Bereich sowie die Lage der Primer PVYCPup und PVYCPlow ist für die Stämme PVY^{NTN} und PVY^O in der Abb. 18 gezeigt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Fragmentmuster mit denjenigen der Kontrollen (PVY^{NTN} und PVY^O) verglichen. Sowohl Proben, deren Fragmentmuster sich deutlich von denen der Kontrollen unterschieden, als auch einige, die keine Unterschiede zu den Kontrollen aufwiesen, wurden zur näheren Untersuchung kloniert und sequenziert.

3. Ergebnisse

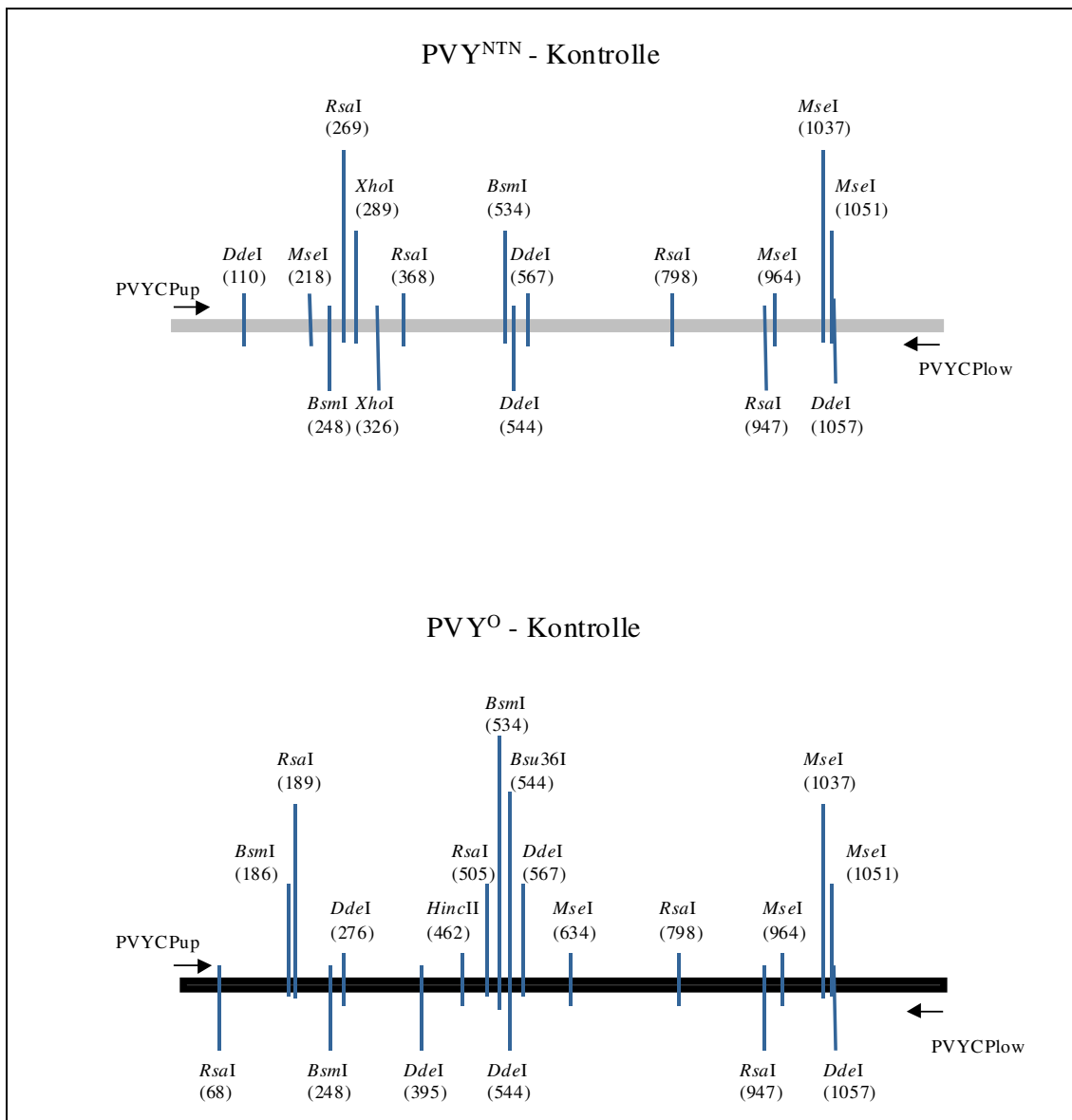


Abb. 18: Schematische Darstellung der Positionen verschiedener Restriktionsendonukleasen innerhalb eines PVY^{NTN} bzw. eines PVY^O-Fragments (beide 1224 bp), die nach Sequenzierung als Vergleichsisolat Verwendung fanden.

Tabelle 36 gibt einen Überblick über die erwarteten Fragmentgrößen nach einem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Jedes der ausgewählten Enzyme erlaubt nach Restriktion des amplifizierten Bereichs eine eindeutige Unterscheidung der Stammgruppen PVY^{NTN} und PVY^O anhand der Bandengrößen.

Tabelle 36: Übersicht über die Fragmente, die nach enzymatischem Verdau der PVY-Hüllproteinamplifikate entstehen

PVY-Stammgruppe	Fragmente (in bp) bei Verdau mit						
	<i>BsmI</i>	<i>Bsu36I</i>	<i>DdeI</i>	<i>HincII</i>	<i>MseI</i>	<i>RsaI</i>	<i>XhoI</i>
PVY ^{NTN}	248 286 690	1224	23 110 167 434 490	1224	14 73 173 218 746	99 149 269 277 430	37 289 898
PVY ^O	62 186 286 690	544 680	23 119 149 167 276 490	462 762	14 73 173 330 634	149 189 277 293 316	1224

In Abb. 19 werden einige Fragmentmuster der PVY^{NTN} und PVY^O Isolate nach Restriktion dargestellt. Die Bandengrößen können aus Tabelle 36 entnommen werden.

3. Ergebnisse

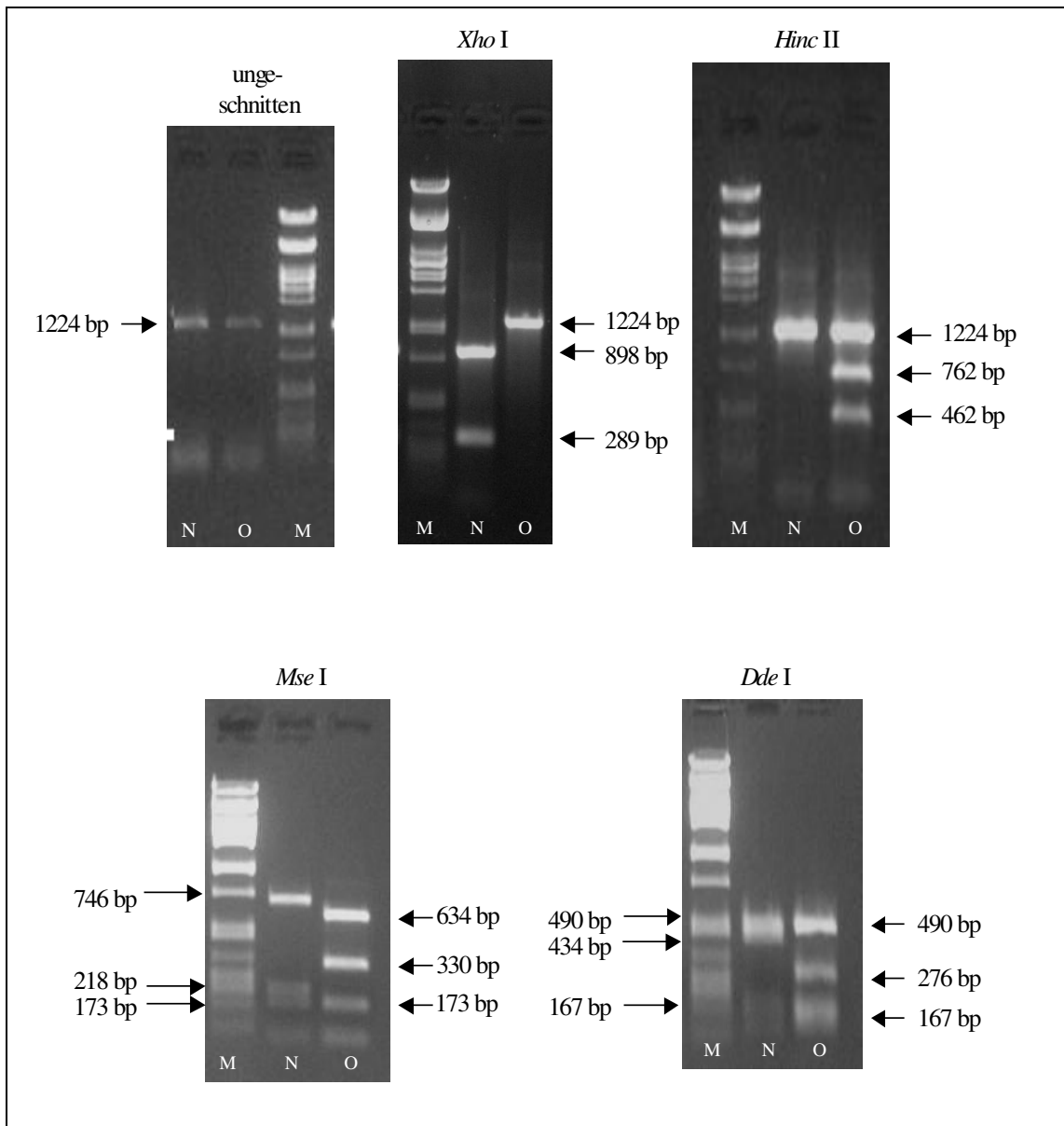


Abb. 19: Agarosegele, die unverdaute oder nach enzymatischer Restriktion entstandene Fragmente von Isolaten des PVY^{NTN} (N) und des PVY^O (O) zeigen. M markiert den Größenmarker (Lambda DNA, verdaut mit *Pst*I; vergleiche Punkt 2.1.10).

Tabelle 37 zeigt eine Zusammenfassung der RFLP-Analysen aus den Sekundärinfektionen der Jahre 2001-2004.

Tabelle 37: RFLP-Analyse von PVY-CP Fragmenten sowie Anzahl der sequenzierten Proben (in Klammern) je Variante und Freisetzung

Variante	Jahr	Anzahl			Summe aller untersuchter Fragmente
		PVY ^{NTN} (davon sequenziert)	PVY ^O (davon sequenziert)	Doppel- infektionen (PVY ^{NTN} +PVY ^O)	
Désirée SST#18	2001	9 (-)	3 (-)		12
	2002	6 (1)	1 (-)		7
	2003	4 (-)	10 (2)	1	15
	2004	30 (1)	2 (-)	1	33
Désirée SST#36	2001	12 (3)	1 (1)		13
	2002	5 (-)	1 (1)		6
	2003	35 (1)	9 (-)	2	46
	2004	15 (-)	0 (-)		15
Désirée SST#20	2001	3 (1)	9 (-)		12
	2002	5 (1)	8 (-)		13
	2003	6 (-)	3 (-)	1	10
	2004	18 (-)	0 (-)		18
Désirée SST/FFT#22/19	2001	8 (2)	2 (-)		10
	2002	4 (1)	3 (-)		7
	2003	19 (-)	3 (-)		22
	2004	13 (-)	0 (-)		13
Désirée SST/FFT#22/30	2001	9 (-)	1 (-)		10
	2002	2 (-)	7 (-)		9
	2003	12 (1)	3 (-)	1	16
	2004	24 (-)	0 (-)		24
Désirée SST/FFT#22/34	2001	4 (3)	6 (1)		10
	2002	3 (1)	6		10
	2003	37 (-)	2 (-)	2	41
	2004	13 (-)	0 (-)		13
Désirée WT-1	2001	9 (3)	1 (-)		10
	2002	10 (2)	2 (-)		12
	2003	18 (1)	3 (-)		21
	2004	15 (2)	0 (-)		15
Désirée WT-2	2001	7 (1)	3 (-)		10
	2002	4 (1)	0 (-)		4
	2003	19 (-)	7 (2)		26
	2004	11 (-)	0 (-)		11
Granola	2001	6 (1)	1 (-)		7
	2002	6 (-)	0 (-)		6
	2003	2 (1)	0 (-)		2
	2004	12 (-)	0 (-)		12
Agria	2001	1 (1)	10 (2)		11
	2002	0 (-)	1 (1)		1
	2003	5 (-)	33 (3)	2	40
	2004	1 (-)	10 (-)		11
Linda	2001	4 (1)	10 (-)		14
	2002	5 (-)	0 (-)		5
	2003	10 (-)	9 (4)		19
	2004	11 (1)	3 (-)	5	19
Solara	2001	0 (-)	0 (-)		0
	2002	0 (-)	0 (-)		0
	2003	1 (-)	0 (-)		1
	2004	0 (-)	0 (-)		0

3. Ergebnisse

Die RFLP-Untersuchungen zeigten, dass die transgenen Linien genau wie ihre nicht transformierte Vergleichsvariante (WT 1) unter den Freilandbedingungen sowohl von PVY^{NTN}, als auch von PVY^O infiziert worden waren. Aus den Überprüfungen der amplifizierten Fragmente mittels Restriktionsendonukleasespaltungen konnte über die Jahre hinweg beobachtet werden, dass die nicht-transgene Vergleichsvariante Agria fast ausschließlich von PVY^O befallen wurde. Nur sehr selten konnten Amplifikate dieser Kartoffelvariante dem PVY^{NTN} Stamm zugeordnet werden. Bei der Sorte Linda konnte weiterhin beobachtet werden, dass ihre Virusinfektionen jährlichen Schwankungen unterlag. Während die meisten Amplifikate der Sekundärinfektionstestungen 2001 dem PVY^O zugeordnet werden mussten, waren die Verhältnisse 2003 ungefähr gleich und verschoben sich zugunsten des PVY^{NTN} bei den Untersuchungen der Knollen der Freisetzung 2004. Bis auf wenige Ausnahmen konnte sowohl bei den transgenen als auch bei den nicht-transgenen Varianten der Sorte Désirée ein jährlich höherer Anteil an PVY^{NTN}- als PVY^O-infizierter Knollen festgestellt werden. Vereinzelt bildeten die transgenen Linien z.B. Désirée SST#18 (2003), SST#20 (2001) und SST/FFT#22/30 (2002) Ausnahmen, indem bei ihnen die Anteile an PVY^O infizierten Knollen in einzelnen Jahren deutlich über denen der PVY^{NTN} infizierten Knollen lagen. Von diesen jährlichen Schwankungen abgesehen, konnte jedoch bei keiner der transgenen Linien eine Auffälligkeit in Bezug auf die Stammverteilungen der PVY-Fragmente festgestellt werden.

In den Sekundärinfektionen 2003 und 2004 wurden bei 3,4% bzw. 3,2% aller untersuchten Proben Doppelinfektionen mit beiden PVY-Stämmen (PVY^{NTN} und PVY^O) in einer Pflanze vorgefunden. Während der Anteil doppelt infizierter Proben, die auf geerntete Knollen der Freisetzung 2003 zurückgeführt werden konnten, bei den transgenen Linien deutlich höher lag, konnte bei der Sekundärinfektionstestung 2004 genau das Gegenteil beobachtet werden. Hier gehörten fast alle doppelt infizierten Pflanzen der Sorte Linda an. Summiert über alle Varianten konnte jedes Jahr beobachtet werden, dass der überwiegende Teil der Proben eine PVY^{NTN} Einfachinfektion aufwies. Diese Anteile lagen bei den verschiedenen Untersuchungsjahren zwischen 61% und 91%. In sämtlichen Freisetzungen und bei allen Varianten wurde festgestellt, dass sowohl die transgenen wie auch die nicht-transgenen Kartoffeln wesentlich häufiger PVY^{NTN} Infektionen aufwiesen (siehe Tabelle 38).

Während die Knollen der nicht-transgenen Kartoffeln der Freisetzungen 2001 und 2003 und die Pflanzen der transgenen Varianten in der Freisetzung 2002 in der Gesamtbetrachtung ein ungefähr ausgeglichenes Verhältnis zwischen PVY^{NTN} und PVY^O zeigten, war bei allen übrigen Untersuchungen das Verhältnis zugunsten des PVY^{NTN} verschoben. Aufgrund der verschiedenen Anfälligkeiten der konventionellen Vergleichsvarianten gegenüber PVY Stämmen (bei der Sorte Agria wurden fast ausschließlich PVY^O-Infektionen festgestellt, siehe Tabelle 37) wurden die Befallshäufigkeiten der transgenen Varianten zusätzlich noch einmal denen der Désirée Vergleichsvarianten (WT 1 und WT 2) gegenübergestellt (Tabelle 39). Mit Ausnahme der Freisetzung 2002 zeigte sich bei allen Vergleichen ein deutlich häufigeres Vorkommen von PVY^{NTN} gegenüber PVY^O. Darüber hinaus konnte mit Ausnahme der Freisetzung 2002 eine relativ hohe Übereinstimmung der PVY-Stammverteilung zwischen den transgenen und den Vergleichsvarianten festgestellt werden, so dass, von kleinen Abweichungen abgesehen, eine Verschiebung des PVY-Stammspektrums bei den transgenen Varianten nicht festgestellt werden konnte.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 38 dargestellt. Tabelle 39 gibt die Verhältnisse der PVY-Stammverteilung für die transgenen Linien und die Vergleichssorten Wildtyp 1 und Wildtyp 2 wieder.

3. Ergebnisse

Tabelle 38: Übersicht über die Anteile an PVY^{NTN} und PVY^O bezogen auf den Gesamtbefall und auf die transgenen und nicht-transgenen Varianten

Untersuchungsjahr	Betrachteter Befall	Anteil PVY ^{NTN} und PVY ^O (Angabe in %)	
		Anteil PVY ^{NTN} (Angabe in %)	Anteil PVY ^O (Angabe in %)
2001	Gesamtbefall	60,5	39,5
	Alle transgenen Pflanzen	67,2	32,8
	Alle nicht-transgen Pflanzen	51,9	48,1
2002	Gesamtbefall	62,5	37,5
	Alle transgenen Pflanzen	49	51
	Alle nicht-transgen Pflanzen	89,3	10,7
2003	Gesamtbefall	67,2	32,8
	Alle transgenen Pflanzen	78,7	21,3
	Alle nicht-transgen Pflanzen	51,4	48,6
2004	Gesamtbefall	91,6	8,4
	Alle transgenen Pflanzen	98,3	1,7
	Alle nicht-transgen Pflanzen	79,4	20,6
Über die Jahre 2001-2004 ermittelt	Alle transgenen Pflanzen	80,2	19,8
	Alle nicht-transgen Pflanzen	62,8	37,2
	WT 1+2	85,3	14,7

Tabelle 39: Anteile an PVY^{NTN} und PVY^O in den transgenen Versuchsvarianten sowie in den Varianten Wildtyp 1 und Wildtyp 2

Untersuchungsjahr	Pflanzenzugehörigkeit	Anteil PVY ^{NTN} und PVY ^O (Angabe in %)	
		Anteil PVY ^{NTN} (Angabe in %)	Anteil PVY ^O (Angabe in %)
2001	Transgene	67,2	32,8
	WT 1 und WT 2	80	20
2002	Transgene	49	51
	WT 1 und WT 2	87,5	12,5
2003	Transgene	79	21
	WT 1 und WT 2	78,7	21,3
2004	Transgene	98,3	1,7
	WT 1 und WT 2	100	0

3.1.6. RFLP-Analyse von weiteren PVY-Fragmenten

Um einen Überblick zu bekommen inwieweit die Ergebnisse aus den Freisetzungsversuchen repräsentativ für PVY^N-Stämme im Kartoffelanbau in der Bundesrepublik Deutschland sind, wurde zusätzlich untersucht, welche Stammtypen in anderen Anbaugebieten Deutschlands auftraten. Dazu wurden PVY Hüllproteingenenthaltene Fragmente analysiert, die aus Proben stammten, die von Frau Dr. Lindner (BBA Braunschweig) in Form von ELISA-Presssäften zur Verfügung gestellt wurden (Tabelle 21). Die Proben stammten aus verschiedenen Bundesländern, in denen regelmäßig Kartoffel-Pflanzguttungen vorgenommen werden. Der überwiegende Teil dieser Proben war von Frau Dr. Lindner aufgrund der serologischen Voruntersuchungen unter Verwendung monoklonaler Antikörper als PVY^N und in zwei Fällen als PVY^O eingestuft worden. Die serologisch als PVY^N eingruppierten Proben wurden anschließend von Frau Dr. Lindner durch eine molekulare Analyse (RT-PCR) des PVY-P1 Bereiches in PVY^N oder PVY^{NTN} unterschieden (Weidemann und Maiss, 1996). Die molekulare Analyse des CP-Bereichs wurde im Rahmen dieser Arbeit in Hannover vorgenommen. In Tabelle 40 sind die Ergebnisse der molekularen Analysen gezeigt und gegenübergestellt.

Tabelle 40: P1- und CP- Analysen ausgewählter PVY-Proben der Jahre 2003 und 2004

Jahr	Probenherkunft	Kartoffelsorte (und BBA interne Bezeichnungen)	Anzahl Proben			
			PVY ^{NTN} im P1- und CP	PVY ^N im P1- und PVY ^{NTN} im CP	PVY ^N im P1- und PVY ^N im CP	PVY ^O im P1- und PVY ^O im CP
2003	Hessen	Granola	5	1	0	0
	Hannover	Linda (3 und 11)	13	1	0	0
	Bayern	Linda (280115 und 290727)	3	2	0	0
	BBA Braunschweig	Linda (6a, 6b und 6e)	14	0*	0	0
	Meckl. –Vorpommern	Linda	29	0	0	0
2004	Baden-Württemberg/ Donaueschingen	Linda	11	0	1	2
	Baden-Württemberg/ Donaueschingen	Granola	13	0	0	0
	Mecklenburg- Vorpommern/Gülzow	Linda	1	0	0	0

*(teilweise keine Ergebnisse für den P1-Bereich)

3. Ergebnisse

In den Jahren 2003 und 2004 konnten insgesamt die PVY- Hüllproteinfragmente von 96 Proben der Kartoffelsorten Linda und Granola analysiert werden, die aus den verschiedenen Regionen Deutschlands stammten (vergleiche Tabelle 40).

Im Gegensatz zu den Proben des Jahres 2004, bei denen die Untersuchungen des P1- und des Hüllproteinbereiches eine eindeutige Zuordnung in die einzelnen Stammgruppen erlaubten, wurden bei insgesamt vier Proben des Jahres 2003 Unterschiede zwischen den untersuchten Genombereichen festgestellt, so dass eine eindeutige Eingruppierung in eine Stammgruppe nicht möglich war. Aufgrund der RFLP-Fragmentmuster konnten die vier Proben im Bereich des Hüllproteins eindeutig dem PVY^{NTN} zugeordnet werden. Es wurde deutlich, dass nicht nur auf dem Gebiet der Freisetzung, sondern auch in anderen Regionen Deutschlands PVY^{NTN} stark vertreten war. Da sich die PVY^{NTN} Bandenmuster dieser Proben nicht von denen der Freisetzungen durch die Restriktionsspaltungen unterscheiden ließen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um identische oder doch sehr ähnliche Virustypen gehandelt haben muss.

3.1.7. Sequenzvariabilität innerhalb der PVY Hüllproteinfragmente

Insgesamt wurden 56 PVY-hüllproteingehaltende Fragmente nach Klonierung in *E. coli* sequenziert. Diese Proben stammten sowohl von transgenen als auch von nicht-transgenen Pflanzen, bei denen PVY-Infektionen im Rahmen der serologischen Überprüfungen von geernteten Knollen der Freisetzungen (2001-2004) festgestellt worden waren. Darüber hinaus wurden zusätzlich weitere Fragmente sequenziert, die entweder aus Blattproben stammten, die bei den visuellen Bonituren der Freisetzungen entnommen worden waren, oder aus den Untersuchungen der ELISA-Presssaftproben, die von der BBA Braunschweig zur Verfügung gestellt wurden. Dabei wurden neben solchen Fragmenten, die im Rahmen der RFLP-Untersuchungen eindeutig einem PVY-Stamm zugeordnet werden konnten, auch diejenigen vollständig sequenziert, bei denen Abweichungen in den Fragmentmustern einzelner Restriktionsendonukleasen zu beobachten waren. Insbesondere fiel bei der Variante Désirée SST/FFT#22/34 des Jahres 2002 ein Fragment auf, das aufgrund der Fragmentmuster nach den Restriktionsspaltungen der verschiedenen Restriktionsendonukleasen weder als

PVY^{NTN}, noch als PVY^O eingestuft werden konnte. Auch dieses Fragment wurde sequenziert. Die vollständigen Sequenzen der 1224 bp umfassenden PVY-Fragmente wurden miteinander verglichen (ClustalX) und zusammen mit einigen PVY-Sequenzen aus der GenBank in einen phylogenetischen Baum eingeordnet. Das Ergebnis zeigt Abb. 20. Außer einem PVY^N Vergleichsisolat (SFN) und dem Isolat (V6_S02) fügten sich alle übrigen Sequenzen in eine der zwei großen Gruppen ein, nämlich in eine PVY^O-Gruppe (in der Abbildung im oberen rechten Bereich) bzw. eine PVY^{NTN}-Gruppe (in der Abbildung im linken unteren Bereich). Innerhalb dieser Gruppen wiesen die Isolate untereinander sehr hohe Identitäten auf. Diese lagen für Isolate der PVY^O-Gruppe zwischen 98% und 100%, da hier lediglich einzelne Nukleotidaustausche festgestellt werden konnten. Im Sequenzvergleich auf Nukleotidebene zwischen Isolaten der PVY^{NTN}-Gruppe mit Isolaten der PVY^O-Gruppe waren deutliche Unterschiede zu erkennen, die vor allem in den ersten 675 bp der Sequenzen begründet liegen.

3. Ergebnisse

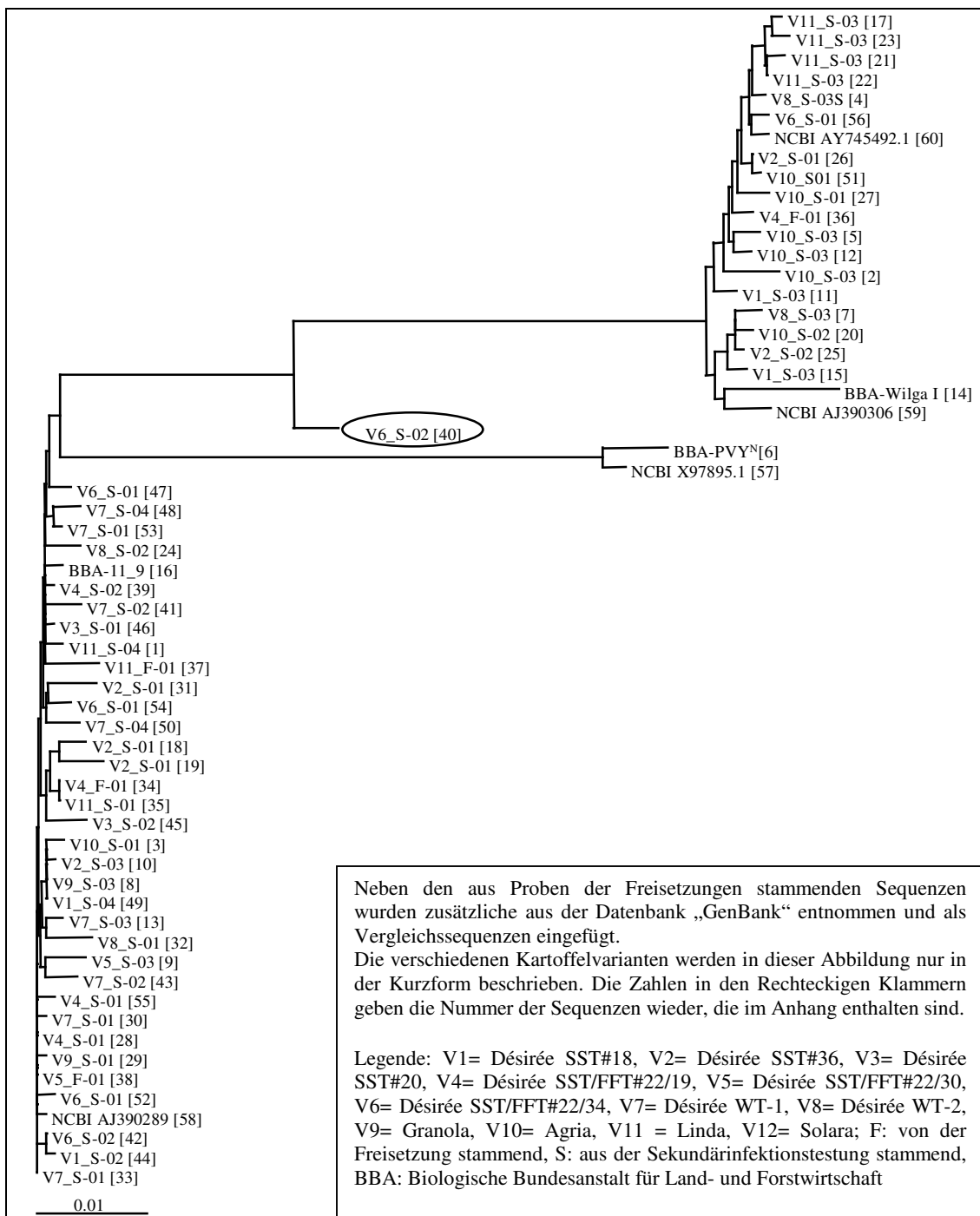


Abb. 20: Phylogenetischer Stammbaum von PVY-Fragmenten, basierend auf ihren Nukleotidsequenzen.

Während die PVY^O Fragmente zusammen in der oberen rechten Seite der Abbildung eine Gruppe bilden, sind die Hüllproteinfragmente der PVY^{NTN}-Isolate am linken Rand der Abbildung zu sehen.

Besondere Aufmerksamkeit verursachte ein Fragment (V6_S02), welches im phylogenetischen Stammbaum durch Einkreisung kenntlich gemacht wurde. Da dieses genau zwischen den beiden Clustern PVY^O und PVY^{NTN} eingruppiert wurde, erfolgte eine genauere Sequenzanalyse.

Ein Vergleich zu den Sequenzen der PVY^{NTN} und PVY^O-Kontrollen ergab, dass es sich hierbei wahrscheinlich um eine Rekombinante beider Stämme handelte. Der Vergleich der Sequenz des Isolates V6_S-02 mit denen der Vergleichssequenzen aus der GeneBank AJ390306 (PVY^O) und AJ390289 (PVY^{NTN}) zeigte, dass diese zunächst bis Base 250 mit derjenigen der PVY^{NTN}-Vergleichssequenz übereinstimmte, dann aber mit der Sequenz des PVY^O-Vergleichsisolates. Durch einen zweiten Wechsel, der in einem ungefähren Bereich zwischen Base 545 und 636 stattfand und aufgrund der Sequenzhomologien zwischen den beiden PVY-Vergleichsisolaten nicht näher bestimmt werden konnte, geht die Sequenz wieder in die des PVY^{NTN} zurück. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, sind alle hier miteinander verglichenen Sequenzen ab dem Nukleotid 670 identisch. Trotz des zweifachen Sequenzabschnittwechsels weist die ermittelte Aminosäuresequenz keine internen Stop-Codons auf. Den Nukleotidvergleich zeigt Abb. 21. Durch die farbigen Unterlegungen werden die Sequenzwechsel deutlich.

Ein Vergleich der auffälligen Sequenz (205 V6_S-02) mit anderen bekannten Sequenzen aus der GenBank ergab, dass diese die höchste Übereinstimmung mit einer PVY^{NTN}-Sequenz eines englischen Isolats mit der Bezeichnung AJ390291.1 besaß. Die Identität zwischen diesen beiden Sequenzen betrug 98%, während die Identitäten dieses Isolates zur PVY^{NTN}-Kontrolle 97% und zur PVY^O-Kontrolle 95% betrug (Identitätsberechnungen nach ClustalX). Abgesehen von einigen Nukleotidaustauschen, ergab die Sequenzanalyse von V6_S-02 und AJ390291, dass die ersten 637 Nukleotide identisch waren, während die Sequenz der folgenden 33 Nukleotide mit der Vergleichssequenz des AJ390289 übereinstimmten. Ab Base 670 konnten keine Unterschiede zwischen allen miteinander verglichenen Sequenzen festgestellt werden.

3. Ergebnisse

205	:	AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTT	:	60
AJ390289	:	AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTT	:	60
AJ390291.1	:	AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTT	:	60
AJ390306	:	AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTCGATTAGACGATGAGTTGAATTTGACTCTT	:	60
205	:	ATGAAGTGCACCATCAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATG	:	120
AJ390289	:	ATGAAGTGCACCATCAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATG	:	120
AJ390291.1	:	ATGAAGTGCACCATCAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATG	:	120
AJ390306	:	ATGAAGTACACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATG	:	120
205	:	CAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGA	:	180
AJ390289	:	CAAAACAAGAGCAAGGTATCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGA	:	180
AJ390291.1	:	CAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGA	:	180
AJ390306	:	CAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCAAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGA	:	180
205	:	ATGTTGGAACATCTGGAACCTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGA	:	240
AJ390289	:	ATGTTGGAACATCTGGAACCTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGA	:	240
AJ390291.1	:	ATGTTGGAACATCTGGAACCTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGA	:	240
AJ390306	:	ATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGA	:	240
205	:	GAATGCCCAA AAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCTC	:	300
AJ390289	:	GAATGCCCAA GAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTATGCTC	:	300
AJ390291.1	:	GAATGCCCAA AAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCTC	:	300
AJ390306	:	GAATGCCCAA AAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCTC	:	300
205	:	CACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACCCAATCACAGTTTGATACGTGGTATG	:	360
AJ390289	:	CACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATG	:	360
AJ390291.1	:	CACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATG	:	360
AJ390306	:	CACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATG	:	360
205	:	AGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGAGATGCCAAGTGTGATGAATGGGC	:	420
AJ390289	:	AAGCGGTACAACCTTGCATACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGC	:	420
AJ390291.1	:	AGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGAGATGCCAAGTGTGATGAATGGGC	:	420
AJ390306	:	AGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGAGATGCCAAGTGTGATGAATGGGC	:	420
205	:	TTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGA	:	480
AJ390289	:	TTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGA	:	480
AJ390291.1	:	TTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGA	:	480
AJ390306	:	TTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGA	:	480
205	:	TGGATGGGGATGAACAAGTTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAA	:	540
AJ390289	:	TGGATGGAGATGAACAAGTTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAA	:	540
AJ390291.1	:	TGGATGGGAATGAACAAGTTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAA	:	540
AJ390306	:	TGGATGGGAATGAACAAGTTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAA	:	540
205	:	CCCTTAGGCAAATCATGGCACACTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCA	:	600
AJ390289	:	CACTTAGGCAAATCATGGCACACTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCA	:	600
AJ390291.1	:	CCCTTAGGCAAATCATGGCACACTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGTA	:	600
AJ390306	:	CCCTTAGGCAAATCATGGCACACTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCA	:	600

Abb. 21: Vergleich der Sequenz 205 (V6_S-02) auf Nukleotidebene mit denen aus der GeneBank stammenden Kontrollen PVY^{NTN} (AJ390289) und PVY^O (AJ390306) sowie einer weiteren Vergleichssequenz (AJ390291). Eingerahmte Sequenzbereiche = wie PVY^O; unterlegte Bereiche = wie Kontrolle PVY^{NTN}; einzelne abweichende Nukleotide sind hellgrau unterlegt dargestellt.

3. Ergebnisse

205 : ACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTA **STTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTT** : 660
AJ390289 : AAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTT : 660
AJ390291.1 : ACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTT : 660
AJ390306 : AAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTT : 660

205 : **TGGCTCGCT** ATGCTTTTGACTTTTATGAA **G**TCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGG : 720
AJ390289 : TGGCTCGCT ATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGG : 720
AJ390291.1 : TAGCGCGTT ATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGG : 720
AJ390306 : TAGCGCGTT ATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGARYACCAGTGAGGGCTAGGG : 720

205 : AAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGT : 780
AJ390289 : AAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGT : 780
AJ390291.1 : AAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGT : 780
AJ390306 : AAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGT : 780

205 : TGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCT : 840
AJ390289 : TGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCT : 840
AJ390291.1 : TGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCT : 840
AJ390306 : TGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCT : 840

205 : CTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACG : 900
AJ390289 : CTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACG : 900
AJ390291.1 : CTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACG : 900
AJ390306 : CTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACG : 900

205 : ATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCAT : 960
AJ390289 : ATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCAT : 960
AJ390291.1 : ATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCAT : 960
AJ390306 : ATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCAT : 960

205 : AATTAATAATCAGTTTGA **G**TATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTG : 1020
AJ390289 : AATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTG : 1020
AJ390291.1 : AATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGAT **G**GAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTG : 1020
AJ390306 : AATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTG : 1020

205 : TGGTGACTCTATCTTTTAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTGTGCG : 1080
AJ390289 : TGGTGACTCTATCTTTTAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTGTGCG : 1080
AJ390291.1 : TGGTGACTCTATCT **G**TTAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAA **G**AGTGCCGGGTGTGCG : 1080
AJ390306 : TGGTGACTCTATCTTTTAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTGTGCG : 1080

205 : TTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTCTGTGCTAGCAGTGACTATGT : 1140
AJ390289 : TTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTCTGTGCTAGCAGTGACTATGT : 1140
AJ390291.1 : TTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTCTGTGCTAGCAGTGACTACGT : 1140
AJ390306 : TTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTCTGTGCTAGCAGTGACTATGT : 1140

205 : CTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAGTGACTGTAACTTCAA : 1200
AJ390289 : CTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAGTGACTGTAACTTCAA : 1200
AJ390291.1 : CTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTT **G**CGTCATAACAGTGACTGTAACTTCAA : 1200
AJ390306 : CTGGATCTATCTACTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAGTGACTGTAACTTCAA : 1200

205 : TCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT : 1224
AJ390289 : TCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT : 1224
AJ390291.1 : TCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT : 1224
AJ390306 : TCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT : 1224

(Fortsetzung von Abb. 21)

3. Ergebnisse

Die Sequenzanalyse machte deutlich, dass sich von insgesamt 56 sequenzierten Fragmenten nur eines (1,7%) deutlich von den übrigen abhob. Bezogen auf die insgesamt 642 mittels RFLP untersuchten PVY Fragmente tritt dieser Virustyp in den untersuchten Proben eher zufällig (0,16%) auf. Diese Virussequenz entstammte aus einer transgenen Kartoffel, und konnte beim Nukleotidvergleich der untersuchten Fragmente, keiner der beiden Hauptgruppen zugeordnet werden. Da sie sowohl einige gemeinsame Sequenzbereiche mit dem PVY^{NTN}, aber auch andere mit dem PVY^O aufwies, wurde sie zwangsläufig zwischen diesen Gruppen angesiedelt. Eine sehr ähnliche Sequenz eines früher amplifizierten PVY-Fragments war in der Datenbank (GenBank) vorhanden, die aus einer nicht-transgenen Kartoffel gewonnen wurde. Von einem Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Isolates und dem Anbau der transgenen Kartoffelvariante auf der Freisetzungsfäche kann damit auch nicht ausgegangen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass bei den Freisetzungen zwar eine große Anzahl an Virusinfektionen vorgefunden wurde, durch RFLP- und Sequenzanalysen aber lediglich eine potenzielle PVY-Rekombinante identifiziert wurde, sollten zusätzliche Labor- und Gewächshausexperimente durchgeführt werden. Durch diese sollten sowohl Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen Viren, als auch zwischen transgenen Pflanzen mit viralen Sequenzen und Kartoffelviren untersucht werden.

3.2. Freisetzungsunabhängige Labor- und Gewächshausexperimente

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen zum inter- und intramolekularen Rekombinationsverhalten der Kartoffelviren PVX und PVM innerhalb der viralen Bereiche des TGBs und des CPs dargestellt.

3.2.1. Untersuchungen zur homologen Rekombination von PVX-Deletionsmutanten in transgenen Tabakpflanzen

In virusinfizierten transgenen Pflanzen, die virale Gene exprimieren, könnten aufgrund von Rekombinationsereignissen zwischen pflanzlicher und viraler RNA veränderte Viren entstehen, die sich wiederum unter Umständen durch veränderte biologische Eigenschaften auszeichnen könnten. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, inwieweit die Genome verschiedener PVX-Mutanten, die Deletionen innerhalb des TGB aufweisen, durch intermolekulare homologe Rekombinationen mit der RNA von Tabakpflanzen (*N. benthamiana*), die die entsprechenden vollständigen ORFs exprimieren, wiederhergestellt werden. Dazu wurden zunächst die für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellten transgenen Tabaklinien (1/23 und 118) überprüft.

3.2.1.1. Überprüfung der PVX-TGB1 und PVX-TGB2 transgenen Tabakpflanzen

Die aus dem Saatgut PVX-TGB1 transgener Tabakpflanzen (*N. benthamiana*, Linie 1/23, vergleiche Punkt 2.1.13.2) angezogenen Pflanzen wurden nach DNA-Extraktion zunächst mittels PCR unter Verwendung der PVX-TGB1 spezifischen Primer PVXTGB1up und PVXTGB1low (siehe Tabelle 7) auf das Vorhandensein des Transgens überprüft. Nur die Pflanzen, bei denen ein PVX-TGB1 spezifisches Fragment (691 bp) amplifiziert werden konnte, wurden für die späteren Versuche verwendet. Zusätzlich wurden stichprobenhaft sechs solcher Pflanzen auf das Vorhandensein des Transkriptes überprüft, indem nach Gesamt-RNA-Extraktion eine

3. Ergebnisse

RT-PCR unter Verwendung derselben Primer erfolgte. Auch hier konnten PVX-TGB1 spezifische Fragmente amplifiziert werden.

Auf ähnlicher Weise wurden auch die Überprüfungen der PVX-TGB2 transgenen Tabakpflanzen (*N. benthamiana* der Linie 118, vergl. Tabelle 7) durchgeführt. Dabei fanden in den PCR- und in den stichprobenhaft durchgeführten RT-PCR- Ansätzen die PVX-TGB2 spezifischen Primer PVX-TGB2up und PVX-TGB2low (siehe Tabelle 7) Verwendung. Transgene Pflanzen zeichneten sich dadurch aus, dass bei ihnen ein PVX-TGB2 spezifisches Fragment (310 bp) amplifiziert werden konnte.

3.2.2. Herstellung der PVX Deletionsmutanten

Bei den Plasmiden pPVX0014 (kurz PVX1) und pPVX-DsRed (kurz PVX2) handelt es sich um zwei infektiöse PVX Vollängenklone. Ein Vergleich auf Aminosäureebene zwischen diesen beiden Plasmiden zeigte, dass innerhalb der Sequenz des TGBp1 die beiden Vollängenklone untereinander nur wenige Aminosäureunterschiede aufweisen, während die Aminosäuresequenzen beider Plasmide im Bereich des TGBp2 identisch sind (siehe Abb. 22 und Abb. 23). Wie unter 2.4.1 beschrieben, wurden in diesen beiden PVX-Vollängenklonen in getrennten Ansätzen jeweils eine Deletion im TGB1 und im TGB2 unter Verwendung verschiedener Restriktionsendonukleasen und des Klenow-Fragments erzeugt. Die Sequenzverluste zeichneten sich dadurch aus, dass die einzelnen ORFs nicht verändert wurden. Die deletierten Bereiche in den TGB1 Deletionsmutanten (PVX1-Del1 und PVX2-Del1) können aus Abb. 22, und die der TGB2 Deletionsmutanten (PVX1-Del2 und PVX2-Del2) aus Abb. 23 entnommen werden. Zusätzlich sind die Größen der Deletionen auf Nukleotidebene in Tabelle 41 angegeben.

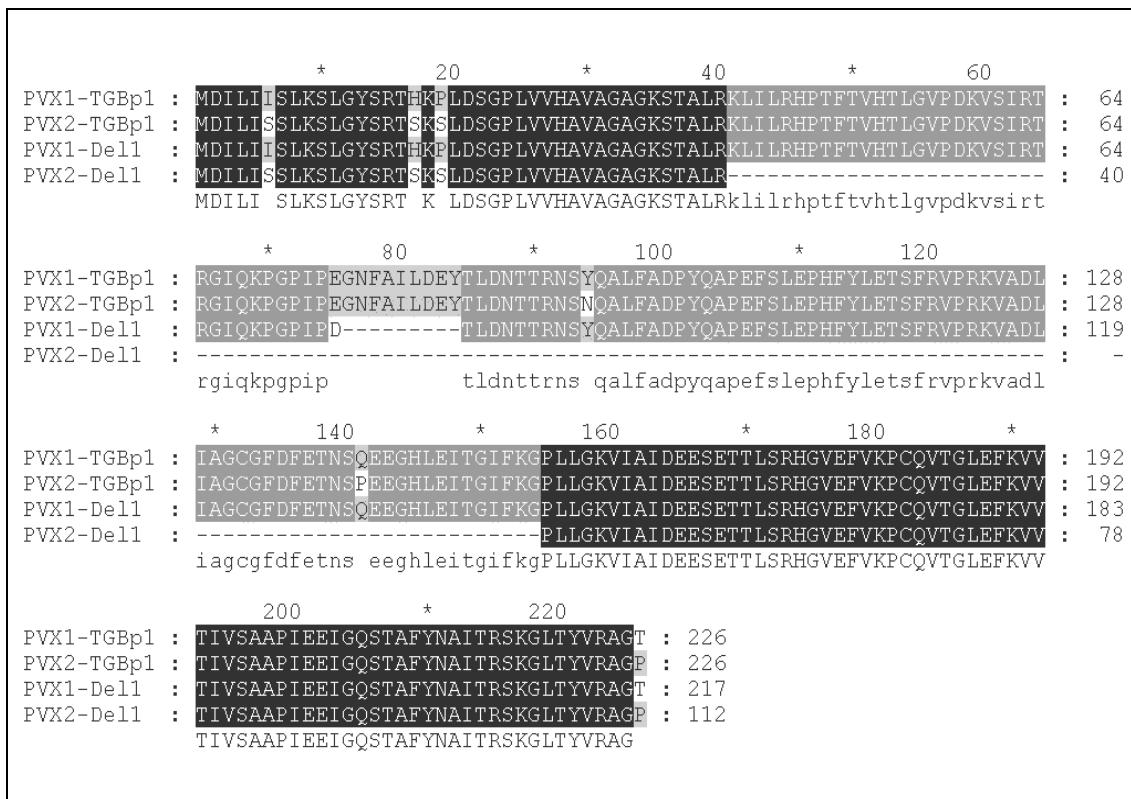


Abb. 22: Übersicht über die deletierten Bereiche innerhalb des TGBp1 der beiden PVX-Vollängenklone PVX1 und PVX2

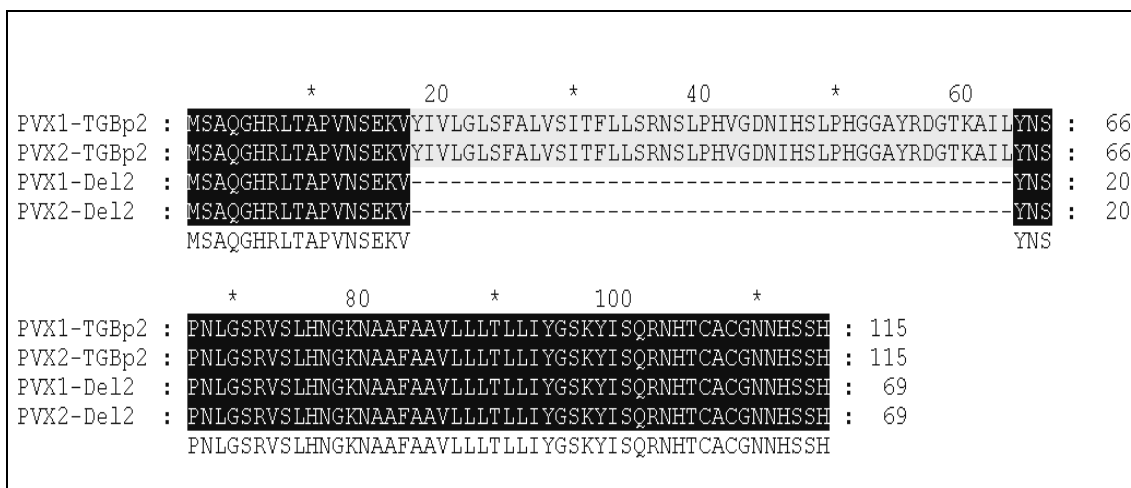


Abb. 23: Übersicht über die deletierten Bereiche innerhalb des TGB2 der beiden PVX-Vollängenklone PVX1 und PVX2. Innerhalb dieses ORFs weisen sowohl die Ausgangssequenzen, wie auch die Deletionsmutanten untereinander keine Unterschiede auf.

3.2.2.1. Rekombinationsuntersuchungen

Sowohl die PVX- Volllängenklone PVX1 und PVX2, als auch die von ihnen abstammenden Deletionsmutanten wurden durch Partikel-Bombardements in transgene und in nicht-transgene Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) eingebracht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 41. Drei Wochen nach Inokulation konnten sowohl bei den nicht-transgenen, als auch bei den TGB1 und TGB2 transgenen Tabakpflanzen, in die PVX1 oder PVX2 eingebracht worden waren, typische PVX-Symptome festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnten bei keiner der transgenen Pflanzen, die mit den verschiedenen PVX-Deletionsmutanten inokuliert worden waren, erkennbare PVX-Symptome beobachtet werden.

Alle Pflanzen wurden 28 Tage nach Inokulation serologisch mittels TPIA auf systemische PVX Infektionen hin überprüft. Zur Verifizierung des serologischen Befundes wurden die PVX Infektionen stichprobenhaft bei jeweils sechs Pflanzen zusätzlich durch RT-PCR unter Verwendung der Primer PVXup und PVXlow (vergleiche Tabelle 7) überprüft.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tabelle 41.

Tabelle 41: Infektiositätstestungen verschiedener PVX-Volllängenklone und deren Deletionsmutanten auf sowohl transgenen wie auch nicht-transgenen Tabakpflanzen

PVX Konstrukt	Deletion in bp. ORF komplett und deletiert (% Verlust des ORFs)	<i>N. benthamiana</i>	Anzahl infizierter Pflanzen pro inokulierter Pflanze (und in %)
PVX1	keine	nicht transgen	36/36 (100)
PVX1-Del1	27 678/651 (4%)	nicht transgen	0/12 (0)
PVX1-Del2	138 345/204 (41%)	nicht transgen	0/12 (0)
PVX1-Del1	27 678/651 (4%)	1/23 (TGB-1 transgen)	20/36 (55,6)
PVX1-Del2	138 345/204 (41%)	118 (TGB-2 transgen)	0/23 (0)
PVX2	keine	nicht transgen	36/36 (100)
PVX2-Del1	342 678/336 (50%)	nicht transgen	0/12 (0)
PVX2-Del2	138 345/207 (40%)	nicht transgen	0/12 (0)
PVX2-Del1	342 678/336 (50%)	1/23 (TGB-1 transgen)	13/36 (36,1)
PVX2-Del2	138 345/207 (40%)	118 (TGB-2 transgen)	0/30 (0)
PVX1	keine	1/23 (TGB1 transgen)	11/12 (eine abgestorben)
PVX2	keine	1/23 (TGB1 transgen)	12/12 (100)
PVX1	keine	118 (TGB-2 transgen)	12/12 (100)
PVX2	keine	118 (TGB-2 transgen)	12/12 (100)

Die Pflanzen der beiden transgenen Tabaklinien (118 und 1/23) erwiesen sich als nicht resistent gegenüber einer PVX Infektion. Innerhalb von 14 Tagen nach Inokulation mit den PVX-Volllängenklonen PVX1 und PVX2 zeigten alle diese Pflanzen typische Blattsymptome und die Virusinfektionen konnten serologisch mittels TPIA nachgewiesen werden.

Bei den nicht-transgenen Tabakpflanzen, die mit einer der insgesamt vier PVX-Deletionsmutanten inokuliert worden waren, konnte serologisch keine systemische PVX Infektion festgestellt werden. Ebenso konnte bei keiner PVX-TGB2-transgenen Pflanze

3. Ergebnisse

der Linie 118, die zuvor mit den Klonen (PVX1-Del2 oder PVX2-Del2) inokuliert worden waren, eine PVX Infektion nachgewiesen werden.

Anders verhielt es sich bei den PVX-TGB1-transgenen Tabakpflanzen, in die zuvor die PVX-Klone PVX1-Del1 bzw. PVX2-Del1 eingebracht worden waren. Hier konnte bei 56% bzw. 36% dieser transgenen Pflanzen eine systemische PVX Infektion serologisch festgestellt werden. Dieses Ergebnis konnte (wie bereits oben beschrieben) stichprobenhaft nach Gesamt-RNA-Extraktion einiger Pflanzen mittels RT-PCR bestätigt werden, und im Falle des PVX2-Del1 auch durch die DsRed-Fluoreszenz belegt werden (siehe Abb. 24).

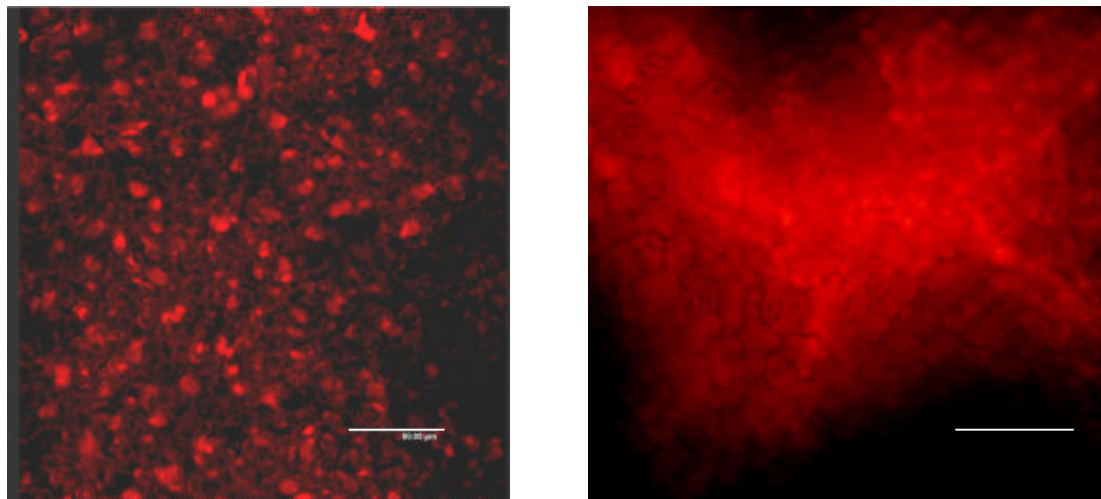


Abb. 24: Infektionen von PVX2 und PVX2-Del1 in nicht-transgenen und in TGB1 transgenen *N. benthamiana*

Das linke Bild zeigt die DsRed Expression in *N. benthamiana*, die 40 Tage zuvor mit PVX2 inokuliert worden war. Der Größenstandard markiert eine Länge von 80 μm . Das rechte Bild zeigt die DsRed Expression in einer PVX-TGB1 transgenen *N. benthamiana* Pflanze, 32 Tage nach Inokulation mit dem PVX2-Del1. Hier gibt der Größenstandard eine Länge von 100 μm an.

Um zu klären, ob Rekombinationsereignisse auf RNA-Ebene zwischen den PVX-TGB1 exprimierenden Tabakpflanzen und den aus den Vollängenklonen PVX1-Del1 und PVX2-Del1 hervorgegangen deletierten Viren bei diesen zu einer Wiedererlangung der fehlenden Genomsequenz führten, wurde Pflanzenpresssaft von jeder der insgesamt 33

PVX infizierten PVX-TGB1 transgenen Tabakpflanzen mechanisch auf jeweils drei nicht-transgene Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) übertragen. Sollte eine solche homologe Rekombination stattgefunden haben, so würde dieses Virus in der Lage sein nicht-transgene Pflanzen zu infizieren und sich in diesen auszubreiten. Zur Kontrolle wurde ebenso mit den Pflanzenpresssäften von sechs nicht-transgenen Tabakpflanzen verfahren, die zuvor mit einem der beiden ursprünglichen Vollängenklone (drei mit PVX1 und drei mit PVX2) inokuliert worden waren.

Die Übertragung des PVX auf nicht transgene Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) gelang nur aus den nicht-transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen, die zuvor mit PVX1 oder PVX2 inokuliert worden waren. Bei der serologischen Überprüfung aller inokulierten Pflanzen mittels TPIA (28 dpi) konnten PVX Infektionen nur bei den Kontrollpflanzen festgestellt werden, die auch typische Blattsymptome aufwiesen.

Bis zu sieben Wochen nach der Inokulation konnte bei keiner Pflanze, die mit einem von einer TGB1-transgenen Pflanze stammenden Presssaft inokuliert worden war, eine PVX-Infektion festgestellt werden. Offensichtlich fand in keiner der 33 PVX-TGB1 transgenen Tabakpflanzen Rekombinationen statt, die zu einer Rekonstitution des vollständigen PVX Genoms und damit zu einem übertragbaren, ausbreitungsfähigen Virus geführt hätten.

3.2.3. Untersuchungen zum Auftreten rekombinanter Viren in PVX und PVM mischinfizierten Tomatenpflanzen

In diesen Untersuchungen wurden in vier Durchgängen insgesamt 40 nicht-transgene Tomatenpflanzen (*S. lycopersicon* cv. Lizzy) mit den nicht verwandten Viren PVX und PVM doppelt infiziert. Dazu wurden diese Pflanzen mechanisch mit einer Mischung aus PVM- und PVX-haltigem Pflanzenpresssaft co-inokuliert. Der PVM-haltige Presssaft stammte von einer Tomatenpflanze, die zur PVM Erhaltung diente, der PVX-haltige Presssaft wurde von einer Tomatenpflanze gewonnen, die zuvor mit dem PVX-Volllängenklon (VLK) pPVX0014 mittels Partikel-Bombardement inokuliert worden war. Die mechanisch inokulierten Tomatenpflanzen wurden 28 Tage nach Inokulation serologisch mit dem TPIA, siehe Punkt 2.3.4.4, auf PVM und PVX Infektionen hin überprüft. Bei allen 40 Pflanzen konnte eine Doppelinfection festgestellt werden. Obwohl die beiden Kartoffelviren unterschiedlichen Genera angehören, ähneln sie sich jedoch sehr stark in ihren Genomaufbau. Da beide Viren wie bereits in der Einleitung beschrieben einen TGB besitzen, dessen Proteine maßgeblich für die Virusausbreitung verantwortlich sind, sollte in dieser Untersuchung sowohl dieser, wie auch der sich anschließende CP Bereich auf Rekombinationen hin untersucht werden. Da das verwendete PVX auf einem Volllängenklon beruhte, war damit auch eine definierte PVX-Sequenz verfügbar. Diese wurde zunächst einmal dazu verwendet, die Primer PVXs und PVXas (siehe Tabelle 7) mit Hilfe des Computerprogrammes VektorNTI abzuleiten. Mittels RT-PCR und unter Verwendung dieser PVX-Oligonukleotide konnten sowohl aus den RNA-Proben der doppelinfizierten Pflanzen, als auch aus Kontrollpflanzen (nur PVX infizierte Tomaten) PVX spezifische 1910 bp umfassende Fragmente amplifiziert werden. Diese umfassten sowohl den Bereich des TGB, als auch nahezu das gesamte Hüllproteingen des ursprünglichen PVX, das auf dem Plasmid pPVX0014 beruhte (siehe Abb. 25). Zur Bestätigung des serologischen Befundes wurden zusätzlich stichprobenhaft sechs RNA-Proben, von doppelinfizierten Tomaten stammend, für eine weitere RT-PCR benutzt. Unter Verwendung der Primer PVM2280 und PVM3400as (siehe Tabelle 9) konnte bei diesen Proben eine PVM-spezifische Bande von 1489 bp amplifiziert werden, wodurch das serologische Testergebnis der Doppelinfection (PVX und PVM) zusätzlich verifiziert wurde.

Die mit Hilfe der Primer PVXs und PVXas amplifizierte Fragmente wurden einer RFLP-Analyse unterzogen, um eventuelle rekombinante Fragmente anhand ihres Fragmentmusters zu identifizieren. Abb. 25 zeigt einen Ausschnitt des PVX-Genoms mit Restriktionsendonuklease-Sites sowie die Lage der Primer PVXs und PVXas. In Tabelle 42 sind die erwarteten Fragmentlängen nach enzymatischen Restriktionen des amplifizierten PVX-Fragments aufgelistet.

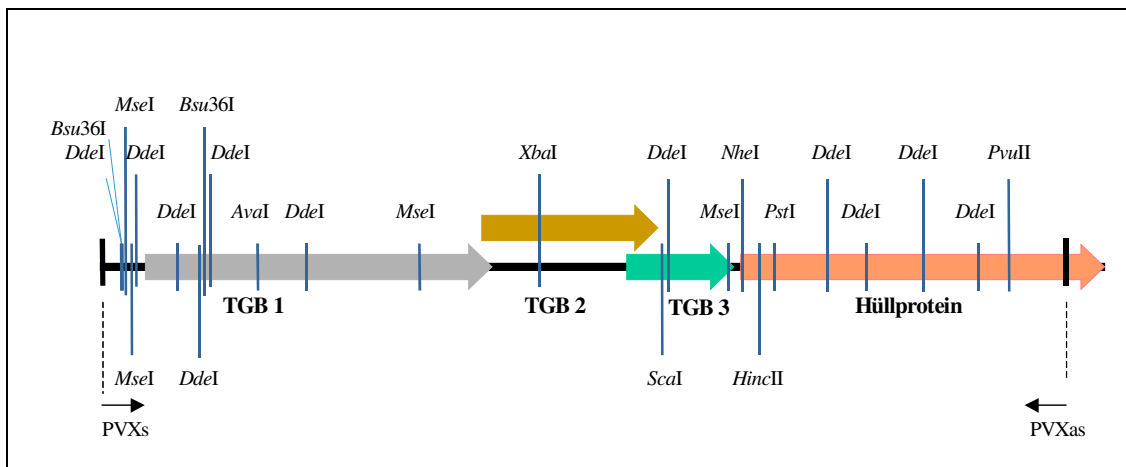


Abb. 25: Schematische Darstellung des 1910 bp PVX Fragments

Die Positionen der verschiedenen Restriktionsenzyme sind gezeigt, ebenso die ORFs, die als Pfeile dargestellt sind.

In getrennten Ansätzen wurden sowohl die PVX-Amplifikate der doppelinfizierten Pflanzen als auch die ausschließlich mit PVX-infizierten Tomaten Restriktionsendonukleasespaltungen mit den Enzymen *HincII*, *XhoI*, *XbaI*, *Bsu36I*, *AvaI*, *ScaI*, *DdeI* und *MseI* unterzogen. Die entstandenen Fragmentmuster wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung miteinander verglichen. In Bezug auf die nach den verschiedenen Restriktionen entstandenen Fragmentmuster wiesen alle PVX Fragmente der Amplifikate, die von doppelinfizierten Pflanzen stammten, untereinander und im Vergleich zu denen, die von rein PVX infizierten Pflanzen amplifiziert werden konnten keinerlei Unterschiede auf.

3. Ergebnisse

Tabelle 42: Fragmentlängen nach der Restriktionsspaltung mit dem entsprechenden Restriktionsenzym im amplifizierten Bereich des PVX

Restriktionsenzym	Fragmentgrößen in bp
<i>Bsu36I</i>	40, 162, 1708
<i>AvaI</i>	6, 307, 1597
<i>XbaI</i>	307, 1603
<i>ScaI</i>	813, 1097
<i>HincII</i>	621, 1289
<i>XhoI</i>	6, 1904
<i>DdeI</i>	15, 30, 39, 52, 71, 80, 97, 121, 184, 197, 323, 702,
<i>NheI</i>	646, 1264
<i>MseI</i>	8, 53, 562, 604, 683
<i>PstI</i>	594, 1316
<i>PvuII</i>	13, 132, 1764

Aufgrund des Versuchsdesigns konnte zwar das gemeinsame Vorkommen beider Viren in den Pflanzen ermittelt werden, jedoch wurden durch diese RFLP-Untersuchungen keine unmittelbar erkennbaren Rekombinationsereignisse auf RNA Ebene zwischen PVX und PVM im untersuchten Genombereich des PVX nachgewiesen.

Deshalb sollte mit Hilfe eines artifiziell erzeugten hüllproteinchimären PVX, das die nahezu vollständige Hüllproteingensequenz des PVM beinhaltet, die Fitness eines solch rekombinanten Virus bewertet werden.

3.2.4. Überprüfung der Fitness des artifiziell hergestellten hüllproteinchimären Vollängenklons pPVX/M-CP

Bei der gleichzeitigen Infektion von Tomatenpflanzen mit PVM und PVX konnten wie unter 3.2.3 beschrieben, im Bereich der Sequenz des TGBs und der des CPs keine rekombinanten Viren identifiziert werden. Darauf aufbauend wurde ein im Hüllproteingen künstlich erzeugter chimärer PVX-Vollängenklon (pPVX/M-CP) hergestellt (siehe 2.4.2), bei dem nahezu die gesamte Hüllproteinsequenz mit der des PVM ausgetauscht wurde. Lediglich 13 bp am N-terminalen und 59 bp im C-terminalen

Bereich der ursprünglichen PVX-Hüllproteinsequenz blieben erhalten. Der Sequenzvergleich der eingefügten PVM-CP Sequenz (906 bp) mit weiteren Sequenzen aus der Datenbank GenBank (NCBI) ergab die höchste Identität (97,7%) mit einer bekannten PVM-CP Sequenz (Accessionbezeichnung: NC_001361). Insgesamt konnten zwar an 21 Positionen Nukleotidsubstitutionen festgestellt werden, die aber weder zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens, noch zu einer Ausbildung eines vorzeitigen Stop-Codons führten. Die Sequenz dieses viralen Bereiches kann im Anhang aus der Abb. 34 entnommen werden. Dieses Plasmid (pPVX/M-CP) wurde in gleicher Weise wie der unmodifizierte PVX-Volllängenklon (pPVX0014), in vier Versuchswiederholungen in jeweils sechs Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) durch Partikel-Bombardements eingebracht. Weitere sechs Tomatenpflanzen der Sorte Lizzy wurden durch mechanische Inokulation mit PVM-haltigem Presssaft als zusätzliche Kontrolle inokuliert. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 43.

Tabelle 43: pPVX/M-CP Inokulationen in vier Versuchswiederholungen (28dpi)

verwendetes Inokulum	Testpflanzen (jeweils 24 Pflanzen)	Anzahl Pflanzen mit Blattsymptomen	Anzahl positiv getesteter Pflanzen, mittels		
			ELISA (PVX-IgG)	ELISA (PVM-IgG)	RT-PCR (PVX-TGB1)
pPVX0014	<i>N. benthamiana</i>	24	24/24	0/24	24/24
pPVX/M-CP	<i>N. benthamiana</i>	0	0/24	0/24	0/24
PVM-haltiger Presssaft	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0	0/24	24/24	nicht durchgeführt

Vier Wochen nach Inokulation zeigten die Tabakpflanzen, die mit dem PVX-Volllängenklon inokuliert worden waren deutliche und für PVX Infektionen typische Blattsymptome. Deshalb konnten davon ausgegangen werden, dass die Inokulationsmethode auch für das hüllproteinchimäre Plasmid geeignet sein musste.

Bei den serologischen Untersuchungen stellten sich nur die Kontrollpflanzen als PVX- bzw. PVM-infiziert heraus. Bei den Tabakpflanzen, die mit pPVX/M-CP inokuliert worden waren, konnte serologisch weder eine PVX-, noch eine PVM-Infektion

3. Ergebnisse

nachgewiesen werden. Bei der Überprüfung aller Tabakpflanzen mit Hilfe der RT-PCR, unter Verwendung der Primer PVXTGB1up und PVXTGB1low (siehe Tabelle 7), konnte jeweils nur aus den RNA Proben ein 691 bp Fragment amplifiziert werden, die auf Pflanzen zurückzuführen waren, die zuvor mit dem Ausgangsklon (pPVX0014) inokuliert worden waren. Dieses Fragment umfasste den Bereich des PVX-TGB1 des PVX, und bestätigte somit die PVX-Infektionen der Kontrollpflanzen.

Somit bewirkte also die nahezu vollständige Substitution der potexviralen Hüllproteingensequenz durch die des PVM einen Verlust der Infektiosität dieses artifiziell erzeugten rekombinanten Virus, das auf das pPVX/M-CP zurückgeführt werden konnte.

Für zukünftige genauere Untersuchungen des potenziellen Ausmaßes und den Auswirkungen einer intermolekularen, nicht-homologen Rekombinationen zwischen dem PVX und dem PVM wurde ein infektiöser Vollängenklon des PVM hergestellt.

3.2.5. Herstellung einer infektiösen cDNA Kopie des PVM

Nach Gesamt-RNA Extraktion aus Blattmaterial einer PVM infizierten *N. hesperis* - Pflanze wurden, wie unter 2.4.3 beschrieben, zwei sich leicht überlappende DNA Fragmente (3165 bp und 5439 bp) amplifiziert, die das gesamte Genom des PVM repräsentierten. Aufgrund einer im PVM-Genom einzeln vorkommenden und in ihren Überlappungszonen befindlichen Restriktionsschnittstelle (*Afl*III) konnten beide Fragmente miteinander verbunden werden. Dazu wurde zunächst die PVM-Sequenz mit der Bezeichnung NC_001361 aus der GenBank (NCBI) als Grundlage verwendet, und mit der Sequenz eines bereits früher hergestellten, aber nicht infektiösen PVM-Klons verglichen. Der Bereich um die Schnittstelle *Afl*III zeigte bei beiden Sequenzen große Homologien auf, so dass mit Hilfe des Computerprogramms VectorNTI für den bereits vorhandenen Primer PVM1s ein neuer antisense Primer (PVMSFas) und für den bereits vorhandenen Primer PVM3as ein neuer sense Primer (PVMSF2s) entwickelt wurde (Primersequenzen siehe Tabelle 8).

Nachdem die beiden Fragmente, wie unter 2.4.3.4 beschrieben, nacheinander in das Plasmid pe35AscIRibo.2 kloniert worden waren, konnten insgesamt 21 rekombinante Plasmide identifiziert werden, bei denen das vollständige Genom des PVM hinter der verdoppelten 35S CaMV-Promotor Sequenz vorlag (pe35+PVM_1 bis pe35+PVM_21). Bei diesen wurde das 5'-UTR Ende des PVM Genoms durch sechs Fremdnukleotide künstlich verlängert, da die am Ende des verdoppelten 35S CaMV-Promotors befindliche *AscI* Restriktionsschnittstelle des Vektors pe35AscIRibo.2 für die Klonierungsarbeiten verwendet wurde (siehe Abb. 26).

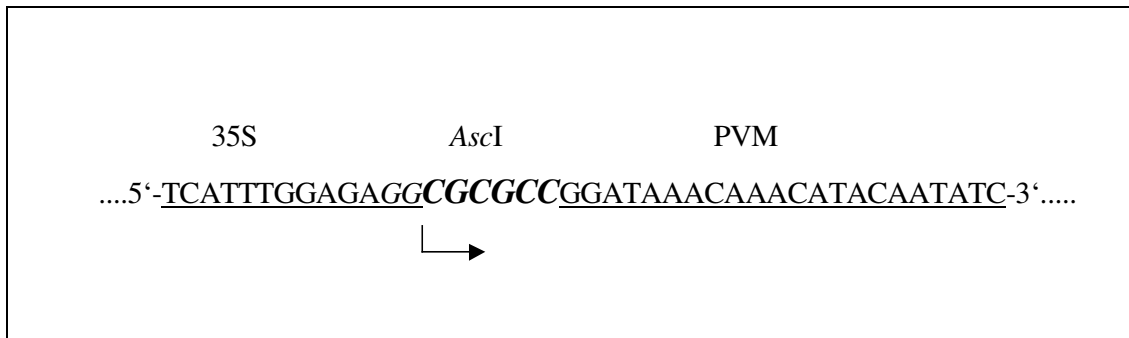


Abb. 26: Schematische Darstellung der Region zwischen dem 35S CaMV-Promotor 3'-Terminus (35S, unterstrichen) und dem Beginn der viralen Sequenz (PVM, unterstrichen).

Der Transkriptionsstart ist durch einen Pfeil dargestellt. Die sechs Fremdnukleotide (in der *AscI* Restriktionsschnittstelle (kursiv)) wurden fett hervorgehoben.

Ein schematischer Aufbau der cDNA Kopie des PVM Genoms unter Kontrolle eines verdoppelten 35S CaMV Promotors in den rekombinanten Plasmiden pe35+PVM ist in Abb. 27 gezeigt.

3. Ergebnisse

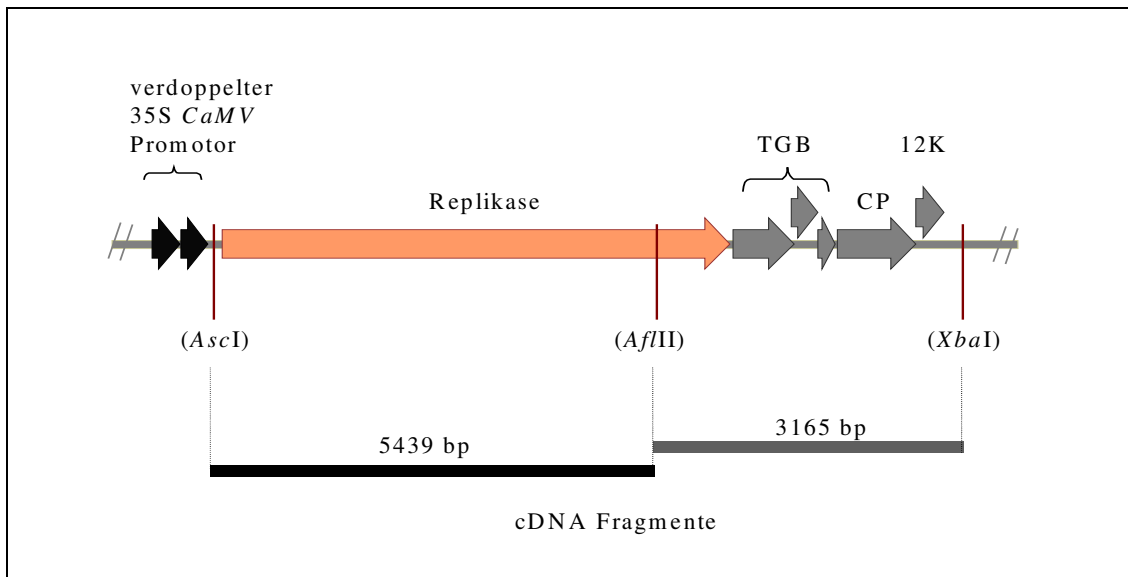


Abb. 27: PVM Genom unter Kontrolle eines verdoppelten 35S CaMV Promotors (pe35PVM).

Die ORFs (Pfeile) des PVM und deren Bezeichnungen sowie die für die Klonierungsstrategie benötigten Restriktionsendonukleasen sind gezeigt. Im unteren Bereich der Abbildung sind die beiden DNA Fragmente als schwarze Rechtecke dargestellt, die das PVM Genom umfassen.

3.2.5.1. Infektiositätsprüfung der rekombinanten Plasmide des Typs pe35+PVM

Aliquots der 21 rekombinanten Plasmide (pe35+PVM_1 bis _21) wurden zu Mischproben vereinigt, und daran anschließend mittels Partikel-Bombardements (vergleiche 2.3.13.4) hauptsächlich in *N. hesperis*, in *S. lycopersicon* cv. Lizzy und in einigen Fällen in *N. benthamiana* -Pflanzen eingebracht. Als Methodenkontrolle für die Funktionstüchtigkeit des Partikel-Bombardements diente der PVX Vollängenklon (pPVX0014), der auf gleiche Weise in die oben genannten Pflanzen übertragen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 44 zusammengefasst.

Tabelle 44: Partikel-Bombardement zur Überprüfung der rekombinanten Plasmide pe35+PVM

Durchgang	Zusammensetzung der Mischproben pe35+PVM_	verwendete Pflanzen	PVM infizierter / inokulierter Pflanzen
1	17, 18, 19	<i>N. hesperis</i>	0/3
2	1, 2, 3	<i>N. hesperis</i>	0/3
3	4, 5, 6	<i>N. hesperis</i>	0/3
4	17, 18, 19	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0/3
5	1, 2, 3	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0/3
6	4, 5, 6	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0/3
7	13, 15, 16	<i>N. hesperis</i>	0/3
8	14, 18, 19	<i>N. hesperis</i>	0/3
9	4, 19, 21	<i>N. hesperis</i>	0/3
10	13, 15, 16	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0/3
11	14, 18, 19	<i>N. hesperis</i>	0/3
12	1, 2	<i>N. hesperis</i>	0/3
13	3, 4	<i>N. hesperis</i>	0/3
14	5, 6	<i>N. hesperis</i>	0/3
15	7, 8	<i>N. hesperis</i>	0/3
16	10, 11	<i>N. hesperis</i>	0/3
17	12, 13	<i>N. hesperis</i>	0/3
18	15, 16	<i>N. hesperis</i>	0/3
19	9, 14	<i>N. hesperis</i>	0/3
20	17, 18	<i>N. hesperis</i>	0/3
21	19, 20	<i>N. hesperis</i>	0/3
22	17, 18	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0/4
23	19, 20	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0/4
24	1 – 10	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0/4
25	1 – 10	<i>N. benthamiana</i>	0/4
26	11 – 21	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	0/4
27	11 – 21	<i>N. benthamiana</i>	0/4
Kontrolle	pPVX0014	<i>N. benthamiana</i>	6/6
Kontrolle	pPVX0014	<i>N. hesperis</i>	6/6
Kontrolle	pPVX0014	<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	6/6

3. Ergebnisse

28 Tage nach Inokulation wurden die Pflanzen mittels TPIA auf Vorhandensein von PVM, bzw. PVX-Infektionen überprüft. Bei den Tabakpflanzen, die als Kontrolle dienten und in die zuvor pPVX0014 eingebracht worden war, konnten an den Blättern Virussymptome beobachtet werden, die auf eine PVX Infektion hindeuteten. Die Bestätigung konnte sowohl bei diesen Pflanzen, als auch bei den Tomatenpflanzen, bei denen keinerlei Symptome zu erkennen waren, durch TPIA erbracht werden. PVM Infektionen hingegen konnten serologisch lediglich bei den Pflanzen, die als Positivkontrollen dienten, bestätigt werden. Diese waren zuvor mit Presssaft PVM infizierter Pflanzen inokuliert worden. Unabhängig von den Zusammensetzungen der Mischproben, konnte bei keiner mittels Partikel-Bombardement inokulierten Pflanze weder 28 noch 56 Tage nach Inokulation eine PVM Infektion festgestellt werden (vergleiche Tabelle 44).

Da durch Partikel-Bombardement der verschiedenen pe35+PVM Plasmide keine PVM Infektionen in den Pflanzen hervorgerufen werden konnten, sollte die Möglichkeit eines Transfers des Volllängensklons durch *A. tumefaciens* überprüft werden. Dazu war es notwendig, die Kasette, bestehend aus dem verdoppeltem 35S CaMV-Promotor und der PVM Sequenz, in ein Derivat des modifizierten binären Vektors pBIN19-SN umzuklonieren.

Wie unter 2.4.3.5 beschrieben, wurde aus einer Mischprobe, die aus den insgesamt 21 rekombinanten Plasmiden pe35+PVM_1-21 bestand, ein Fragment über die *ClaI* und *XbaI* Restriktionsschnittstellen in das Derivat des binären Vektors pBIN-SN kloniert. Dieses Fragment zeichnete sich dadurch aus, dass es nicht nur die vollständige Sequenz des PVM Genoms, sondern wie in Abb. 28 zu sehen, auch die vorgelagerte verdoppelte 35S CaMV Promotorsequenz besaß.

Insgesamt konnten 10 rekombinante binäre Plasmide identifiziert werden, in die das Fragment integriert werden konnte (pBIN+PVM)

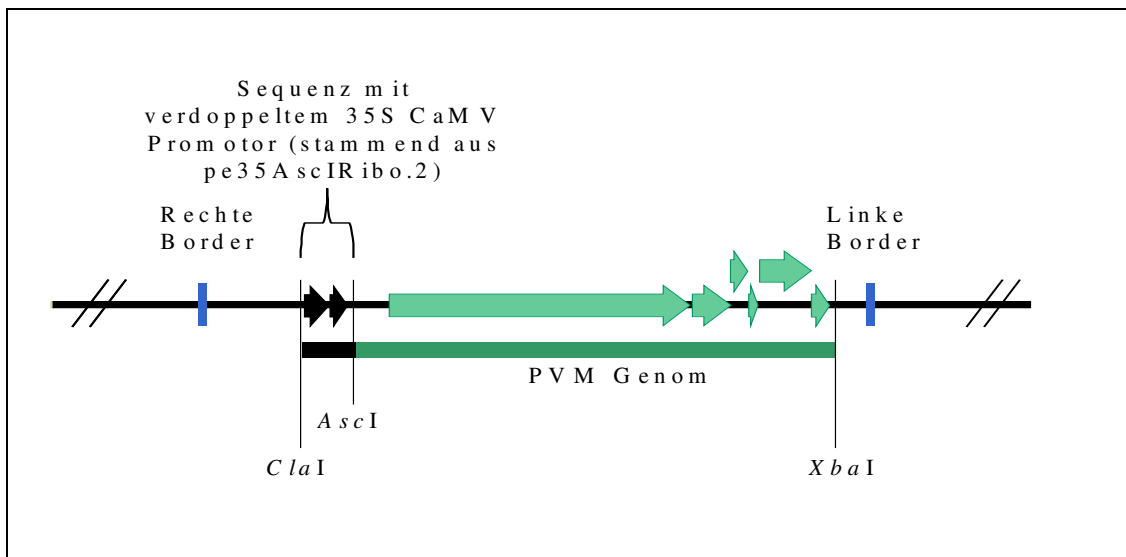


Abb. 28: Teilbereich des Derivates des binären Vektors pBIN-SN zwischen Rechter und Linker Grenze (Border)

Hinter der Sequenz des verdoppelten 35S CaMV Promotors schließt sich die PVM Sequenz (helles schmales Rechteck) an. Durch das schwarze schmale Rechteck ist der Sequenzbereich markiert, der vom Vektor pe35AscIRibo.2 stammt. Die schwarzen Pfeile symbolisieren den verdoppelten 35S CaMV-Promotor, während die helleren Pfeile die ORFs des PVM Genoms markieren. Ausgewählte Restriktionssites wurden eingetragen.

3.2.5.2. Agroporation und Agroinfiltration verschiedener Testpflanzen mit den pBIN+PVM Plasmiden

Die 10 rekombinanten Plasmide (pBIN+PVM) wurden für die Agroinfiltration von Pflanzen sowohl als Mischprobe als auch einzeln in *A. tumefaciens* elektroporiert (2.3.14.2), kultiviert und schließlich für die Agroinfiltration (2.3.14.4) in die Testpflanzen *N. benthamiana*, *N. hesperis* und *S. lycopersicon*. cv. Lizzy verwendet.

Insgesamt sind je 11 der genannten Testpflanzen mit der Mischprobe inokuliert worden. Zusätzlich wurden Pflanzen derselben Arten mit dem Presssaft PVM infizierter *N. hesperis* als Kontrollen (PVM-WT) mechanisch inokuliert. Vier Wochen nach Inokulation wurden die Pflanzen mittels TPIA auf PVM Infektionen (siehe Tabelle 45) überprüft.

3. Ergebnisse

Tabelle 45: Feststellung der PVM Infektionen und Symptombonitur der Testpflanzen (28 dpi)

Testpflanze	Inokulum	Anzahl Pflanzen mit erkennbaren Symptomen	TPIA
			(pos. / total)
<i>N. hesperis</i>	pBIN+PVM-Mix	8/11	8/11 (73%)
	PVM-WT	6/6	6/6 (100%)
<i>N. benthamiana</i>	pBIN+PVM-Mix	0/11	2/11 (18%)
	PVM-WT	0/6	5/6* (83,3%)
<i>S. lycopersicon</i> cv. Lizzy	pBIN+PVM-Mix	0/11	9/11 (82%)
	PVM-WT	0/6	6/6 (100%)

Legende: *eine Pflanze abgestorben

Während *N. hesperis* und *S. lycopersicon* cv. Lizzy hohe Infektionsraten aufwiesen (73% und 82%) betrug diese bei *N. benthamiana* nur 18%. Von den Kontrollpflanzen, auf die zuvor PVM-haltiger Pflanzenpresssaft mechanisch übertragen worden war, wiesen alle eine PVM Infektion auf. Um einzelne infektiöse Klone aus der Mischung zu identifizieren, wurden diese einzeln nach Agroporation und Agroinfiltration in jeweils eine *N. benthamiana*, *N. hesperis* und eine *S. lycopersicon* cv. Lizzy -Pflanze eingebracht (siehe Tabelle 46).

Tabelle 46: Infektiositätsprüfung einzelner PVM-Konstrukte nach Agroinfection

PVM-Konstrukt pBIN+PVM_	Festgestellte PVM Infektion (28 dpi)		
	<i>N. hesperis</i>	<i>N. benthamiana</i>	<i>S. lycopersicon</i> Lizzy
1	+	-	+
3	+	-	+
11	-	-	-
13	-	-	-
14	+	-	+
15a	+	-	+
15b	+	-	+
17	+	+	+
39	+	-	+
41	+	+	+

Legende: + = PVM Infektion festgestellt, - = PVM Infektion nicht nachweisbar

Von den insgesamt 10 rekombinanten Plasmiden (pBIN+PVM) stellten sich nur zwei (11 und 13) als nicht infektiös heraus. Alle übrigen waren in der Lage, in *N. hesperis*

und *S. lycopersicon* cv. Lizzy PVM Infektionen auszulösen. Darüber hinaus konnte in *N. benthamiana*, die mit den Klonen pBIN+PVM_17 bzw. pBIN+PVM_41 inokuliert worden waren, zusätzlich PVM-Infektionen mittels DAS-ELISA festgestellt werden.

Das PVM konnte sich nach Agroinfiltration in den Testpflanzen *N. benthamiana*, *S. lycopersicon* cv. Lizzy und *N. hesperis* systemisch ausbreiten. Jedoch unterscheiden sich die Pflanzen hinsichtlich ihrer Symptomausprägungen deutlich voneinander. Im Gegensatz zu *N. benthamiana* und *S. lycopersicon* cv. Lizzy, bei denen keinerlei visuell erkennbaren Symptome ausgebildet wurden, konnten bei *N. hesperis* neben einer Stauchung der Pflanze deutliche Mosaiksymptome an den Blättern erkannt werden. Außerdem waren die Blätter von infizierten Pflanzen stark gewellt und wiesen im Ganzen eine viel hellere Grünfärbung auf, hinzu kam eine Reduktion der Blattbreite (siehe Abb. 29).



Abb. 29: Vergleich der Stiele und der Blätter von zwei *N. hesperis* -Pflanzen.

Links: Blattsymptome einer durch pBIN+PVM_41 hervorgerufene PVM Infektion. Deutlich können im Vergleich zu der nicht infizierten Pflanze (rechts) die schmalere, leicht aufgerollten Blätter und das Blattmosaik erkannt werden.

Rechts: nicht infizierte *N. hesperis* zum Vergleich.

3. Ergebnisse

3.2.5.3. Nachweis der PVM Infektionen durch Western-Blot (EBIA)

Eine Proteinextraktion wurde mit verschiedenen *N. hesperis* -Pflanzen durchgeführt. Dazu wurden eine gesunde Pflanze, eine mit dem PVM-WT infizierte Pflanze und eine weitere, die mit dem rekombinanten Plasmid pBIN+PVM_41 (im folgenden PVM-VLK genannt) mittels Agroinfektion inokuliert worden war, für die Proteinextraktion eingesetzt. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel und anschließendem Western-Blot fand ein mit Alkalischer Phosphatase konjugierter PVM IgG Verwendung.

Sowohl bei der Pflanze, die durch das PVM-WT infiziert worden waren, als auch bei derjenigen, die durch Agroinfiltration mit dem PVM-VLK behandelt worden war, konnte das PVM Hüllprotein im Western-Blot nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß konnte bei den nicht infizierten *N. hesperis* -Pflanze keine Bande auf dem Blot identifiziert werden. Die Banden befanden sich bei beiden PVM haltigen Proben auf gleicher Höhe und wiesen ein Molekulargewicht von etwa 34 kDa auf. Der Western-Blot ist in Abb. 30 gezeigt.

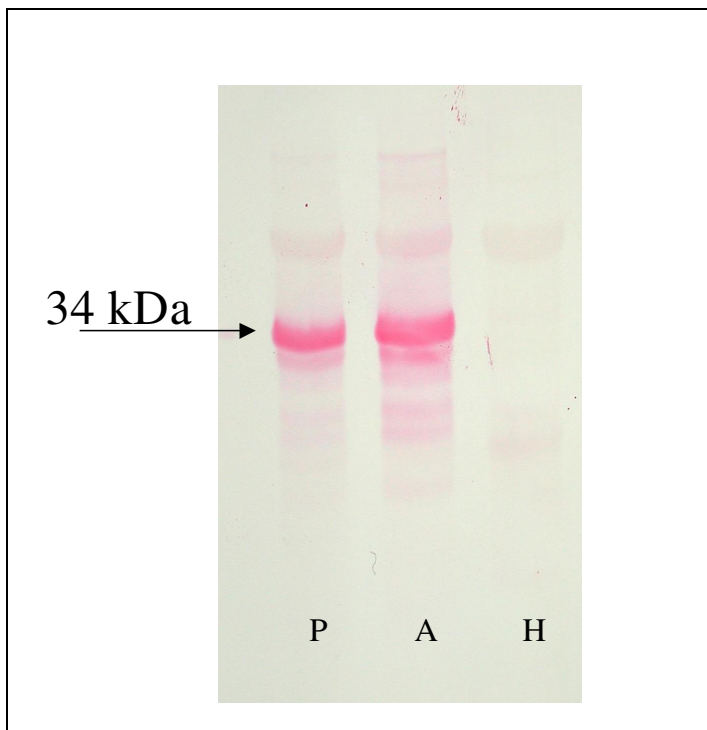


Abb. 30: PVM Nachweis durch Western-Blot mittels PVM-CP spezifischer Antikörper
Legende: P = PVM-WT, A = PVM-VLK, H = nicht infizierte Kontrollpflanze)

3.2.5.4. Elektronenmikroskopischer Nachweis von PVM Partikeln

Für die elektronenmikroskopische Darstellung der PVM Viruspartikel wurden Tropfpräparate (siehe Punkt 2.3.16.1) sowohl von Pflanzen, die mit dem PVM-WT infiziert waren, als auch von Pflanzen, die durch Agroinfiltration mit einem der rekombinanten binären Vektoren (pBIN+PVM) inokuliert worden waren, hergestellt. Unabhängig vom Ursprung der Viren konnten visuell zwischen den vorgefundenen Viruspartikeln keine Unterschiede festgestellt werden. Ein solches PVM-Partikel ist in Abb. 31 dargestellt.

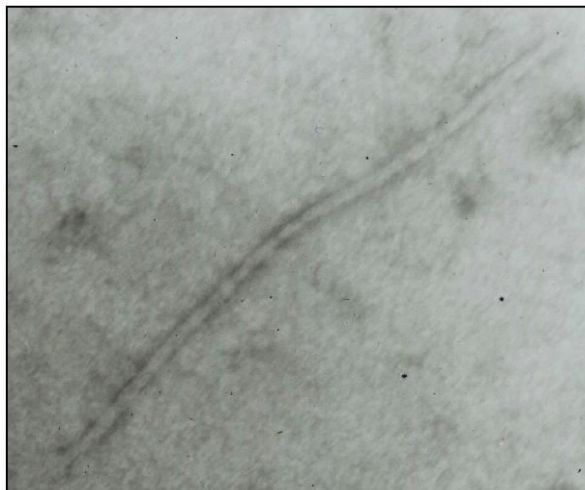


Abb. 31: Elektronenmikroskopische Darstellung eines ca. 700 nm langen PVM - Partikels

Die Aufnahme entstand bei einer 58000 -fachen Vergrößerung. Das Partikel stammte aus einer *N. hesperis* -Pflanze, die zuvor mit dem pBIN+PVM_41 über Agroinfiltration inokuliert worden war.

3.2.5.5. Überprüfung der Übertragbarkeit des auf dem pBIN+PVM beruhenden PVM auf andere Testpflanzen

Verschiedene Pflanzen wurden herangezogen, um zu überprüfen, ob es einen Unterschied im Wirtspflanzenspektrum zwischen dem PVM-WT und dem auf dem rekombinanten binären Vektor pBIN+PVM_41 (PVM-VLK) beruhenden Virus gibt.

3. Ergebnisse

Deshalb wurden sowohl verschiedene Testpflanzen mechanisch mit Pflanzenpresssaft inokuliert, der entweder von einer *N. hesperis* -Pflanze stammte, die zuvor mit PVM haltigem Presssaft inokuliert worden war, bzw. von einer zweiten *N. hesperis*, deren PVM Infektion von einer Agroinfiltration mit dem PVM-VLK herrührte. 28 Tage nach Inokulation wurden die Pflanzen serologisch mit dem TPIA auf systemische PVM Infektionen hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 zusammengefasst.

Tabelle 47: Mechanische Übertragbarkeit des PVM-VLK und Vergleich der Symptomausprägungen bei verschiedenen Pflanzen

deutscher Name	botanische Bezeichnung	Übertragbarkeit PVM-VLK		Übertragbarkeit PVM-WT	
		Anzahl PVM infizierter pro inokulierter Pflanzen	erkennbare Virus-symptome	Anzahl PVM infizierter pro inokulierter Pflanzen	erkennbare Virus-symptome
Eierbaum	<i>Solanum melongena</i>	0/6		0/6	
Engelstropete (Stechapfel)	<i>Datura metel var. Fastuosa</i>	0/6		0/6	
Tomate	<i>S. lycopersicon Lizzy</i>	5/5	nein	5/5	nein
Tabak	<i>N. hesperis</i>	5/5	ja	5/5	ja
Tabak	<i>N. benthamiana</i>	5/5	nein	5/5	nein
Tabak	<i>N. debneyi</i>	0/6		0/6	
Tabak	<i>N. occidentalis</i>	6/6	nein	6/6	nein
Bartnelke	<i>Dianthus barbatus</i>	0/6		0/6	
Gebirgshängnelke	<i>Dianthus caryophyllus 'Johannistag'</i>	0/6		0/6	

Im Gegensatz zu den Nelken, den Engelstropeten und den Eierbäumen konnten bei den Tomaten und verschiedenen Tabakarten nach Inokulation mit den beiden PVM-Isolaten serologisch PVM Infektionen festgestellt werden. Es konnte aber kein Unterschied im Wirtspflanzenspektrum und darüber hinaus bei den an den verschiedenen Tabakarten aufgetretenen Virussympomen zwischen den beiden PVM

Herkünften (PVM-WT und PVM-VLK) festgestellt werden. Die typischen Blattsymptome einer PVM infizierten *N. hesperis* -Pflanze zeigt Abb. 29.

3.2.5.6. Ermittlung der PVM - Sequenz

Von den insgesamt zehn rekombinanten binären Plasmiden wurde pBIN+PVM_41 für die Sequenzierung ausgewählt. Hierzu wurden über das PVM Genom verteilt im Abstand von ca. 350 Basen spezifische Oligonukleotide ausgewählt (siehe Tabelle 10) und im Rahmen eines „Gene-Walking Approaches“, wie in Abb. 32 gezeigt, das komplette PVM Genom bestimmt. Aufgrund von Sequenzierungsschwierigkeiten innerhalb eines im PVM-ORF1 gelegenen kurzen Sequenzbereiches (ca. 800 Nukleotide) wurde ein diese Stelle umfassendes Fragment (ca. 1,2 kbp) aus dem rekombinanten binären Plasmid über die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *XhoI* in den Vektor pBluescript II KS (+) integriert, und sequenziert.

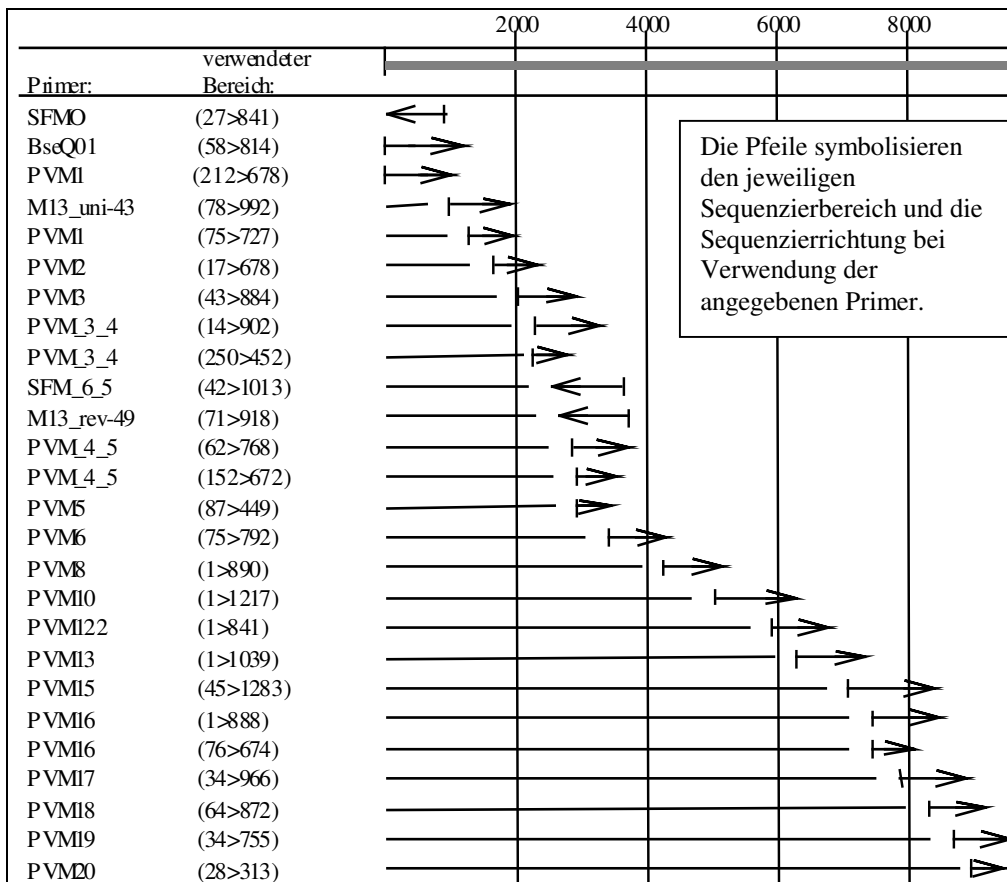


Abb. 32: Sequenzierung des PVM Genoms (schematisch als grauer Balken dargestellt) und Angabe der dafür verwendeten Primer.

3. Ergebnisse

Die ermittelte Nukleotidsequenz und die von ihnen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der einzelnen ORFs wurden mit Hilfe des Programms ClustalX sowohl mit anderen verfügbaren PVM- als auch mit weiteren ausgewählten Carlavirussequenzen verglichen. Die Identitäten zwischen dem sequenzierten PVM und den übrigen Sequenzen erfolgte sowohl auf Nukleotidebene, als auch auf Ebene der Aminosäuresequenzen (siehe Tabelle 48).

Tabelle 48: Identitäten zwischen der ermittelten PVM - Sequenz des Volllängenkons und anderer PVM- bzw. Carlavirussequenzen.

Bezeichnung	Angabe der Identitäten in % (Identität auf Nukleotidebene / Identität auf Aminosäureebene)							
	5-UTR	Repli- kase	TGB1	TGB2	TGB3	CP	12K	3'-UTR
PVM-1	96	93/96	93/95	93/95	92/90	94/98	97/95	98
PVM-2	96	94/96	94/97	92/94	94/92	95/98	96/94	98
PVM-3	96	93/96	94/95	93/96	92/90	94/98	96/94	98
PVM-4	93	94/95	97/97	97/96	95/95	98/98	97/94	99
PVM-5						97/98	98/97	100
PVM-6							98/97	100
PVM-7						97/98	97/94	100
PVM-8				70/78	63/63	76/88		
PVM-9					94/95			
HpLV	72	58/55	62/66	52/53	52/44	61/63	56/56	81
AcoLV	67	57/53	61/59	58/57	51/41	65/69	55/51	77
DVS	48	51/44	52/51	53/50	37/52	53/48	50/49	72
PopMV-1	35	50/45	50/40	49/44	40/27	46/31	43/32	76
PopMV-2	38	51/45	51/47	50/45	38/21	47/38	43/33	67
LiSV	55	49/41	56/51	55/58	39/23	52/46	54/44	69
BIScV	52	49/43	54/51	54/55	42/32	53/44	50/43	80
SPCFV	39	47/37	50/39	43/36	41/23	42/33	37/17	58
VeLV			56/52	55/50				
KLV-1			52/50	54/52	40/30	52/46		
KLV-2			51/48	52/48	41/32	50/45		
PVS			58/55	58/54	50/33	52/44		
NCLV-1				59/62	50/42	67/71	64/65	89
NCLV-2				57/59	52/40	67/72	63/65	90

Angaben anhand der Daten des Programms ClustalX (Identitätsmatrix). Die Zuordnungen der Viren können aus der Tabelle 23 entnommen werden.

Erwartungsgemäß weisen die verschiedenen PVM Sequenzen untereinander die höchsten Ähnlichkeiten auf, so dass sie auch bei den Stammbäumen der einzelnen

ORFs (siehe Abb. 35 bis Abb. 40 im Anhang) immer als Gruppe auftraten, und sich deutlich von den übrigen Carlaviren abgrenzten. Innerhalb der PVM Gruppe wies der PVM-VLK oftmals die höchsten Übereinstimmungen mit der Sequenz PVM-4 (NC_001361) auf. Diese beiden Sequenzen wurden nachfolgend noch einmal separat paarweise miteinander verglichen. Die Identitäten zwischen diesen beiden Sequenzen betrug 94%. Das FLAG Alignment (Abb. 33) verdeutlichte die hohe Sequenzidentität und markierte die Bereiche mit den größten Unterschieden zueinander.

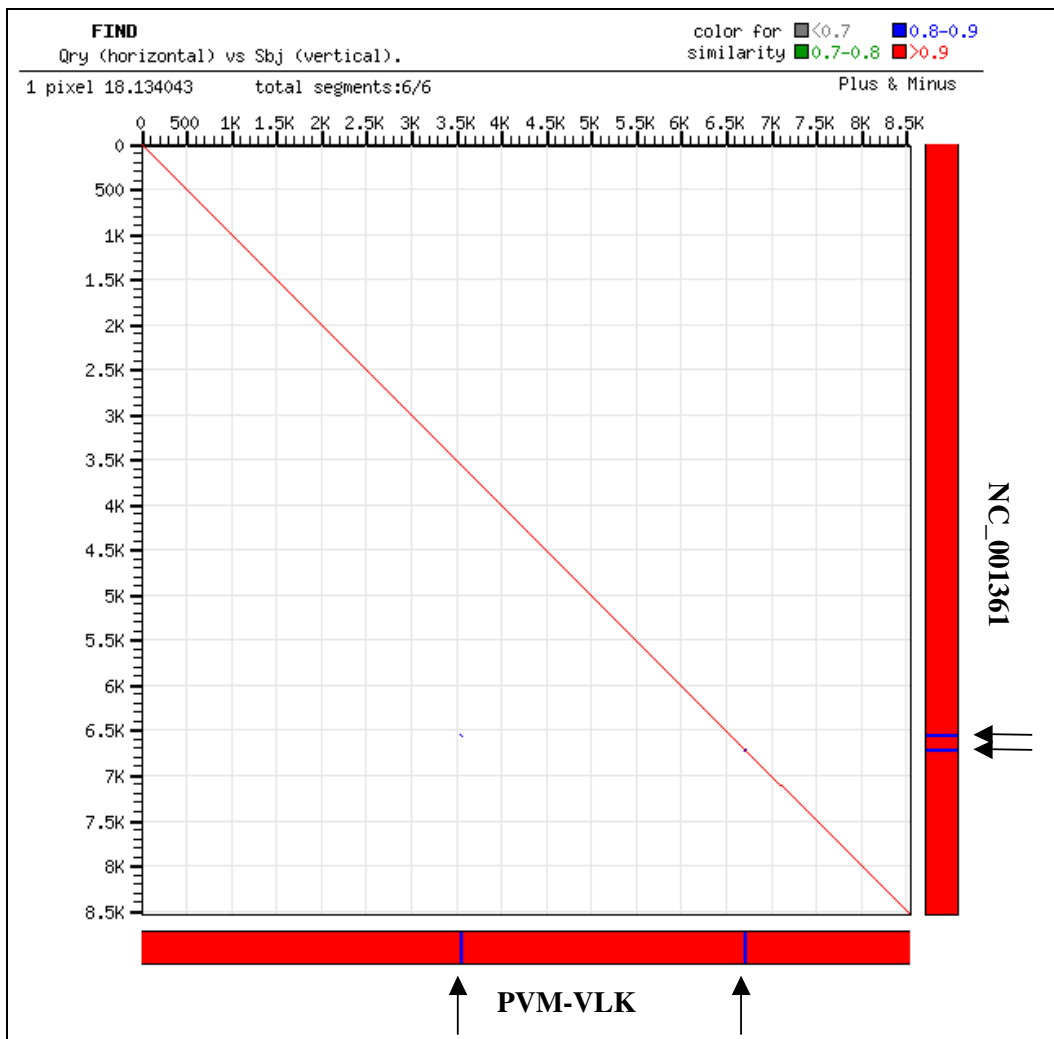


Abb. 33: Paarweises FLAG Alignment der vollständigen Nukleinsäuresequenzen des PVM-VLKs und der Vergleichssequenz (NC_001361).

Die Darstellung erfolgte durch das Internetanalyseprogramm Pairwise FLAG Version 0,3 des ITRI Biomedical Center, Taiwan unter Standardeinstellungen. Die Pfeile markieren kleine Bereiche, bei denen die Sequenzähnlichkeiten zwischen 80-90% lagen, während bei den übrigen Genombereichen die Sequenzähnlichkeit bei über 90% lag.

4. Diskussion

4.1. Untersuchungen zur Abundanz und Variabilität der verschiedenen Viren während der Freisetzungen 2001-2004

Um einen Überblick zu bekommen, in welchem Umfang die für die Freisetzungen verwendeten Kartoffelknollen bereits vor Auspflanzung mit den fünf verschiedenen Kartoffelviren belastet waren, wurden jährlich stichprobenhaft sowohl von den verschiedenen transgenen Varianten als auch von der nicht-transgenen Vergleichsvariante Désirée WT1 Miniknollen getestet. Allerdings unterschieden sich die Mengen an zu untersuchenden Knollen in jedem Untersuchungsjahr. Während die zur Verfügung stehende Anzahl solcher Knollen für die Freisetzung 2002 jeweils 100 Knollen betrug, standen für das Jahr 2003 lediglich 25 und für die Freisetzung 2004 immer 50 Knollen dieser Varianten zur Verfügung. Von solchen Miniknollen ist bekannt, dass deren Keimruhe wesentlich stärker ausgeprägt ist, als es bei normal großen Knollen der Fall ist (Leclerc *et al.*, 1995). Diese starke Keimruhe mag dazu beigetragen haben, dass jedes Jahr trotz Gibberellinsäurebehandlung aus weiteren unbekanntem Gründen nicht alle Augenstecklinge zum Keimen gebracht werden konnten, so dass sich dadurch die Anzahl an testbaren Knollen nochmals reduzierte. Dieser Effekt machte sich ganz besonders bei den Knollen der Freisetzung 2003 bemerkbar, denn der Anteil an nicht gekeimten Augenstecklingen lag in diesem Untersuchungszeitraum bei 17%. Dementsprechend ergab sich auch im Vergleich zu den übrigen Untersuchungsjahren ein besonders hoher Anteil von 9% an virusinfizierten transgenen Knollen.

Da das Pflanzgut sowohl der sechs transgenen Kartoffelvarianten, als auch der nicht-transgenen Vergleichsvariante Désirée WT 1 (vergleiche Tabelle 21) von Mutterpflanzen abstammte, deren Vermehrungen nach der Gewebekultur in Foliengewächshäusern stattfanden, wurde eine weitestgehende Freiheit von Virusinfektionen vermutet. Bei der amtlichen Pflanzgutzertifizierung liegt die Virustoleranz bei solchen Miniknollen sogar bei 0% (persönliche Mitteilung Frau Dr. Lindner, BBA Braunschweig).

Dieses konnte aber nur bei den Überprüfungen der Knollen für die Freisetzung 2004 beobachtet werden, denn keine der untersuchten Kartoffeln dieser Varianten wies eine Virusinfektion auf. Im Gegensatz dazu wurden bei den beiden früheren Untersuchungsjahren immer einige PVY-infizierte Knollen vorgefunden. Zusätzlich zeichneten sich die Befunde für die Freisetzung 2003 dadurch aus, dass neben den PVY-Infektionen auch gelegentlich PVX-Infektionen festgestellt wurden. Da weder bei der visuellen Bonitur der Kartoffelpflanzen auf dem Freisetzungsgelände, noch im Rahmen der serologischen Nachernteuntersuchungen PVX-Infektionen nachgewiesen werden konnten, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den PVX-infizierten Pflanzen um Ausnahmen handelte.

Die Virusfreiheit der Knollen für die Freisetzung 2004 entspricht den amtlichen Vorgaben und könnte damit zusammenhängen, dass im Gegensatz zu den vorherigen Jahren schon bei der Produktion dieser Knollen virusinfizierte Pflanzen frühzeitig entdeckt und aus der weiteren Vermehrung ausgeschlossen werden konnten.

Darüber hinaus standen für die Freisetzen 2003 und 2004 jeweils 40 Knollen von den übrigen konventionell vermehrten Sorten (Désirée, Agria, Granola, Linda und Solara) zur serologischen Überprüfung zur Verfügung. Im Gegensatz zu den sechs transgenen und der nicht-transgenen Vergleichsvariante wurde das Pflanzgut dieser Vergleichssorten über den Handel für die Freisetzen bezogen. Aufgrund der herkömmlichen Produktionsweise dieser Knollen durch den Freilandanbau in sogenannten „Gesundlagen“ konnte nicht von einer Virusfreiheit ausgegangen werden, da amtlich anerkanntes zertifiziertes Pflanzgut maximal 8% schweres (PVY, PVM, PVA und PLRV) bzw. für 1% schweres auch 4% leichtes Virus (PVX, PVS max. 32%) beinhalten darf. Diese Werte werden nur in Ausnahmefällen, wie es 1992 der Fall war, durch ein Gremium der Leiter der Saat- und Pflanzgutankennungsstellen der Länder erhöht (persönliche Mitteilung Frau Dr. Lindner, BBA Braunschweig).

In beiden Untersuchungsjahren (2003 und 2004) wurden nur bei der Sorte Solara keine virusinfizierten Knollen gefunden. Diese Sorte gilt als sehr resistent gegenüber verschiedenen Viren, besonders gegenüber dem PVY. Deshalb wird ihre PVY-Anfälligkeit in der Beschreibenden Sortenliste (2002) des BSA als „sehr gering“ eingestuft (siehe 5.1). Bei den übrigen konventionell produzierten Kartoffeln wurden

4. Diskussion

Schwankungen bezüglich des Virusbefalls während der beiden Untersuchungsjahre festgestellt, die in den normalen Produktionsbedingungen von Pflanzkartoffeln begründet liegen dürften. Als Extremfall wurde bei den Untersuchungen für die Freisetzung 2003 nur bei der Sorte Agria ein PVY-Befallswert von ca. 21% ermittelt, der deutlich über dem Grenzwert (8% schweres Virus) für zertifiziertes Pflanzgut lag.

4.1.1. Vergleich zwischen den erwarteten und den vorgefundenen PVY-Befallshäufigkeiten in den Freisetzungen

Ein Vergleich der Daten zwischen den erwarteten und den bei der Bonitur tatsächlich vorgefundenen Anzahlen virusinfizierter Pflanzen konnten nur bei den Freisetzungen 2003 und 2004 durchgeführt werden. Für die Freisetzung 2001 wurden keine Pflanzkartoffeln im Vorfeld untersucht und im Jahre 2002 lagen zwar solche Untersuchungsdaten vor, jedoch konnten die Versuchspflanzen aufgrund der Zerstörung der Freisetzung (17.6.2002) nicht mehr auf Virusinfektionen hin bonitiert werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Freisetzung 2003 deckten sich die Befallsdaten der Knollenvortestungen für die Freisetzung 2004 gut mit den auf der Freisetzungsfäche ermittelten Boniturdaten der transgenen Varianten, ihrer nicht transformierten Vergleichslinie (Désirée WT 1) und den konventionellen Varianten Linda, Agria und Solara (vergleiche Abb. 16). Nur bei den beiden übrigen Varianten (Désirée WT 2 und Granola) wurden bei der visuellen Bonitur deutlich weniger infizierte Kartoffelpflanzen als erwartet vorgefunden.

Bei der Gegenüberstellung der erwarteten und vorgefundenen Befallswerte der Freisetzung 2003 stellte sich heraus, dass bei fast allen Varianten ein deutlich geringerer als erwarteter Anteil an virusinfizierten Kartoffelpflanzen auf der Freisetzungsfäche vorgefunden wurde. Nur bei den Varianten Désirée SST#36, Désirée SST#20 und Solara stimmte der auf dem Freisetzungsgelände vorgefundene Befall mit dem durch die Knollenvortestungen erwarteten Befallswert relativ gut überein.

Als Hauptursache für die Diskrepanzen zwischen den erwarteten und vorgefallenen Befallsdaten bei den transgenen und der nicht-transgenen Vergleichsvariante (Désirée

WT1) könnten die sehr geringen Probenumfänge dieser Kartoffellinien während der Knollenvortestung für die Freisetzung 2003 beigetragen haben. Neben den ohnehin schon geringen Stichproben von jeweils 25 Knollen pro Variante verringerten sich die Umfänge zusätzlich durch die besonders hohe Rate an nicht gekeimten Knollen. Dieses hatte zur Folge, dass schon wenige infizierte Pflanzen bei den geringen Mengen ausreichten, um den erwarteten Anteil an infizierten Pflanzen in besonderer Weise zu erhöhen.

Bei den nicht-transgenen Vergleichsvarianten konnte nur bei der Sorte Solara eine Übereinstimmung aufgrund ihrer sehr geringen Anfälligkeit gegenüber dem PVY zwischen den erwarteten und vorgefundenen Befallshäufigkeiten ermittelt werden. Obwohl bei der Knollenvortestung die Probenumfänge bei den konventionell erzeugten Sorten deutlich höher lag (40 Knollen) als bei den übrigen Varianten (25 Knollen), überstiegen auch hier die Mengen an erwarteten virusinfizierten Pflanzen deutlich diejenigen, die im Rahmen der visuellen Bonitur ermittelt werden konnten. Es ist vorstellbar, dass die Stichprobe trotz des höheren Probenumfangs von 40 Pflanzen je Variante immer noch zu gering ausfiel, um eine genauere Prognose der Virusinfektionen zu ermöglichen.

Primärinfektionen können im Feld aufgrund ihrer schwachen Symptomausprägungen oder ihres latenten Befalls oft nicht erkannt werden (Salaman, 1970). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der Witterungsverhältnisse während der Freisetzung 2003 (ein extrem heißer und trockener Sommer) viele virusinfizierte Kartoffelpflanzen nur sehr schwache Blattsymptome ausgebildet haben könnten, so dass diese Pflanzen bei der Durchführung der visuellen Bonitur als nicht virusinfiziert erkannt und eingestuft wurden. Durch die Witterungsverhältnisse lässt sich ebenso erklären, dass in den 11 Blattproben von Pflanzen der Freisetzung 2001, deren Blätter zum Zeitpunkt der Durchführung der visuellen Bonitur eine deutliche Einrollerscheinung aufwiesen, keine PLRV-Infektionen nachgewiesen werden konnten. Bei diesen Blattsymptomen handelte es sich offenbar um andere physiologische Erscheinungen wie z.B. Hitzeeinwirkung oder Trockenheit, die zur Ausprägung dieser Symptome führten.

4.1.2. PVY als prädominantes Virus bei den serologischen Nacherntetestungen

Im Laufe einer Vegetationsperiode können Pflanzenviren im Bestand von Blattläusen von bereits infizierten Kartoffelpflanzen auf andere Pflanzen übertragen und so im Bestand verbreitet werden. Durch eine systemische Ausbreitung der Viren innerhalb der Pflanze gelangen diese schließlich auch in die neu gebildeten Knollen. Durch die Untersuchung einer Stichprobe solcher Kartoffelknollen können Rückschlüsse auf die während der Kulturdauer aufgetretenen Pflanzenviren gezogen werden. Außerdem lassen sich so Unterschiede in den Befallshäufigkeiten der verschiedenen Kartoffelvarianten herausfinden.

Um im Pflanzenmaterial die unterschiedlichen Kartoffelviren nachzuweisen, sind in den letzten Jahren eine Reihe von verschiedenen Methoden entwickelt worden. Neben den von Bystricka *et al.* (2005) oder Boonham *et al.* (2003) entwickelten Microarrays, bieten auch verschiedene Multiplex-RT-PCR-Verfahren (Nie und Singh, 2000; 2001) die Möglichkeit, in einer Probe gleichzeitig mehrere Kartoffelviren festzustellen. Des Weiteren lassen sich die Kartoffelviren auch anhand eines Testpflanzenspektrums, wie bei von Verhoeven und Roenhorst (2003) beschrieben, nachweisen.

Jedoch schienen diese Methoden nicht für die in der vorliegenden Arbeit jährlich zu untersuchenden großen Mengen an Pflanzen (1200 Pflanzen pro Jahr) praktikabel genug zu sein. Deshalb wurden jeweils 25 Augenstecklinge aus zufällig von der Freisetzungsfläche geernteten Knollen pro Variante und Block mittels DAS-ELISA oder TPIA auf Vorhandensein der Viren PVM, PVY, PVS, PVX und PLRV untersucht. Ein Vergleich zwischen diesen beiden serologischen Untersuchungsmethoden, bei dem parallel insgesamt 40 zufällig ausgewählte Pflanzen der Sekundärinfektionstestung 2003 untersucht wurden, erbrachte dieselben Ergebnisse, so dass bei den Sekundärinfektionstestungen 2003 und 2004 fast ausschließlich der TPIA verwendet wurde. Dieser Ansatz erlaubt es in relativ kurzer Zeit große Mengen an Kartoffelpflanzen auf Infektionen mit den verschiedenen Kartoffelviren hin zu überprüfen.

Wie bereits bei den Knollenvortestungen und den visuellen Bonituren der Kartoffelpflanzen auf dem Freisetzungsgelände, wurde auch bei allen Nachernteuntersuchungen stets das PVY am häufigsten vorgefunden.

Dabei bewegte sich der Anteil PVY-infizierter Pflanzen, die aus geernteten Knollen der Freisetzungsfeldfläche hervorgegangen waren, in den einzelnen Jahren in einer Größenordnung zwischen 37% und 67%. Zudem handelte sich zum größten Teil um PVY Einfachinfektionen. Alle übrigen Viren (PVM, PVS, PVX oder PLRV) wurden demgegenüber nur sehr vereinzelt nachgewiesen.

Das PVY nahm nicht nur bei den hier vorliegenden Untersuchungen eine Spitzenposition ein, sondern gilt generell in Deutschland und Europa als das am häufigsten vorkommende Virus im Kartoffelanbau. Beispielsweise konnte dieses Virus im Rahmen der amtlichen Beschaffenheitsprüfung von Pflanzkartoffeln auf Viruskrankheiten in Mecklenburg - Vorpommern ohne Berücksichtigung des PVS in den Jahren 2000 - 2004 immer mit weitem Abstand als das am häufigsten festgestellte Virus identifiziert werden. Innerhalb der amtlichen Untersuchungen wiesen ca. 84-98% der virusinfizierten Kartoffeln eine PVY Infektion auf. Auch Kerlan *et al.* (1999) konnten in insgesamt 407 Blattproben PVY-infizierter Kartoffeln, die sie in Frankreich gesammelt hatten, lediglich bei 75 Proben (ca. 18%) neben dem PVY entweder das PVX oder das PLRV als Koinfektion feststellen, während bei allen übrigen Proben eine PVY Einfachinfektion nachweisbar war.

Wie bereits zwischen den Daten der Knollenvortestungen und denen der visuellen Bonituren während den verschiedenen Freisetzungen konnten ebenfalls kaum Übereinstimmungen zwischen den Daten der visuellen Feldbonituren und denen der serologischen Nachernteuntersuchungen vorgefunden werden. Auch hier stimmten lediglich die Werte für die Sorte Solara relativ gut überein, da sich diese Kartoffelsorte durch eine sehr geringe Anfälligkeit gegenüber dem PVY auszeichnet (Beschreibende Sortenliste des BSA) und deshalb auch kaum Virusinfektionen aufwies.

Ursache für die mangelnde Korrelation der Befallswerte für die übrigen Varianten dürften einerseits die Schwierigkeiten bei der visuellen Bonitur der Pflanzen auf der Freisetzungsfeldfläche gewesen sein. Zu diesen zählen, wie bereits oben beschrieben,

4. Diskussion

extreme Witterungsverhältnisse bzw. schwache Symptomausprägungen virusinfizierter Kartoffelpflanzen. Einen weiteren Einfluss könnten die auf der Freisetzungsfäche vorhandenen Blattläuse gehabt haben.

In Kartoffelbeständen kommen ab Ende April verschiedene Blattlausarten vor, wie beispielsweise *Mycus persicae*, *Aphis nasturtii*, *Aphis frangulae*, *Macrosiphon euphorbiae* und *Aulacortum solani* (Dubnik, 1991), von denen bekannt ist, dass durch diese das PVY in einer nicht-persistenten Weise von infizierten auf weitere Pflanzen übertragen werden kann. Von der Blattlaus *Mycus persicae* ist bekannt, dass sie je nach Witterung während eines im Mai stattfindenden „Frühjahrsfluges“ Kartoffelfelder aufsucht und sich ab Mitte Juli wiederum geflügelte Blattläuse entwickeln, die während eines „Sommerfluges“ verstärkt neue Kartoffelbestände aufsuchen (Lampel, 1968; Dubnik, 1991 und Hoffmann *et al.*, 1994). Da die visuellen Bonituren der Kartoffeln auf dem Freisetzungsgelände nach den Frühjahrsflügen durchgeführt wurden, ist es durchaus vorstellbar, dass eine vektorielle Übertragung des PVY zwar schon stattgefunden hatte, die Pflanzen jedoch noch keine erkennbaren Blattsymptome aufwiesen, so dass sie als gesund eingestuft wurden. Ebenso kann die vektorielle Übertragung des PVY auch zu einem späteren Zeitpunkt wie dem Sommerflug stattgefunden haben, so dass die Pflanzen während des Zeitpunktes der Bonitur tatsächlich noch nicht virusinfiziert waren. Denn Blattproben von Pflanzen, die als „gesund“ eingestuft worden waren, konnten bei der sich anschließenden serologischen Untersuchung als nicht-virusinfiziert bestätigt werden.

Durch die Übertragung des PVY durch Blattläuse im Bestand wurden nicht nur eine große Anzahl von Pflanzen, sondern darüber hinaus auch die sich an diesen Pflanzen neu bildenden Knollen infiziert (Sekundärinfektion). Die hohen Anteile an PVY infizierten Knollen der Freisetzungen dürften auch mit den versuchsbedingt sehr späten und verminderten Blattlausbekämpfungsmaßnahmen in Zusammenhang stehen. Im Interesse der Datenerhebungen anderer Arbeitsgruppen wurden die Insektizidbehandlungen nicht in den Umfängen durchgeführt, wie es im Kartoffelanbau sonst üblich gewesen wäre (persönliche Mitteilung Dr. B. Hommel, BBA-Kleinmachnow). Wurden während der Freisetzung 2001 noch zwei Insektizidanwendungen durchgeführt, waren es in den Jahren 2002 und 2003 lediglich

eine und bei der Freisetzung 2004 wurde ganz darauf verzichtet (siehe Tabelle 24). Im normalen Speisekartoffelanbau finden ungefähr zwei bis drei Insektizidbehandlungen pro Saison statt (persönliche Mitteilung Dr. B. Hommel, BBA Kleinmachnow), die sich nach dem jeweiligen lokalen Vorkommen der verschiedenen Blattlausarten in den Beständen und nach den Hinweisen und Empfehlungen des amtlichen Pflanzenschutzdienstes richten. Für die Produktion von Pflanzkartoffeln wird sogar eine generelle Blattlausfreiheit der Bestände angestrebt. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise für das Jahr 2004 eine lückenlose Blattlausbekämpfung bis zum Reihenschluss mit Ripcord 10 empfohlen, und anschließend eine 10-14 tägige Bekämpfung mit Tameron oder Plenum (und Ripcord 10) (<http://www.rhg-hannover.de/scripts.de> im August 2005).

Parallel zu den Freisetzungsversuchen wurden in nur einigen 100 Metern Entfernung in südlicher Richtung auf demselben Versuchsgelände in Dahnsdorf die amtlichen Virusresistenzprüfungen neuer Kartoffelsorten durchgeführt. Dazu wurden im Rahmen dieser Untersuchungen neben den zu testenden Knollen der neuen Kartoffelsorten auch virusinfizierte Knollen als Infektionsquelle ausgepflanzt, und darüber hinaus keine Blattlausbekämpfungsmaßnahmen durchgeführt (persönliche Mitteilung Dr. B. Hommel). Deshalb können diese Kartoffelpflanzen als Quelle von virusübertragenden Blattläusen angesehen werden. Einige Aphiden könnten trotz vorherrschender Winde aus westlicher und südwestlicher Richtung (siehe Anhang Tabelle 49) von dieser Versuchsanlage auf die Pflanzen der Freisetzung gelangt sein und so zusätzlich Viren in den Bestand eingebracht und verbreitet haben.

Besonders während der Auflaufphase der Kartoffeln sind für Blattläuse gerade die Bodenoberfläche durchstoßenden Kartoffelpflänzchen sehr attraktiv, und PVY Infektionen junger Kartoffelpflanzen können sich besonders stark auf die Anzahl virusinfizierter Tochterknollen auswirken. Aufgrund dessen sollten in dieser Phase möglichst keine Blattläuse in den Bestand gelangen. In diesem Zusammenhang konnte Hunius (1971) zeigen, dass ca. 90% aller Tochterknollen einer Kartoffelpflanze PVY Infektionen aufwiesen, wenn die Mutterpflanze vor Beginn des Knollenansatzes mit dem Virus infiziert wurde. Dieser Anteil sank auf 45%, wenn die Mutterpflanzen vor Blühbeginn infiziert wurden. Erfolgte die Infektion der Mutterpflanze erst nach

4. Diskussion

Ausbildung der Blüte, betrug der Anteil an virusinfizierten Tochterknollen nur noch 2%.

Mit Ausnahme der Sorte Agria konnte bei den Knollen aller übrigen Sorten der Freisetzung 2004 im Vergleich zu den vorherigen Freisetzungen ein deutlich erhöhter Anteil an PVY-infizierter Knollen festgestellt werden. Neben einer fehlenden Insektizidbehandlung lässt sich diese Steigerung auch dadurch erklären, dass im Jahre 2004 keine Krautabtötung durchgeführt wurde (vgl. Tabelle 24), so dass dadurch verstärkt die Viren von den oberirdischen Pflanzenteilen in die Knollen gelangen konnten. Im konventionellen Kartoffelanbau dient die Krautabtötung an so genannten und amtlich bekanntgegebenen „Tottagen“ nicht nur dazu, die „Ableitung von Primärfektionen vom Kraut in die Knollen“ zu verhindern (Keller *et al.*, 1999 und Kürzinger, 1997), sondern auch um die Reife und Qualität der Tochterknollen zu erhöhen.

Für die statistischen Auswertungen der PVY-Befallswerte wurde die nicht-transformierte Variante Désirée WT1 als Vergleichsvariante gewählt.

Da im Vorfeld nicht davon ausgegangen werden konnte, dass sich die transgenen Varianten in Bezug auf die PVY-Befallshäufigkeiten von denen der nicht-transgenen Kartoffelvarianten unterscheiden, wurden diesbezüglich Äquivalenzhypothesen formuliert. Im Vergleich zu der nicht-transformierten Variante Désirée WT 1 fiel von allen transgenen Varianten nur die Linie Désirée SST#18 dadurch auf, indem diese bei zwei Nacherntetestungen statistisch feststellbare Unterschiede im PVY Befall aufwies. Diese kamen durch einen geringeren Virusbefall dieser Linie zustande. Es konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, worauf dieser Befallsunterschied zurückzuführen war. Beispielsweise wäre es denkbar, dass die Pflanzen dieser Linie eine geringere Attraktivität auf Blattläuse ausübten, und so weniger häufig mit PVY infiziert wurden. Weiterhin könnte es auch aber auch sein, dass die systemische Ausbreitungsgeschwindigkeit der Viren in den Pflanzen aufgrund des veränderten Kohlenhydratmetabolismus verlangsamt wurde, und so möglicherweise weniger neu gebildete Knollen mit dem Virus infiziert wurden.

Im Gegensatz dazu wiesen mehrere nicht-transgene konventionell erzeugte Kartoffelvarianten im Vergleich zur Kontrollvariante Désirée WT 1, über die Jahre hinweg Unterschiede in den PVY-Befallsstärken auf. Hier ist besonders die Sorte Solara zu nennen. Die Anfälligkeit dieser Sorte gegenüber PVY Infektionen wird in der Beschreibenden Sortenliste (BSA, 2002, siehe 5.1 (Anhang)) als „sehr gering“ eingestuft, was durch die serologischen Nachernteuntersuchungen innerhalb der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Auch die erhöhte Anfälligkeit der Sorte Linda, die amtlich als „stark bis sehr stark“ eingestuft wurde, konnte in den Nacherntetestungen 2001 und 2003 bestätigt werden.

4.1.3. Molekulare Untersuchungen und Sequenzanalysen von PVY-hüllproteingehaltenden Fragmenten

RFLP-Untersuchungen wurden in früheren Arbeiten dazu verwendet, um beispielsweise PVY Isolate bestimmten Virusstämmen zuordnen zu können (Blanco-Urgoiti *et al.* 1996), oder die Genomstrukturen von rekombinanten Stämmen (PVY^{NTN} und PVY^{N-W}) mit denen anderer PVY-Isolate (PVY^N und PVY^O) zu vergleichen (Glais *et al.*, 1996; 1998; 2002). Ebenso wurde diese Methode auch für andere Viren benutzt, etwa von Jonczyk *et al.* (2004), um die Variabilität verschiedener Isolate des *Tomato black ring virus* (Genus *Nepovirus*) aufzuklären. Der in dieser Arbeit verwendete RFLP-Ansatz bot die Möglichkeit, einerseits die Stammzugehörigkeiten der in den Pflanzen vorgefundenen PVY-Isolate schnell bestimmen zu können, andererseits aber auch aus der großen Anzahl von PVY hüllproteingehaltenden Fragmenten interessante Proben herauszufiltern. Dazu wurden für die RFLP-Untersuchungen nach der Sequenzierung der beiden Kontrollisolate (PVY^{NTN} und PVY^O) in Anlehnung an die Arbeiten von Glais *et al.* (1998, 2002) spezielle Restriktionsendonukleasen ausgewählt, die es gestatteten, die Proben aufgrund der entstehenden Fragmentmuster durch Vergleich mit denen der Kontrollen eindeutig den Stämmen PVY^{NTN} oder dem PVY^O zuzuordnen.

Wie die Untersuchung zum Strukturaufbau des PVY^{N-W} Genoms zeigte (Glais *et al.* 2002), zeichnen sich die Isolate des rekombinanten PVY-Stammes PVY^{N-W} durch

4. Diskussion

homologe Sequenzen im Bereich des Hüllproteingens zu PVY^O aus. Schon lange war bekannt, dass PVY^N-W zwar einerseits wie andere Isolate des PVY^N Nekrosen an Tabakpflanzen hervorruft andererseits sich jedoch serologisch wie PVY^O verhält (Chrzanowska, 1991; 1994). Des Weiteren wird häufiger darüber berichtet, dass sich dieser rekombinante Stamm verstärkt in den letzten Jahren in Europa ausbreitet, und zum Teil auch bei einigen Kartoffelpflanzen kaum sichtbare Symptome ausbildet (Chrzanowska, 1991; 1994; 1998; Glais *et al.*, 2005; Kerlan, 1999; Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998a). Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei einem unbekanntem Anteil von Proben, die in dieser Arbeit als PVY^O eingestuft worden sind, um Isolate des PVY^N-W Stammes gehandelt haben könnte, da die RFLP-Untersuchungen dieses Genomabschnittes keine konkreteren Unterscheidungen zuließ. Um eine eindeutigere Aussage darüber treffen zu können, inwieweit es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten tatsächlich um Proben des PVY^O Stammes gehandelt hat, müssten diese Proben in einem Bioassay genauer untersucht werden. Aufgrund der bekannten biologischen Eigenschaften, würde ein Isolat des PVY^O an *N. tabacum* Mosaiksymptome hervorrufen, während Vertreter der Gruppe des PVY^N-W Stammes sich durch die Ausbildung von Adernekrosen auszeichnen würden (Glais *et al.*, 2005). Nicht nur durch die Testpflanzendiagnose hätte der Anteil an PVY^N-W Proben an den als PVY^O Stamm zugeordneten Proben festgestellt werden können, sondern auch durch die erst kürzlich von Glais *et al.* (2005) entwickelte RT-PCR-Methode, mit der anhand eines ca. 4 kbp langen Amplifikates spezifisch PVY^N-W Isolate bestimmt werden können.

Aufgrund der RFLP Untersuchungen wurden sortenspezifische Unterschiede bezüglich der Anfälligkeiten der Kartoffeln mit den verschiedenen PVY Stämmen deutlich. Während Proben der transgenen Linien genau wie ihre nicht-transformierte Vergleichsvariante (Désirée WT 1), der konventionell hergestellten Sorte Désirée, sowie der Sorte Linda sowohl von PVY^{NTN}, als auch von PVY^O infiziert worden waren, konnten bei der Sorte Granola fast ausschließlich nur PVY^{NTN} und bei der Sorte Agria fast immer der O-Stamm des PVY festgestellt werden. Die Anfälligkeit der Sorte Agria für das PVY^O und die der Sorte Granola für den an Tabak Nekrosen hervorrufenden N-Stamm des PVY konnte auch von Lindner *et al.* (2004) mit Hilfe monoklonaler

Antikörper, die gegen das PVY^O bzw. das PVY^N gerichtet waren, im Rahmen ihrer Untersuchungen zum Vorkommen von PVY-Stämmen und -Stammgruppen in Deutschland in Abhängigkeit von der Kartoffelsorte und der Anbauregion bestätigt werden.

Von wenigen Ausnahmen abgesehen wurde sowohl bei den transgenen als auch bei den nicht-transgenen Varianten der Sorte Désirée ein jährlich höherer Anteil an PVY^{NTN}- als PVY^O-infizierter Knollen festgestellt. Vereinzelt bildeten die transgenen Linien z.B. Désirée SST#18 (2003), SST#20 (2001) und SST/FFT#22/30 (2002) Ausnahmen, indem bei ihnen die Anteile an PVY^O infizierten Knollen in den einzelnen Jahren deutlich über denen der PVY^{NTN} infizierten Knollen lagen. Abgesehen von diesen jährlichen Schwankungen, konnte jedoch bei keiner der transgenen Linien eine Auffälligkeit in Bezug auf die Stammverteilungen der PVY-Isolate festgestellt werden.

Die erhöhte Anfälligkeit der Sorte Désirée gegenüber dem PVY^{NTN} lässt sich durch den Besitz des Resistenzgens N_{yibr} dieser Kartoffelsorte erklären. Dieses Resistenzgen löst bei den Pflanzen dieser Sorte bei Infektion mit dem PVY^O Stamm hypersensitive Reaktionen (Jones, 1990) oder Lokalläsionen (Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998b) aus. Trotz des Besitzes dieses Resistenzgens konnten bei den verschiedenen Varianten der Sorte Désirée PVY Infektionen nachgewiesen werden, die, aufgrund der RFLP Untersuchungen des hüllproteingehaltenden Genomabschnittes, als Isolate des Stammes PVY^O eingestuft werden mussten.

Wahrscheinlicher ist jedoch, dass ein Großteil dieser Isolate dem rekombinanten Stamm PVY^N-W zugeordnet werden muss. Denn die Blättern dieser Kartoffelpflanzen wiesen Mosaiksymptome auf, während die in der Literatur beschriebenen Lokalläsionen oder die starke hypersensitive Reaktion in Form von einer an der Spitze beginnenden Nekroseerscheinung (Jones, 1990; Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998a,b) als typische Symptome der Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée beschrieben werden, die eine PVY^O Infektion aufweisen.

Bei den im Rahmen der Sekundärinfektionstestungen untersuchten Knollen konnten keine typischen Ringnekrosen beobachtet werden, die in Zusammenhang mit dem Auftreten des PVY^{NTN} stehen. Zwar konnten Le Romancer und Nedellec (1997)

4. Diskussion

Ringnekrosen an Knollen der Sorte Désirée bei ihren Untersuchungen feststellen. Auch im Rahmen der amtlichen Pflanzgutankennung konnten schon häufiger auf Knollen der Sorten Linda, Granola und Désirée die für einen PVY^{NTN} Befall typischen Ringnekrosen festgestellt werden. Dabei waren diese Symptome bei der Sorte Linda besonders stark ausgeprägt, während sie auf Knollen der Sorte Désirée in einem sehr viel geringeren Ausmaß und in einer deutlich schwächeren Ausprägung auftraten (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Zahn, Pflanzenschutzamt Hannover). Das Ausbleiben der typischen Symptomausprägungen kann aber mit den Untersuchungen von Boonham *et al.* (2002) in Einklang gebracht werden, die verschiedene in England vorkommende PVY Isolate untersuchten. Sie stellten dabei fest, dass in England sehr häufig PVY^{NTN} Isolate vorzufinden waren, deren Hüllproteingensequenzen zwar einen für europäische PVY^{NTN} Isolate typischen Sequenzwechsel zwischen PVY^N und PVY^O aufwiesen (siehe Abb. 3), jedoch ebenfalls nicht immer Ringnekrosen an den Knollen hervorriefen. Weiterhin berichten Le Romancer und Nedellec (1997), dass die Symptomausprägungen an den Knollen von verschiedenen Faktoren wie der Kartoffelsorte, der Witterung, weiteren Umwelteinflüssen und den Lagerungsbedingungen der Knollen abhängen. Der Anteil an Knollen, die typische Symptome aufwiesen, nahm nämlich in ihren Studien bei niedrigeren Lagertemperaturen deutlich ab. In der vorliegenden Arbeit verging nur eine kurze Zeitspanne zwischen der Knollenernte und der Keimruhebrechung durch die Gibberellinsäurebehandlung und die zwischenzeitliche Lagerung der geernteten Knollen fand bei lediglich 4°C statt. Unabhängig von der Ausprägung typischer PVY^{NTN} Ringnekrosen, konnten durch die Untersuchungen von weiteren PVY infizierter Kartoffelproben, die nicht von der Freisetzungsfäche sondern aus verschiedenen Pflanzkartoffelanbauregionen der Bundesrepublik Deutschland stammten, bestätigen, dass der PVY^{NTN} Stamm nicht nur auf der Freisetzungsfäche stark vertreten war, sondern auch in den verschiedenen Pflanzkartoffelanbauregionen Deutschlands vorkam. Abgesehen von drei Proben des Jahres 2004 konnten bei allen Übrigen durch die RFLP-Untersuchungen der hüllproteingehaltenden Fragmente festgestellt werden, dass sie dem PVY^{NTN} Stamm zugeordnet werden müssen. Da die Fragmentmuster keinerlei Unterschiede zu denen der Kontrollen aufzeigten, wurde gefolgert, dass es sich um dieselben oder zumindest sehr ähnliche Isolate handeln muss. Das verstärkte

Vorkommen des PVY^{NTN} in verschiedenen Anbauregionen der Bundesrepublik Deutschland wurde ebenfalls durch Untersuchungen von Lindner *et al.* (2004) verdeutlicht, in denen mehr als 6500 PVY enthaltene Presssaftproben überprüft wurden. Ca. 85% aller serologisch als PVY^N eingestufte Proben konnten aufgrund der sich anschließenden molekularen Untersuchungen des P1 Bereiches (Weidemann und Maiss, 1996) dem PVY^{NTN} zugeordnet werden.

Von den in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Lindner (BBA Braunschweig) gemeinsam untersuchten PVY Proben konnten in insgesamt vier Fällen Unterschiede zwischen den Genombereichen P1 und CP festgestellt werden, so dass eine eindeutige Eingruppierung in eine Stammgruppe nicht möglich war. Aufgrund der RFLP-Untersuchungen der Hüllproteingehaltenden Fragmente konnten die vier Proben in diesem Genombereich eindeutig dem PVY^{NTN} zugeordnet werden. Es bestand zum einen die Möglichkeit, dass in den Proben eine Mischinfektion zwischen dem PVY^N und dem PVY^{NTN} vorlag. Allerdings konnten im Rahmen der durchgeführten RFLP-Untersuchungen bei diesen Proben keine zusätzlichen Fragmente im Vergleich zu den Kontrollen nach den gelelektrophoretischen Auftrennungen der jeweiligen Restriktionsansätze festgestellt werden.

Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, dass es sich bei den unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den P1 und den CP Bereichen der vier Proben um methodisch bedingte Artefakte gehandelt haben könnte. Es ist durchaus vorstellbar, dass bei den Untersuchungen der P1-Bereiche dieser vier Proben die PVY^{NTN} spezifischen Fragmente extrem schwach amplifiziert worden sind, so dass diese Banden eventuell nach der gelelektrophoretischen Auftrennung nicht zu erkennen gewesen sind, und es infolgedessen zu Fehlinterpretationen gekommen sein kann. Ebenso gut könnten Fehleinschätzungen beim Vergleich der Fragmentmuster mit denen der PVY^{NTN} Kontrolle im Rahmen des RFLPs vorgekommen sein, indem eventuelle geringfügige Abweichungen in den Fragmentmustern übersehen worden sind. Es besteht aber auch bei diesen vier Proben die Möglichkeit, dass es sich um rekombinante Viren gehandelt haben könnte, bei denen die Genome in den P1-Bereichen aus PVY^N und in den Abschnitten der Hüllproteingene aus PVY^{NTN} Sequenzen bestanden. Diese Befunde hätten durch eine Wiederholung der Untersuchungen beider Genomabschnitte verifiziert

4. Diskussion

oder verworfen werden können. Doch aus den RNA-Extrakten dieser Proben war es nicht mehr möglich, neue hüllproteingehaltene Fragmente zu amplifizieren, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, inwieweit es sich bei diesen Proben tatsächlich um rekombinante Viren gehandelt hat.

4.1.4. Sequenzierung ausgewählter PVY hüllproteingehaltener Fragmente

Aufgrund der RFLP Untersuchungen der PVY-Fragmente, die das Hüllproteingehalten enthielten und aus Proben die von transgenen als auch von nicht-transgenen Pflanzen stammten, wurden insgesamt 56 solcher Fragmente sequenziert. Die Proben zeichneten sich bei den RFLP-Untersuchungen in einigen Fällen durch von den Kontrollen abweichenden Fragmentmuster aus. Die Sequenzierungen dieser Proben ergab in den meisten Fällen, dass es sich um einzelne Nukleotidaustausche in den Bereichen der verwendeten Restriktionsschnittstellen handelte, so dass hierdurch der enzymatische Verdau dieser Fragmente verhindert wurde und infolgedessen ein verändertes Fragmentmuster zu beobachten war.

Von den insgesamt 56 sequenzierten PVY-Fragmenten konnte nur eine Probe (V6_S02) identifiziert werden, bei der es sich höchstwahrscheinlich um eine Rekombinante zwischen den Sequenzen des europäischen PVY^{NTN}- (Boonham *et al.*, 2002; Glais *et al.*, 1998; Nie und Singh, 2002b) und eines PVY^O- bzw. des PVY^{N-W}- Stammes handelte. Innerhalb dieses untersuchten Fragments wechselte die Sequenz von der PVY^{NTN}- in die PVY^O- Sequenz und später wieder zurück in die PVY^{NTN}- Sequenz. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich um ein RT-PCR-Artefakt handelt, denn trotz des zweifachen Sequenzwechsels wies die resultierende Sequenz kein internes Stop-Codon auf. Ebenso führten die Wechsel nicht zu einer Zerstörung des Lesemusters, was ebenfalls als wichtige Voraussetzung für die Entstehung und die Beständigkeit eines rekombinanten Virus gilt. Darüber hinaus ergab ein Vergleich mit anderen bekannten Sequenzen aus der Datenbank „GenBank“, dass die in dieser Arbeit ermittelte Sequenz mit Ausnahme eines 52 Nukleotide langen Bereichs die höchste Übereinstimmung mit

einer bekannten PVY^{NTN}-Sequenz eines englischen PVY Isolats mit der Accessionbezeichnung AJ390291 besaß.

Die Sequenzanalyse machte deutlich, dass sich von insgesamt 56 sequenzierten Fragmenten nur eines stark von den übrigen abhob. Offenbar tritt dieser Virustyp mit einem Anteil von 1,7% in den durch eine Sequenzanalyse untersuchten Proben nicht sehr häufig auf. Die Häufigkeit verringert sich jedoch noch einmal sehr drastisch, da es sich bei den 56 Sequenzen lediglich bei den meisten um die Fragmente handelte, die aufgrund von Auffälligkeiten im RFLP genauer untersucht wurden. Es liegen keine Informationen vor, inwieweit diese Rekombination tatsächlich in der transgenen Pflanze stattgefunden hat, in deren Blattmaterial dieses rekombinante Virus identifiziert werden konnte. Ebenso gut kann sich dieses Rekombinationsereignis auch in einer anderen Wirtspflanze ereignet haben, und die Fructankartoffel lediglich infolge einer Blattlausübertragung mit diesem Virus infiziert worden sein. Unabhängig davon, inwieweit dieses Rekombinationsereignis in der transgenen Pflanze stattgefunden hat, kann kein ursächlicher Zusammenhang mit dem Auftreten des rekombinanten Virus und den transgenen Fructankartoffeln festgestellt werden. Vielmehr würde ein solcher Effekt bei Pflanzen zu erwarten sein, die aufgrund ihres Transgens einen Selektionsdruck, wie bereits unter Punkt 1.4 beschrieben, auf die am Standort vorhandenen Viruspopulation ausüben würden, etwa wenn es sich um PVY resistente transgene Kartoffeln handelte.

Da solch ein Virus im Rahmen der Untersuchungen nur ein einziges Mal vorgefunden worden ist, muss es eher als seltenes Ereignis betrachtet werden. Für eine Rekombination zwischen zwei verschiedenen PVY Stämmen müssen beide Viren zusammen in einer Pflanze vorkommen und deren Replikation darüber hinaus gleichzeitig in denselben Zellen stattfinden. Durch die RFLP-Untersuchungen konnten nur geringe Anteile an Pflanzen identifiziert werden, bei denen PVY-Viren beider Stämme gleichzeitig in denselben Pflanzen auftraten. Dieses war bei 3,4% aller untersuchten Fragmente der Freisetzung 2003 und bei 3,2% aller durch ein RFLP überprüfter Pflanzen der Freisetzung 2004 der Fall. Darüber hinaus ist aber nicht bekannt, inwieweit beide PVY-Stämme auch tatsächlich in diesen doppelinfizierten Pflanzen in denselben Zellen vorzufinden waren. Die Untersuchungen von Dietrich und Maiss (2003) zeigten, dass sich die Ausbreitungszonen gleicher aber unterschiedlich

4. Diskussion

markierter oder verschiedener Viren des Genus *Potyvirus* im pflanzlichen Gewebe gegenseitig abgrenzten und beide Viren gleichzeitig nur in denselben Zellen innerhalb der schmalen Überlappungszonen vorzufinden waren. Auch Silbernagel *et al.* (2001) konnten in einem artifiziellen System über Jahre hinweg keine rekombinanten Viren in Bohnenpflanzen identifizieren, obwohl diese Mischinfektionen mit den beiden Potyviren BCMNV und BCMV aufwiesen.

4.2. Untersuchungen zur homologen Rekombination zwischen PVX-TGB1 bzw. PVX-TGB2 transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen und die im TGB1 oder TGB2 Deletionen aufweisenden PVX-Mutanten

Unter dem Gesichtspunkt der Biologischen Sicherheit wurde untersucht, inwieweit Rekombinationsereignisse zwischen den transgenen mRNAs von *N. benthamiana* -Pflanzen, die den TGB1 oder TGB2 des PVX exprimierten, und PVX-Mutanten, die im TGB1 oder TGB2 „in frame“ Deletionen aufweisen, zu einer Rekonstitution des vollständigen PVX Genoms führten. Bereits in mehreren Studien konnte das Vorkommen derartiger Ereignisse zwischen veränderten Viren und transgener viraler mRNA gezeigt werden (Adair und Keaney, 2000; Borja *et al.*, 1999; Greene und Allison, 1994; 1996; Schubert *et al.*, 2004 und Vigne *et al.*, 2004).

Sowohl die in dieser Arbeit verwendeten PVX-TGBp1 als auch die PVX-TGBp2 transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen (Linien 1/23 und 118) erwiesen sich nach Inokulation mit den PVX-Volllängklonen (pPVX0014 bzw. pPVX-DsRed) als nicht resistent gegenüber einer PVX Infektion. Genauso wie die nicht-transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen bildeten auch die Pflanzen der beiden transgenen Linien innerhalb von 14 Tagen nach Inokulation typische Blattsymptome aus. Ebenso konnten systemische PVX Infektionen in diesen Pflanzen nachgewiesen werden.

Ares *et al.* (1998) konnten ebenfalls bei PVX-TGB1 transgenen Tabakpflanzen keine Unterschiede in deren Anfälligkeit gegenüber dem PVX feststellen. Auch PVX-TGB2 exprimierende *N. benthamiana* noch *N. tabacum* -Pflanzen zeigten keine Resistenz gegenüber dem PVX (Seppänen *et al.*, 1997), und auch bei PVX-TGB2 transgenen Kartoffelpflanzen (*S. tuberosum* cv. Pito), die abgesehen von einer Deletion von 9 Nukleotiden den vollständigen ORF des PVX-TGB2 exprimierten, konnten sie keine

Resistenzen gegenüber dem PVX feststellen. Diese konnte aber bei anderen transgenen Kartoffellinien derselben Sorte festgestellt werden, die sich dadurch auszeichneten, dass sie in der Übergangszone zwischen der hydrophoben und hydrophilen Bereich Insertionen von 12 bzw. 18 Nukleotiden aufwiesen. Pflanzen, die diese modifizierten Proteine exprimierten, erwiesen sich sowohl gegenüber PVX, als auch gegenüber einem weiteren Potexvirus (*Potato aucuba mosaic virus*, PAMV) sowie den Carlaviren PVM und PVS als resistent. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits Beck *et al.* (1994) bei transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen feststellen, die ein modifiziertes TGBp2 des WCIMV exprimierten, welches sich durch eine Substitution von sechs Aminosäuren auszeichnete. Diese transgenen Pflanzen stellten sich als resistent sowohl gegenüber dem WCIMV, als auch gegenüber dem PVX, *Narcissus mosaic virus* (NMV) und dem PVS heraus. Im Gegensatz dazu wiesen transgene *N. benthamiana* -Pflanzen, die das nicht modifizierte TGB2 des WCIMV exprimierten, keinerlei Resistenz gegenüber dem WCIMV auf. Andererseits konnten die von Kobayashi *et al.* (2001) erzeugten PVX-TGB2 transgenen *N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN -Pflanzen nach Infektion mit dem PVX eine systemische, hypersensitive Resistenz ausbilden. Im Gegensatz zu nicht-transgenen Vergleichspflanzen, die bei einer PVX Infektion ein mildes Mosaik auf den Blättern ausbildeten, entstanden auf den Blättern der PVX-TGB2 transgener *N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN -Pflanzen Ringflecken und konzentrische Linien, die z. T. auch durch Nekrosen begrenzt waren.

Die in dieser Arbeit verwendeten PVX-TGB1-Deletionsmutanten (PVX1-Del1 und PVX2-Del1) waren nicht in der Lage, nach Inokulation in nicht-transgene *N. benthamiana* -Pflanzen, weder eine nachweisbare lokale noch eine systemische PVX Infektion auszulösen. Während Manske und Schiemann (2005) nahezu den gesamten PVX-TGB1 (ca. 94%) aus ihrem GUS-markierten PVX Vollängenklon entfernt hatten, konnte hier gezeigt werden, dass auch wesentlich kleinere Deletionen (27 und 342 bp) im Bereich des TGB1 ausreichend waren, um eine Ausbreitung dieser deletierten Viren in nicht-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen zu verhindern. Aufgrund von mikroskopischen Untersuchungen konnten Manske und Schiemann (2005) aber feststellen, dass ihre PVX-TGB1-Deletionsmutante zwar weiterhin in der Lage war, sich in den primär inokulierten Zellen zu replizieren, sich jedoch nicht mehr aus diesen in die benachbarten Zellen auszubreiten vermochten. Ähnliche Beobachtungen machten

4. Diskussion

auch Angell *et al.* (1996, 1998) und Verchot *et al.* (1998), denen ebenfalls ein GUS-markierter PVX-Klon zur Verfügung stand. Dieser wies im TGB1-Bereich eine Deletion von 354 bp auf, und auch das von diesem abstammende Virus war aufgrund der fehlenden Sequenz nicht mehr in der Lage, aus primär infizierten Zellen von *N. clevelandii* Blättern in die benachbarten Zellen zu gelangen.

In Anlehnung an diesen Untersuchungen muss davon ausgegangen werden, dass die beiden in dieser Arbeit verwendeten PVX-TGB1-Deletionsmutanten ebenfalls nicht in der Lage waren, aus primär infizierten Zellen in die benachbarten zu gelangen. Gleiches gilt für die in dieser Arbeit verwendeten PVX-TGBp2 Deletionsmutanten. Bereits ein Verlust von 11 Nukleotiden innerhalb der TGB2 Sequenz stellte sich als ausreichend heraus, um ein GUS-markiertes PVX an der interzellulären Ausbreitung zu hindern, ohne aber seine Replikation in der primär infizierten Zelle zu unterbinden (Verchot *et al.*, 1998). Ebenso verhielt sich in *N. tabacum*- und *N. benthamiana* -Pflanzen auch ein GFP-markierter PVX-Klon, dessen TGB2-ORF vollständig entfernt worden war (Verchot *et al.*, 1998; Krishnamurthy *et al.*, 2002). Auch Kobayashi *et al.* (2001) konnten keine Virusausbreitung in nicht-transgenen *N. tabacum* cv. Xanthi -Pflanzen feststellen, die zuvor mit ihrem PVX-Klon inokuliert worden waren, dessen TGB2-ORF vollständig entfernt worden war. In gleicher Weise konnten Mitra *et al.* (2003) den Verlust der interzellulären und der systemischen Ausbreitungsfähigkeit ihres PVX-Klons in *N. tabacum* und in *N. benthamiana* feststellen, der im TGBp2 eine Deletion von insgesamt 10 Aminosäuren im Bereich zwischen den Transmembranabschnitten dieses Proteins aufwies. Durch die GFP-Markierung konnten sie ebenfalls beobachten, dass die deletierten Viren nur in den primär infizierten Zellen lokalisiert waren.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte bei 56% bzw. 36% der PVX-TGB1-transgenen Tabakpflanzen eine systemische PVX Infektion festgestellt werden, nachdem diese Pflanzen mit den Klonen PVX1-Del1 bzw. PVX2-Del1 per Partikel-Bombardement inokuliert worden waren. Im Vergleich wiesen fast 70% aller TGBp1 transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen derselben Linie bei Manske und Schiemann (2005) eine systemische PVX-Infektion auf, nachdem in diese mechanisch ein GUS-markierter und modifizierter PVX-Volllängklon eingebracht worden war, der sich durch den Verlust der fast vollständigen Sequenz des TGB1 auszeichnete.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die systemische Ausbreitung der auf die beiden PVX-TGB1-Deletionsmutanten zurückzuführenden Viren in den transgenen Tabakpflanzen der Linie 1/23 nicht auf Rekombinationsprozessen zwischen der viralen RNA und der transgenen pflanzlichen PVX-TGB1-mRNA beruhte. Derartige Ereignisse hätten zu einer Rekonstitution des vollständigen Virusgenoms führen können, was jedoch nicht beobachtet werden konnte. Damit stehen diese Ergebnisse in Einklang mit denen von Manske und Schiemann (2005), die bis zu 12 Wochen nach Inokulation ihrer PVX-TGB1 Deletionsmutante in den transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen derselben Linie (1/23) mittels IC-RT-PCR keine wiederhergestellten PVX-Genome identifizieren konnten. Eine Voraussetzung für eine homologe RNA-Rekombination ist das Vorliegen sehr ähnlicher bzw. identischer Sequenzmotive auf Nukleotidebene, die einen Matrizenstrangwechsel der viralen Replikase ermöglichen (Nagy und Bujarski, 1996). Für die 3'-Enden der BMV RNA2 und RNA3 konnten Nagy und Bujarski (1995) zeigen, dass eine Länge von 15 identischen Nukleotiden inmitten des nicht kodierenden 3'-UTR Bereiches für das Entstehen von rekombinanten RNA Molekülen ausreichend war, wobei die Effektivität bei 50% lag. Bei einem Vorliegen von lediglich neun identischen Nukleotiden konnten sie rekombinante RNA Moleküle mit einer Effektivität von lediglich 4% feststellen.

Demzufolge hätten die großen übereinstimmenden Sequenzbereiche bei den TGB1 transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen und den PVX-Deletionsmutanten (PVX1-Del1 und PVX2-Del1) eine hohe Rekombinationsrate zwischen der viralen RNA und der transgenen mRNA der Pflanzen der Linie 1/23 erwarten lassen. Dabei hätten auch vollständig rekonstituierte PVX-Genome entstehen können. Diese hätten in nicht-transgenen Tabakpflanzen infolge einer mechanischen Übertragung solch eines PVX haltigen Pflanzenpresssaftes zu einer systemischen Infektion führen können. In der vorliegenden Arbeit konnten bei keiner nicht-transgenen *N. benthamiana* -Pflanze, die zuvor mit dem Presssaft von einer systemisch infizierten PVX-TGB1 transgenen Pflanze inokuliert worden war, eine nachweisbare PVX-Infektion festgestellt werden. Zu gleichen Ergebnissen gelangten auch Manske und Schiemann (2005), die ebenfalls aus systemisch PVX-infizierten PVX-TGB1-transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen, die zuvor mit der PVX-TGB1 Defektmutante inokuliert worden waren, virushaltigen

4. Diskussion

Pflanzenpresssaft auf nicht-transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen übertragen. Ebenso konnten auch Kobayashi *et al.* (2001) in nicht-transgenen Tabakpflanzen keinerlei rekombinante PVX-Genome identifizieren, nachdem diese Pflanzen zuvor mit virushaltigem Presssaft inokuliert worden waren, der von PVX-TGB2 transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN) stammte. Diese waren zuvor mit einer PVX-TGB2-Deletionsmutante inokuliert worden und wiesen systemische PVX Infektionen auf. Auch Lough *et al.* (2001) konnten in WCIMV-TGB1-transgenen Tabakpflanzen zwar eine Wiedererlangung der systemischen Ausbreitung des WCIMV feststellen, welches eine Deletion des gesamten TGB1 aufwies, jedoch konnten auch sie keine rekombinanten Viren in diesen Pflanzen identifizieren.

Wie in all diesen Untersuchungen müssen auch in der vorliegenden Arbeit als Ursache für die Wiedererlangung der systemischen Ausbreitungsfähigkeit der zuvor ausbreitungsdefekten PVX-Mutanten (PVX1-Del1 und PVX2-Del1) in den TGB1 transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen Komplementationereignisse angesehen werden. Dabei werden die verlorengegangenen Funktionen der PVX-TGB1-Proteine der auf den beiden PVX-Klonen (PVX1-Del1 und PVX2-Del1) beruhenden Viren durch die von den Pflanzen exprimierten TGB1-Proteine übernommen.

Schon mehrfach wurde in pflanzlichen Systemen die Wiedererlangung vornehmlich der interzellulären oder systemischen Ausbreitung bei mutierten Viren durch die Expression eines viralen ORFs durch Komplementationeffekte beobachtet.

1996 zeigten Cooper *et al.*, dass das MP des TMV die Ausbreitung einer CMV Mutante, deren Genom sich durch einen Verlust des MP auszeichnete, wiederherzustellen vermochte. Morozov *et al.* (1997) berichten von der systemischen Ausbreitungsfähigkeit einer PVX Mutante in Tabakpflanzen, die eine Deletion im TGB1 Bereich aufwies, nachdem der GUS markierte PVX Vollängenklon gleichzeitig mit Plasmiden, bei denen das MP des TMV bzw. das MP des *Red clover necrotic mosaic dianthovirus* (RCNMV) unter den Kontrollen des 35S CaMV Promotors stehend, in die Pflanzen inokuliert worden waren.

Bei einer TGB-Defektmutante des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), die sich durch Frameshiftmutationen innerhalb der ORFs des TGBs auszeichneten, konnten Lauber *et al.* (1998) in *C. quinoa* nach gleichzeitiger Inokulation dieser Mutante mit

weiteren Konstrukten, die den ORF des TMV-P30 oder die ORFs des gesamten PCV-TGB besaßen, eine in *trans* ablaufende Komplementation der Ausbreitung des BNYVV beobachten. Ebenso konnte die Ausbreitungsfähigkeit einer ToMV-Mutante, die eine Deletion innerhalb des Hüllproteingens besaß, durch das 3a Protein und des Hüllproteins des CMV, wie auch durch das 3a Protein des CCMV wiederhergestellt werden (Tamai *et al.*, 2003).

In Blättern von *N. benthamiana* -Pflanzen konnten Agranovsky *et al.* (1998) eine durch das 65 K Protein des *Beet yellows virus* herbeigeführte interzelluläre Ausbreitung einer GUS markierten PVX-Mutante, die sich durch eine Deletion im TGB1 auszeichnete, beobachten. Aus den Arbeiten von Fedorkin *et al.* (2000, 2001) ist bekannt, dass in *N. benthamiana* -Pflanzen sowohl die potyviralen Hüllproteine des PVA und des PVY, als auch die großen und kleineren Hüllproteine des *Beet yellows closterovirus* und das CP des TMV in der Lage waren, die Ausbreitung eines im C-terminalen Bereich um 30 Nukleotide verkürzten PVX-CP innerhalb eines GUS markierten Volllängenkons zu komplementieren. In transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen, die das MP des Tobamovirus *Odontoglossum ringspot virus* (ORV) exprimierten, konnten Ajjikuttira *et al.* (2005) die Wiedererlangung der interzellulären Ausbreitung bei einem CymMV beobachten, welches eine Mutation im TGB1 besaß. Auch umgekehrt stellte sich bei CymMV -TGB1 exprimierenden Pflanzen die interzelluläre Ausbreitung eines im MP Defekte aufweisenden ORV wieder ein (Ajjikuttira *et al.*, 2005). In einem weiteren Beispiel konnte auch das Protein, für welches der ORF4 des Umbravirus *Groundnut rosette virus* (GRV) kodiert, die Funktionen des TGBs des PVX und die des CPs des TMV übernehmen (Tamai *et al.*, 2003). Selbst bei einem chimären RCNMV (Genus *Dianthovirus*), bei dem das viruseigene Hüllproteing durch das des *Turnip rosette virus* (TRoV, Genus *Sobemovirus*) ausgetauscht wurde, konnte eine systemische Ausbreitung in *N. benthamiana* -Pflanzen festgestellt werden (Callaway *et al.*, 2004).

Nicht nur durch die Expression virusfremder, sondern auch durch die Expression viruseigener Gene führten Komplementationsereignisse zu einer Wiedererlangung der Ausbreitung. Beispielsweise war es einer PVX Mutante möglich, die sich durch einen fast vollständigen Verlust ihrer genomischen CP Sequenz auszeichnete, sich in PVX-CP transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum*) interzellulär auszubreiten (Spillane *et al.*,

4. Diskussion

1997). Die ersten Hinweise, dass die Funktion eines deletierten PVX-TGB1 durch ein PVX-TGBp1 Protein in *trans* komplementiert werden konnte, gab es in nicht-transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen. Dabei wurden diese Pflanzen mittels Partikel-Bombardement gleichzeitig mit einem PVX-GUS Klon, der aufgrund einer Frameshiftmutation ein nicht funktionsfähigen TGB1 besaß, und einem weiteren Klon, bei dem das TGB1 Gen unter der Kontrolle eines 35S CaMV-Promotors stand, inokuliert (Agranovsky *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1997). In vergleichbarer Weise konnten Morozov *et al.* (1999) auch die mit Hilfe von PVX-TGBp1-GFP Fusionsproteinen wiederhergestellte interzelluläre Ausbreitung eines TGBp1 defekten PVX beobachten. Die simultane transiente Expression beider Konstrukte führte zu der Wiedererlangung der interzellulären Ausbreitung eines GUS-markierten PVX-Klons. Ebenso konnte die Komplementation bei einem stabil exprimierten Konstrukt gezeigt werden. In diesem Fall wurden PVX-TGBp1-transgene *N. benthamiana* -Pflanzen mit PVX-TGBp1 Deletionsmutanten inokuliert, die ein Fehlen von 357 bp aufwiesen, und in ca. 73% der Fälle wurde eine Wiedererlangung der viralen Ausbreitung festgestellt (Verchot *et al.*, 1998). Selbst die durch größere Sequenzverluste innerhalb des TGB1 in unterschiedlichen PVX-Klonen hervorgerufenen Ausbreitungsdefekte konnten in verschiedenen Studien komplementiert werden: Manske und Schiemann (2005) berichten, dass die systemische Ausbreitung ihrer PVX-TGB1-Deletionsmutante, bei der 640 von 681 bp des TGB1 entfernt worden waren, in TGB1-transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen wiederhergestellt werden konnte. Sogar beim vollständigen Fehlen des PVX-TGB1 konnten Ares *et al.* (1998) nach Inokulation ihrer Deletionsmutante in PVX-TGB1 transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN) eine systemische Ausbreitung des PVX in diesen Pflanzen beobachten.

Im Gegensatz zu den TGB1-transgenen Tabakpflanzen konnte in der vorliegenden Arbeit bei keiner der PVX-TGB2-transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen der Linie 118, die zuvor mit den Klonen (PVX1-Del2 oder PVX2-Del2) inokuliert worden waren, eine PVX Infektion nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, ist eine durch das transgene Insert hervorgerufene Resistenz gegen das PVX auszuschließen, denn transgene Pflanzen dieser Linie wiesen gleichsam den nicht-transgenen Tabakpflanzen nach

Inokulation der beiden unveränderten PVX-Volllängenklone systemische PVX-Infektionen auf.

Es konnte nicht geklärt werden, warum keine durch Komplementationereignisse hervorgerufene Ausbreitung der PVX-TGB2 Deletionsmutanten in den PVX-TGBp2 transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen stattgefunden hat. Denkbar wäre zum einen, dass in diesen Pflanzen zwar eine Expression dieser TGBp2 Proteine stattgefunden hat, die Menge an produzierten PVX-TGBp2 jedoch nicht für eine Komplementation der Virusausbreitung ausgereicht haben könnte. Zum anderen gäbe es die Möglichkeit, dass nach der mittels RT-PCR bestätigten Transkription dieses viralen Gens in den Pflanzen Probleme mit der Translation der transgenen mRNA aufgetaucht sein könnten, so dass unter Umständen keine PVX-TGB2 Proteine gebildet werden konnten.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit nicht feststellbaren Komplementationen der systemischen Ausbreitung der im TGB2 Mutationen aufweisende PVX-Klone, konnte eine solche Wiedererlangung der Virusausbreitung in verschiedenen PVX-TGB2 transgenen Pflanzen von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet werden:

Verchot *et al.* (1998) stellten eine interzelluläre Ausbreitung von unterschiedlich markierten PVX-TGB2-Deletionsmutanten in TGB2 transgenen Tabakpflanzen fest. Sowohl ein GUS-markierter PVX-Klon, der eine Deletion von 11 Nukleotiden im TGB2 besaß, als auch ein zweiter GFP-markierter PVX-Klon, bei dem zuvor der gesamte TGB2 entfernt worden war, breiteten sich interzellulär aufgrund in *trans* ablaufender Komplementationsprozesse in mehreren PVX-TGB2 transgenen Tabaklinien aus. Auch Kobayashi *et al.* (2001) hatten bei ihren PVX-TGB2 transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN) eine Komplementation der Ausbreitung der deletierten PVX-TGB2 Mutanten in den inokulierten Blättern beobachtet. Jedoch war die Virusausbreitung nur auf die inokulierten Blätter beschränkt, denn Kobayashi *et al.* (2001) konnten in den jüngeren Blättern kein PVX identifizieren. Lough *et al.* (2001) konnten hingegen bei 70% der transgenen Tabakpflanzen, die das TGBp2 des WCIMV exprimierten, eine systemische WCIMV-Infektion nachweisen, obwohl diese Pflanzen zuvor mit einer Deletionsmutante des WCIMV inokuliert wurden, dessen TGB2-ORF vollständig entfernt worden war.

Im Gegensatz zu den nicht-transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen und den transgenen Tabakpflanzen der Linien 1/23, die mit den PVX-Volllängenklonen PVX-1 und PVX-2

4. Diskussion

inokuliert worden waren, wiesen die transgenen Pflanzen derselben Linie keine Blattsymptome auf, nachdem diese mit den PVX-TGB1-Deletionsmutanten (PVX1-Del1 bzw. PVX2-Del1) per Partikel-Bombardement inokuliert worden waren.

Ebenso wiesen Pflanzen derselben Linie bei den Untersuchungen von Manske und Schiemann (2005) keine PVX-Blattsymptome auf, nachdem in diese eine PVX-TGB1 Deletionsmutante hineingebracht worden waren, die sich durch einen Verlust von ca. 94% der Nukleotidsequenz des TGBp1 auszeichnete. Die Ursache für das Ausbleiben der typischen Blattsymptome konnte weder in der vorliegenden, noch in der Arbeit von Manske und Schiemann (2005) geklärt werden. Da aber aus deren Studien bekannt ist, dass das PVX-TGBp1 in diesen Pflanzen nur in geringen Mengen exprimiert wird, scheint die Menge an viralen PVX-TGB1 Proteinen zwar einerseits für die Virusausbreitung, nicht jedoch für die Symptomausprägung ausreichend gewesen zu sein.

Es ist bekannt, dass das PVX-TGBp1 nicht nur an der Virusausbreitung, sondern auch an den Symptomausprägungen beteiligt ist. Diese Aspekte wurden bereits unter Punkt 1.3.2.2 beschrieben. Ares *et al.* (1998) berichten diesbezüglich, dass ihre transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* Xanthi D8 NN), die das virale Protein eines südamerikanischen PVX Isolats (PVX-Stamm CP, Orman *et al.*, 1990) in großen Mengen exprimierten, sich im Vergleich zu den nicht-transgenen Pflanzen derselben Art durch eine gestauchte und chlorotische Erscheinung auszeichneten. Allerdings waren die Symptome dieser transgenen Tabakpflanzen nach Inokulation mit einer ausbreitungsdefekten PVX-TGB1 Mutante, die sich durch den vollständigen Verlust der TGB1-Sequenz auszeichnete, von den Pflanzen, die mit dem PVX-Wildtyp inokuliert worden waren, nicht mehr zu unterscheiden. Kobayashi *et al.* (2004) konnten bestätigen, dass die Akkumulation des PVX-TGBp1 auf die Morphologie und die Physiologie von Tabakpflanzen (*N. tabacum*) einen Einfluss besitzt, und somit dieses virale Protein einen entscheidenden Beitrag zur Symptomausprägung leistet. Denn die von ihnen erzeugten transgenen Tabakpflanzen, die den TGB1 des PVX exprimierten, zeichneten sich im Vergleich zu den nicht-transformierten Kontrollpflanzen durch schmalere Blätter, gekürzte Internodien, reduzierte Blattzahlen und eine chlorotische Erscheinung aus. Im Gegensatz dazu wiesen die in dieser Arbeit verwendeten TGBp2 transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen der Linie 118 keinerlei visuell erkennbare

Unterschiede zu den nicht-transformierten *N. benthamiana* -Pflanzen auf. Auch von anderen PVX-TGBp2 transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. Xanthi) ist bekannt, dass sie sich nicht durch äußerlich sichtbare Besonderheiten, jedoch durch mikroskopisch Veränderungen der Gewebestrukturen auszeichneten (Kobayashi *et al.*, 2001).

4.3. Untersuchungen zum Vorkommen intermolekularen Rekombination zwischen dem PVX und PVM

Durch die künstlich erzeugten Mischinfektionen von insgesamt 40 Tomatenpflanzen mit den Kartoffelviren PVX und PVM sollte untersucht werden, ob innerhalb eines kurzen Beobachtungszeitraumes unter niedrigem Selektionsdruck rekombinante Viren auftreten. Obwohl die beiden verwendeten Viren unterschiedlichen Genera angehören (*Potexvirus* und *Carlavirus*), sind ihre Genome im Aufbau mit Ausnahme des zusätzlichen ORF6 der Carlaviren sehr ähnlich.

Zwar konnte bei allen 40 Tomatenpflanzen beide Viren sowohl serologisch als auch stichprobenhaft durch RT-PCR nachgewiesen werden, es war jedoch mit Hilfe des verwendeten RFLP-Ansatzes nicht möglich, rekombinante PVX-Genome zu detektieren.

Bei diesem Untersuchungsansatz wurde die bekannte Sequenz des verwendeten PVX ausgenutzt, das auf dem Volllängenklon pPVX0014 zurückzuführen war. Im Gegensatz dazu war die Sequenz des verwendeten PVM Isolates nicht bekannt. Der für diese Untersuchungen ausgewählte potexvirale Sequenzbereich, der neben dem TGB auch nahezu die vollständige CP Sequenz beinhaltet, schien für diese Untersuchungen besonders interessant, da in früheren Studien in diesem Bereich bei verschiedenen Viren der Familie *Flexiviridae*, die unterschiedlichen Genera angehörten, defekte RNA („defective RNA“, D RNA) beschrieben wurden. Bei mehreren Potexviren konnten als Folge von homologen Rekombinationsereignissen in verschiedenen Sequenzbereichen der Replikase und des Hüllproteingens derartige D RNA festgestellt werden. Beispielsweise wiesen Yeh *et al.* (1999) bei einem Isolat des BaMV (*Potexvirus*) eine solche D RNA nach, die sich aus den Sequenzen des 5' -UTR, dem N-terminalen Bereich der Replikase und dem C-terminalen Bereich des CPs sowie die der 3'-UTR

4. Diskussion

zusammensetzte. Auch beim *Clover yellow mosaic virus* (CIYMV) dem WCIMV und dem *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) (White *et al.*, 1991, 1992 und Calvert *et al.*, 1996) wurden derartige D RNA beschrieben, bei denen die Rekombinationsorte im Replikase- und Hüllproteingebereich lagen. Darüber hinaus konnten auch Teycheney *et al.* (2005) bei ihren Arbeiten zur molekularen Charakterisierung eines Isolates des *Banana virus X* (BVX) drei verschiedene D RNA Varianten mittels RT-PCR amplifizieren. Zwar konnte dieses Virus noch keinem Genus innerhalb der Familie *Flexiviridae* zugeordnet werden, aber seine Genomorganisation entspricht denen der Viren des Genus *Carlavirus*. Bei allen drei D RNA Varianten waren die Rekombinationsstellen innerhalb der Sequenzen des TGBs und des Hüllproteingens lokalisiert.

In der hier vorliegenden Arbeit hätten nicht-homologe Rekombinationsereignisse innerhalb dieses Untersuchungsbereiches eine veränderte Sequenz zur Folge gehabt, so dass auch einige sich in diesem Bereich befindlichen Restriktionsendonukleaseschnittstellen betroffen sein würden. Deshalb wurden die Restriktionsendonukleasen unter dem Gesichtspunkt so gewählt, dass die entstehenden Fragmente auf 1%-1,5%-igen Agarosegelen deutlich erkennbar sein sollten. Eine Veränderung der Sequenz des PVX in diesem Bereich wäre nach den verschiedenen enzymatischen Verdauen dadurch erkennbar gewesen, da sich die Fragmentmuster dieser Proben von denen der Kontrollfragmente (amplifiziert vom PVX-Vollängenklon) unterschieden hätten.

Da sich die Fragmentmuster der Proben aller 40 doppelinfizierten Pflanzen nach den unterschiedlichen enzymatischen Restriktionen im Vergleich mit denen der PVX-Kontrollen nicht unterschieden, musste davon ausgegangen werden, dass sich keine detektierbare Rekombination zwischen diesen beiden Viren im untersuchten Sequenzbereich des PVX ereignet hatte.

Nicht auszuschließen bleibt jedoch, dass sich in den Sequenzbereichen, die zwischen den einzelnen Restriktionsschnittstellen lagen, Rekombinationen ereignet haben könnten, ohne sich erkennbar auf die entstehenden Fragmente ausgewirkt zu haben. Infolge dessen wären solche Rekombinationen unentdeckt geblieben. Da durch die RFLP Untersuchungen keine feststellbaren Unterschiede zwischen den Amplifikaten der 40 doppelinfizierten Tomatenpflanzen und denen der PVX-Kontrollpflanzen

festgestellt werden konnten, wurde auf eine Sequenzierung dieser Fragmente verzichtet. Dadurch blieben ebenfalls einzelne Nukleotidaustausche oder kurze rekombinante Sequenzbereiche unentdeckt.

Unter der Annahme, dass sich Rekombinationen zwischen den beiden viralen Genomen genau im Sequenzbereich eines oder beider PVX-Primer ereignet haben könnten, hätte ein so verändertes RNA-Molekül nicht durch die RT-PCR amplifiziert, und darauf aufbauend durch den RFLP-Ansatz identifiziert werden können. Ein rekombinantes PVX wäre zudem erst dann aufgefallen, wenn es sich in den Pflanzen in ähnlicher Weise wie die ursprünglichen Viren hätte replizieren oder ausbreiten können. Durch Defizite in der Replikations- oder Ausbreitungsfähigkeit wären solche Viren eventuell auf kleine Bereiche im pflanzlichen Gewebe beschränkt gewesen. Da nur aus wenigen Blattbereichen die Gesamt-RNA für die RT-PCR extrahiert wurde, besteht die Möglichkeit, dass in den nicht beprobten Bereichen, rekombinante Viren hätten nachgewiesen werden können, die u. U. auf diese Bereiche begrenzt gewesen wären.

Als Voraussetzung für eine Rekombination zwischen zwei RNA Viren müssen diese nicht nur simultan in einer Pflanze vorkommen, sondern darüber hinaus sich auch gleichzeitig in denselben Zellen replizieren, damit die erforderlichen Strangwechsel vorkommen können (Bujarski und Nagy, 1996; Worobey und Holmes, 1999).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Mischinfektionen konnte nicht geklärt werden, inwieweit diese beiden Viren (PVX und PVM) tatsächlich gemeinsam in denselben Zellen vorkamen. Zwar ist aus älteren Untersuchungen bekannt, dass unterschiedliche Viren gemeinsam in denselben Zellen vorkommen können. Beispielsweise konnten Fujisawa *et al.* (1967) anhand von ungewöhnlich geformten Einschlusskörperchen die gemeinsame Replikation von TMV und TEV in Tabakzellen, und Lee und Ross (1972) das simultane Vorkommen von *Soybean mosaic virus* (SMV) und *Bean pod mottle virus* (BPMV) in Sojabohnenzellen nachweisen. Ebenfalls in Tabakzellen konnten auch Goodman und Ross (1974) Doppelinfektion zwischen PVX und PVY identifizieren. Demgegenüber zeigen aber andere Untersuchungen, dass in Mischinfektionen nicht immer die verschiedenen Viren gemeinsam in denselben Zellen vorkommen.

Bereits 1929 erkannte McKinney, dass in den unterschiedlich gefärbten und sich voneinander abgrenzenden Mosaikbereichen mischinfizierter Tabakpflanzen

4. Diskussion

verschiedene Isolate des TMV vorzufinden waren. Ebenso konnten aus farblich unterschiedlichen Mosaikarealen von Pflanzen, die Infektionen mit dem *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) aufwiesen, verschiedene Varianten dieses Virus bestimmt werden, wodurch die räumliche Trennung der einzelnen Isolate im pflanzlichen Gewebe bestätigt werden konnte (Chalcroft und Matthews, 1966a,b; 1967; Reid und Matthews, 1966). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten Hull und Plaskitt (1970) nachweisen, dass zwei verschiedene Stämme des *Alfalfa mosaic virus* (AMV) nur dann in der Lage waren dieselben Zellen zu infizieren, wenn die Pflanzen gleichzeitig oder kurz hintereinander mit den verschiedenen Stämmen dieses Virus inokuliert wurden. Während Hall *et al.* (2001) eine heterologe Verteilung verschiedener Varianten des WSMV in doppelinfizierten Weizenpflanzen beschrieben, konnten Divéki *et al.* (2002) die gegenseitige Abgrenzung von zwei unterschiedlich markierter PVX-Isolate in *N. clevelandii* feststellen. Dietrich und Maiss (2003) beobachteten mikroskopisch die Verteilungen mehrerer und unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Viren der Genera *Potyvirus* und *Potexvirus* (PPV, TVMV, CIYVV und PVX) in *N. benthamiana*. Dabei stellten sie fest, dass die Zellen nur dann beide Viren enthielten, wenn es sich bei diesen um jeweils ein Poty- und ein Potexvirus handelte. Im Gegensatz dazu kam es bei solchen Doppelinfektionen zu keiner Vermischung der Ausbreitungszonen der beiden Viren, wenn diese demselben Genus angehörten. In diesen Fällen konnten lediglich in den Grenzbereichen dieser Ausbreitungszonen wenige doppelt infizierte Zellen identifiziert werden.

Aus den Untersuchungen von Silbernagel *et al.* (2001) wurde die Bedeutung des Selektionsdruckes für das Eintreten von Rekombinationsereignissen deutlich. Über drei Jahre hinweg war es ihnen nicht möglich, rekombinante Viren in Bohnenpflanzen nachzuweisen, die Mischinfektionen mit den Potyviren BCMNV und BCMV aufwiesen, und die den beiden Viren als Wirtspflanze dienen konnten. Wurden hingegen diese Mischinfektionen in anderen Bohnenpflanzen erzeugt, die einem der Viren nicht als Wirtspflanze dienen konnte, traten innerhalb eines kurzen Untersuchungszeitraumes (28 Tage nach Inokulation) rekombinante Viren auf.

Da auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tomatenpflanzen der Sorte Lizzy sowohl dem PVX als auch dem PVM als Wirtspflanze dienten, kann es durchaus sein, dass aufgrund des fehlenden oder eines zu geringen Selektionsdruckes keine

rekombinanten Viren innerhalb des Untersuchungszeitraumes detektiert werden konnten.

4.3.1. Verlust der Infektiosität des zwischen den Viren PVX und PVM artifiziell erschaffenen hüllproteinchimären Virus

Um die Auswirkung einer nicht-homologen Rekombination zwischen den Viren PVX und PVM untersuchen zu können, wurde auf Basis des PVX-Volllängenkons (pPVX0014) künstlich der hüllproteinchimäre PVX-Klon pPVX/M-CP hergestellt. Dieser zeichnete sich dadurch aus, dass nahezu die gesamte Hüllproteinsequenz des PVX mit der entsprechenden des PVM ausgetauscht wurde. Lediglich 13 Nukleotide im N-terminalen und 59 im C-terminalen Bereich der ursprünglichen Hüllproteinsequenz des verwendeten PVX-Volllängenkons bleiben erhalten. Durch die Sequenzierung dieser chimären Hüllproteinsequenz konnte bestätigt werden, dass die Leserahmen der übrigen potexviralen ORFs nicht beeinflusst wurden, und dass es darüber hinaus innerhalb des chimären Hüllproteins nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens oder zu einer Ausbildung eines ungewollten Stop-Codons gekommen war. Dennoch konnten weder eine lokale noch eine systemische Ausbreitung des hüllproteinchimären PVX in den *N. benthamiana*-Pflanzen festgestellt werden, die zuvor mit diesem modifizierten Klon durch Partikel-Bombardement inokuliert worden waren. Die Ursache für das Ausbleiben einer nachweisbaren Infektion muss im chimären Hüllprotein liegen, und kann nicht mit der verwendeten Inokulationsmethode (Partikel-Bombardement) zusammenhängen. Denn Tabakpflanzen (*N. benthamiana*), die zu Kontroll- und Vergleichszwecken mit dem unveränderten PVX-Volllängenkons auf dieselbe Weise inokuliert worden waren, wiesen innerhalb von drei Wochen deutliche PVX-Blattsymptome auf, und darüber hinaus konnten bei ihnen systemische PVX-Infektionen sowohl serologisch, als auch durch RT-PCR nachgewiesen werden.

Das chimäre Hüllprotein führte offensichtlich zu einem Verlust der Ausbreitungsfähigkeit des modifizierten PVX, und die Funktionen des PVX-CP konnten in den Pflanzen nicht durch das modifizierte Hüllprotein, welches zum größten Teil aus der PVM-CP Sequenz bestand, komplementiert werden.

4. Diskussion

Allerdings können in der Literatur auch Beispiele gefunden werden, bei denen hüllproteinchimäre PVX Konstrukte trotz ihrer Modifikationen in der Lage waren, sich systemisch in Pflanzen auszubreiten. Diese beruhten zumeist auf modifizierten PVX Vollängklonen, die als Vektoren verwendet wurden, um mit deren Hilfe virusfremde Proteine in Pflanzen exprimieren zu können. Die chimären Hüllproteinsequenzen dieser Expressionsvektoren zeichneten sich dadurch aus, dass ihre ursprünglichen PVX-CP Sequenzen erhalten blieben, und ihnen lediglich am N-terminalen Ende zusätzliche Fremdsequenzen zugefügt wurden. Auf dieser Weise integrierten beispielsweise Marusic *et al.* (2001) die Epitopsequenz des Glycoproteins 41 vom HIV-Virus des Typs 1 am N-terminalen Ende des Hüllproteingens ihres PVX-Vollängklons, und die systemische Ausbreitung des PVX blieb in *N. benthamiana* -Pflanzen trotz dieses veränderten Hüllproteingens erhalten. In ähnlicher Weise verbanden Donini *et al.* (2005) die Sequenz eines aus Hefe stammenden „Killertoxins“, welches eine antimikrobielle Wirkung besitzt, mit dem N-terminalen Ende der PVX-Hüllproteinsequenz, und konnten ebenfalls keine Beeinträchtigung der Ausbreitung ihres modifizierten PVX in den Pflanzen beobachten. In einem weiteren Beispiel tauschten Koenig *et al.* (2006) nahezu die vollständige Hüllproteingensequenz des Vollängklons des *Zygocactus virus X* (ZVX, Genus *Potexvirus*) mit der entsprechenden hüllproteingenkodierenden Sequenz des *Schlumbergia virus X* (SVX) aus, um diesen hüllproteinchimären Vollängklon später als Expressionsvektor für das Hüllproteingens BNYVV zu verwenden.

Bei *N. benthamiana* -Pflanzen konnten Paalme *et al.* (2004) eine veränderte Symptomausprägung feststellen, die zuvor mit einem chimären PVA-Vollängklon inokuliert worden waren, welchen sie zuvor aus zwei verschiedenen PVA-Vollängklonen hergestellt hatten. In einem anderen Beispiel wurde ein Austausch der potyviralen Hüllproteinsequenz und eines kurzen Bereiches der 3'-UTR Region eines PPV-NAT Vollängklons mit der entsprechenden Sequenz des PPV-SOC durchgeführt (Al Abdallah, 2002). Der daraus entstandene chimäre PPV-Vollängklon wurde wie die nicht modifizierten Ausgangsklone in *C. quinoa* – Pflanzen eingebracht, und nach zwei Wochen konnten auf den Blättern deutliche Lokalläsionen beobachtet werden. Solche Symptome konnten auf den Pflanzen, die

zuvor mit den Ausgangsklonen inokuliert worden waren, nicht beobachtet werden. Die systemische Ausbreitungsfähigkeit eines anderen hüllproteinchimären Virus in *N. benthamiana* -Pflanzen konnten Varrelmann *et al.* (2000) feststellen, nachdem sie die zentrale Hüllproteingensequenz des PPV-NAT-Volllängenkons mit der entsprechenden Sequenz des ZYMV ausgetauscht hatten. Gleiches stellten auch Callaway *et al.* (2004) bei einem hüllproteinchimären RCNMV in *N. benthamiana* -Pflanzen fest, bei welchem das viruseigene CP mit dem des TRoV ausgetauscht worden war.

Das modifizierte Hüllprotein des in dieser Arbeit hergestellten hüllproteinchimären PVX-Volllängenkons war offensichtlich nicht in der Lage, alle Funktionen des ursprünglichen PVX-CP zu übernehmen, so dass diese Modifikation in diesem Falle zu einem Verlust der systemischen Ausbreitung und der Infektiosität führte. Wie bereits unter Punkt 1.3.2.2 beschrieben, besteht eine Hauptfunktion des potexviralen Hüllproteins in der Verpackung (Enkapsidierung) der viralen RNA (Cruz *et al.*, 1996). Es ist durchaus vorstellbar, dass die virale RNA nicht durch die chimären Hüllproteine eingepackt werden konnte. Denn diese (bestehend aus 327 Aminosäuren, 36 kDa) weisen eine um 90 Aminosäuren längere Hüllproteinsequenz (237 Aminosäuren, 25 kDa) und damit einhergehend auch eine ebenfalls höhere Molekülmasse auf. Deshalb ist es durchaus vorstellbar, dass die chimären Hüllproteine aufgrund ihrer für das PVX untypischen Struktur nicht die virale RNA umhüllen konnten. In diesem Zusammenhang konnten Santa Cruz *et al.* (1996) zwar bei ihrem PVX-Volllängenkons, der eine chimäre GFP-Hüllproteinsequenz besaß, feststellen, dass auch diese artifiziell hergestellten N-terminal verlängerten Hüllproteine in der Lage waren, die virale RNA zu enkapsidieren. Die auf dieser Weise entstandenen Viruspartikel wiesen im Vergleich zu den nicht modifizierten PVX-Partikeln einen doppelt so großen Durchmesser auf. Allerdings konnten Santa Cruz *et al.* (1996) eine solche Enkapsidierung durch GFP-markierte Hüllproteine nur in Anwesenheit von unveränderten PVX-Hüllproteinen beobachten. Daher ist es durchaus vorstellbar, dass unter Umständen ebenfalls eine Enkapsidierung der viralen RNA mit den in der vorliegenden Arbeit erzeugten chimären PVX-Hüllproteinen möglich gewesen wäre, wenn darüber hinaus zusätzliche, nicht modifizierte PVX-Hüllproteine vorhanden gewesen wären. Weitere Untersuchungen zeigten, dass bereits kleine Änderungen in der Hüllproteinsequenz deutliche

4. Diskussion

Veränderungen der morphologischen Erscheinung der PVX-Partikel zur Folge hatten. So konnten Chapman *et al.* (1992) unnormale geformte PVX-Partikel beobachten, die von einem PVX-Volllängenklon abstammten, der eine Deletion von 19 N-terminal lokalisierte Aminosäuren einer sonst unveränderten PVX-Hüllproteinsequenz besaß. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten chimären PVX-Hüllproteine im Vergleich zu denen eines nicht modifizierten PVX-Volllängenklons nicht mehr die Fähigkeiten besaßen, sich an bestimmten und von Kwon *et al.* (2005) näher untersuchten Bereichen innerhalb der 5'-UTR der viralen RNA anlagern zu können, welches eine Voraussetzung für den Beginn der Enkapsidierung der viralen RNA darstellt.

Vom potexviralen CP ist bekannt, dass es neben der Verpackung der viralen RNA (Cruz *et al.* 1996) ebenso an der interzellulären Ausbreitung des Virus und damit auch am Infektionsprozess beteiligt ist (Chapman *et al.* 1992; Fedorkin *et al.* 2001, Goulden, 1993; Baulcombe *et al.* 1995; Forster *et al.* 1992). Deletionsmutanten, bei denen Teile (Fedorkin *et al.* 2000) oder nahezu der vollständige Hüllproteinbereich entfernt wurden, zeichneten sich dadurch aus, dass sie weniger effektiv oder gar nicht mehr in der Lage waren, sich interzellulär auszubreiten (Fedorkin *et al.* 2000; Spillane *et al.* 1997; Krishnamurthy *et al.* 2002; Verchot *et al.* 1998). Wie bereits unter 1.3.2.3 beschrieben, spielt das potexvirale Hüllprotein eine für die Ausbreitung von Zelle zu Zelle eine entscheidende Rolle. Denn es ist Bestandteil des für diesen Transport wichtigen RP, welcher sich aus potexviraler RNA, TGBp1-Proteinen und Hüllproteineinheiten zusammensetzt. Die Notwendigkeit dieser RP bezüglich des interzellulären Transports konnte für das PVX in *N. benthamiana* gezeigt werden (Lough *et al.* 1998, 2000, 2001; Santa Cruz *et al.* 1998; Atabekov *et al.* 2000) und wurde im neuesten Modell der potexviralen Ausbreitungsmechanismen integriert (Verchot-Lubicz, 2005).

Es ist vorstellbar, dass die Ausbildung solcher RP durch die in dieser Arbeit artifiziell erzeugten chimären PVX-Hüllproteine gehemmt, oder überhaupt nicht mehr stattfinden konnte. Darüber hinaus besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass diese RPs aufgrund der modifizierten Hüllproteine nicht mehr in der Lage waren, ihre ursprünglichen Funktionen auszuüben, wodurch die interzelluläre Ausbreitung negativ beeinflusst wurde.

Unklar bleibt jedoch, inwieweit nun tatsächlich der interzelluläre als auch der lokal begrenzte Transport durch die chimären PVX-Hüllproteine verhindert worden ist. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, da kein GFP oder DsRed markierter PVX-Vollängenklon für den Austausch der Hüllproteinsequenz verwendet wurde, der es erlaubt hätte, die virale Ausbreitung im pflanzlichen Gewebe fluoreszenzmikroskopisch zu verfolgen. In diesem Zusammenhang konnte schon früher der Verlust der interzellulären Ausbreitung bei PVX-Mutanten festgestellt werden. Dabei wurden Mutationen in den Hüllproteinsequenzen solcher PVX-Vollängenklone hergestellt, deren Ausbreitung im pflanzlichen Gewebe durch die Expression des GFP in den virusinfizierten Zellen verfolgt werden konnte (Krishnamurthy *et al.* 2002; Santa Cruz *et al.* 1996). Durch die Markierung des hüllproteinchimären PVX-Vollängenklons hätte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung die potenzielle Begrenzung dieser rekombinanten Viren auf die ursprünglich inokulierten Zellen oder eine lokal begrenzte Ausbreitung im pflanzlichen Gewebe verifizieren oder verwerfen können.

Da sich das künstlich erzeugte hüllproteinchimäre PVX in dieser Arbeit als nicht infektiös herausstellte, besaß dieses gegenüber dem ursprünglichen unveränderten PVX also keinerlei Fitnessvorteile. Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, dass sich unter natürlichen Bedingungen eine solche Rekombinante wohl kaum gegenüber den ursprünglichen Viren durchsetzen kann.

4.4. Konstruktion eines PVM Vollängenklons

Als Grundlage für spätere Untersuchung der intermolekularen Rekombination zwischen einem Potex- und einem Carlavirus wurde in der vorliegenden Arbeit ein infektiöser Vollängenklon des PVM hergestellt.

In der Vergangenheit konnten schon von einer Vielzahl unterschiedlicher Pflanzenviren infektiöse RNA-Transkripte oder cDNA Klone produziert werden, wie beispielsweise von den Potyviren *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) (Olsen und Johansen, 2001), LMV (Yang *et al.*, 1998), ZYMV (Gal-On *et al.*, 1991), PVA (Puurand *et al.*, 1996) oder PPV (Riechmann *et al.*, 1990; López-Moya und Garcia, 2000; Maiss *et al.*, 1992).

4. Diskussion

Ebenso konnten von Viren anderer Genera Vollängenklone hergestellt werden, wie dem TMV (Dagless *et al.*, 1997), dem PVX (Baulcombe *et al.*, 1995), dem *Grapevine virus B* (GVB; Genus *Vitivirus*; Saldarelli *et al.*, 2000) oder dem *Beet mild yellowing virus* (BMV, Familie *Luteoviridae*; Stephan und Maiss, 2006). Bislang wurde jedoch nur in zwei Fällen davon berichtet, dass auch von Viren, die dem Genus Carlavirus angehören, infektiöse cDNA Kopien erzeugt werden konnten. Hierzu gehört neben dem PopMV (Naylor *et al.*, 2005) das B1ScV (Lawrence und Hillman, 1994).

Aufgrund der hohen Prozessivitäten und geringen Fehlerraten der verwendeten Reversen Transkriptase (Expand Reverse Transcriptase (Roche)) und der PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, das gesamte virale Genom (ca. 8,5 kbp) nach reverser Transkription in nur zwei Fragmenten zu amplifizieren. Darüber hinaus stellten sich aufgrund der geringen Fehlerraten der verwendeten Enzyme von den insgesamt zehn rekombinanten Plasmiden (pBin+PVM) acht als infektiös heraus. Denn bei den mit diesen PVM-Vollängenklonen agroinfiltrierten Testpflanzen (*N. hesperis*, *N. benthamiana* und *S. lycopersicon* cv. Lizzy) konnten nach vier Wochen serologisch systemische PVM Infektionen bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu war keines der insgesamt 21 rekombinanten Plasmide des Typs pe35+PVM in der Lage, nach Einbringung in die verschiedenen Testpflanzen mittels Partikel-Bombardement bei diesen eine feststellbare lokale oder systemische PVM Infektion auszulösen.

In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings nicht der Grund für das Ausbleiben der Auslösung der PVM Infektionen geklärt werden. Auch wenn Liu und Lomonosoff (2002) und Lu *et al.* (2003) die Agroinfektion als die geeignetste Methode halten, um Vektorkonstrukte, die auf den Viren *Cowpea mosaic virus* (CPMV) oder PVX basieren, in verschiedene Pflanzen einzubringen, kann in der vorliegenden Arbeit das Partikel-Bombardement als Inokulationsmethode nicht die Ursache sein. Denn bei Pflanzen derselben Sorten, die als Methodenkontrollen mit dem PVX-Vollängenklon (pPVX0014) auf dieselbe Weise inokuliert worden waren, konnten nach drei Wochen PVX-Infektionen serologisch nachgewiesen werden. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass das Partikel-Bombardement als Inokulationsmethode auch prinzipiell für die rekombinanten Plasmide pe35+PVM verwendet werden kann.

Allerdings wurden im Gegensatz zu den PVX-Kontrollansätzen stets Mischproben unterschiedlicher Zusammensetzungen der insgesamt 21 rekombinanten Plasmide (pe35+PVM) für das Partikel-Bombardement verwendet. Da diese rekombinanten Plasmide nicht einzeln per Partikel-Bombardement in die jeweiligen Testpflanzen inokuliert wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, ob einige dieser rekombinanten Plasmide in den Pflanzen in der Lage gewesen wären, eine PVM Infektion auszulösen. Darüber hinaus hätte sich gezeigt, inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem Ausbleiben der Auslösung von PVM-Infektionen in den Pflanzen und der Verwendung von Mischproben beim Partikel-Bombardement bestanden hätte.

Aufgrund der Klonierungsstrategie enthielten sowohl die rekombinanten Plasmide pBin+PVM wie auch die des Typs pe35+PVM dieselbe Kassette, bestehend aus dem verdoppelten 35S CaMV Promotor und der viralen Sequenz. Besonderheiten in der cDNA Kopie des PVM Genoms innerhalb dieser Kassette können deshalb nicht als Ursache für das Ausbleiben der Infektiosität der rekombinanten Plasmide pe35+PVM angesehen werden. Zu diesen Besonderheiten zählen sechs Fremdnukleotide, die sich vor dem 5'-Ende der viralen Sequenz befinden und von der Klonierung verwendeten *AscI* Schnittstelle herrühren.

Obwohl verschiedene Autoren derartig virusfremden Sequenzen oft negative Effekte bezüglich der Infektiosität eines Vollängenklons beimessen oder empfehlen, möglichst keine Fremdnukleotide vor der viralen Sequenz zu belassen (Dagless *et al.*, 1997; Dawson *et al.*, 1986; van der Werf *et al.*, 1986; Janda *et al.*, 1987; Boyer und Haenni, 1994; Eggen *et al.*, 1989, Rizzo und Palukaitis, 1990, Dore *et al.*, 1990, Sadowy *et al.*, 2001) und bei vielen Konstruktionen von Vollängenklonen darauf geachtet wurde, dass diese möglichst keine oder nicht mehr als zwei Fremdnukleotide besitzen (Leiser *et al.*, 1992; Prüfer *et al.*, 1995; 1997; Young *et al.*, 1991; Veidt *et al.*, 1992), erwiesen sich diese zusätzlichen sechs Nukleotide bei den rekombinanten Plasmiden pBin+PVM als nicht störend bezüglich der Infektiosität.

Eine weitere Besonderheit der cDNA Kopie des PVM-Genoms liegt in seinem 3'-Ende. Neben dem viruseigenen Poly-A-Signal (AAUAAA) im 3'-UTR Bereich der PVM-Sequenz, besaß die cDNA Kopie des PVM aufgrund des verwendeten Primers PVM3as einen Poly-A-Schwanz mit einer Länge von insgesamt 24 A. Diese primerbedingte Poly-A-Schwanzlänge stellte sich als ausreichend heraus, und steht somit im Einklang

4. Diskussion

mit früheren Untersuchungen zur Herstellung infektiöser cDNA-Kopien verschiedener Viren, die unterschiedlichen Genera angehörten. Beispielsweise stellten sich nur solche Plasmide, die das Genom des WCIMV beinhalten, als hoch effektiv für die Auslösung von Virusinfektionen heraus, wenn diese die Sequenz für einen Poly-A-Schwanz enthielten (Guilford *et al.*, 1991). Im Gegensatz hierzu besaßen andere WCIMV beinhaltenen Plasmide, bei denen diese Sequenz fehlte, eine wesentlich geringere Infektiosität. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Tsai *et al.* (1999), da bei ihren Untersuchungen ein BaMV Vollängenklon erst mit einem Poly-A-Schwanz von mindestens 15 A in der Lage war, Virusinfektionen in den Pflanzen auszulösen. Darüber hinaus stellte sich eine mit dem Wildtyp des BaMV vergleichbare Infektiosität bei diesem Vollängenklon erst bei einer Verlängerung des Poly-A-Schwanzes auf 25 A ein.

Als weitere Besonderheit zeichnen sich die Plasmide des PVM-Vollängenklons (pBin+PVM) im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer Vollängenklone dadurch aus, dass sich bei ihnen direkt im Anschluss an die virale Sequenz weder eine 35S CaMV- bzw. Nopalinsynthase- (NOS) Terminator-, noch eine Ribozymsequenz anschließt, obwohl sich das Fehlen solcher Sequenzen schon häufig negativ auf die Infektiosität eines Vollängenklons auswirkte. Beispielsweise bedingte das Fehlen eines NOS-Terminators die ausbleibende Infektiosität eines Vollängenklons des Potyvirus ZYMV (Gal-On *et al.*, 1995). Aus mehreren Untersuchungen ist bekannt, dass die Integration einer solchen Ribozymsequenz im Anschluss an das 3'-Ende eines Virusgenoms eine exakte Termination dieser Sequenz in der Pflanze bewirkt (Shintaku *et al.*, 1996; Dagless *et al.*, 1997; Symons, 1997), so dass am 3'-Ende keine Fremdnukleotide ergänzt werden, die sich unter Umständen negativ auf die Infektiosität eines Vollängenklons auswirken könnten (Boyer und Haenning, 1994). Allerdings wurde im Rahmen der Klonierungsarbeiten zur Erzeugung des PVM-Vollängenklons die ursprüngliche im Plasmid pe35S_Ribo enthaltene Ribozymsequenz aufgrund der Verwendung der *Xba*I Restriktionsschnittstelle wegen ihres zweifachen Vorkommens innerhalb der Ribozymsequenz teilweise entfernt.

Trotz des Fehlens solcher Sequenzen im Anschluss an des PVM Genom waren in der vorliegenden Arbeit 8 von 10 Vollängenklonen (pBin+PVM) in der Lage, in den

verschiedenen Testpflanzen eine PVM Infektion auszulösen, so dass in diesem Fall durch diese Konstrukte gezeigt werden konnte, dass solche Sequenzen nicht unbedingt für die Infektiosität nötig sind. Somit stehen diese Ergebnisse in Einklang mit denen von Brault *et al.* (1995), bei denen sich verschiedene Vollängenklone des *Beet western yellowing virus* (BWYV, Genus *Luteovirus*) nach Agroinokulation in *N. clevelandii* - Pflanzen als infektiös erwiesen, obwohl sie weder eine Ribozym- noch eine NOS- oder eine 35S CaMV-Terminatorsequenz besaßen. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Takahashi *et al.* (1997), die vom Potyvirus CIYVV einen infektiösen Vollängenklon herstellten. Wie auch die in dieser Arbeit hergestellten PVM-Vollängenklone stand die cDNA Kopie des CIYVV unter der Kontrolle eines 35S CaMV Promotors. Der Vollängenklon besaß am 3'-Ende weder einen NOS- noch einen 35S CaMV-Terminator, sondern lediglich einen kurzen Poly-A-Schwanz, der aus einer Abfolge von nur 10 A bestand. Auch dieser Vollängenklon stellte sich als infektiös heraus.

Durch die besonders niedrigen Fehlerraten der bereits oben erwähnten Reversen Transkriptase und der DNA Polymerase, die für die Amplifikation der PVM-Fragmente Verwendung fanden, konnte offensichtlich vom Wildtypen des PVM eine sehr exakte cDNA Kopie (pBIN+PVM_41) hergestellt werden. Denn das von diesem Vollängenklon abstammende Virus wies weder in Bezug auf das Wirtspflanzenspektrum Unterschiede auf, noch konnten Differenzen zwischen den Symptomen auf den jeweiligen Wirtspflanzen bezüglich der Virusherkunft festgestellt werden. Diesbezüglich konnten unabhängig von der viralen Abstammung (Wildtyp oder Vollängenklon) bei Nelken, Engelstropeten oder Eierbäumen nach Inokulation keine, während bei Tomaten und verschiedenen Tabakarten PVM Infektionen serologisch festgestellt werden konnten.

Im Gegensatz hierzu wies beispielsweise ein *Beet mosaic virus* (BtMV, Genus *Potyvirus*), welches auf einen Vollängenklon zurückzuführen war, im Vergleich zum Viruswildtyp ein verändertes Wirtspflanzenspektrum und eine teilweise unterschiedliche Symptomausprägung auf. So war dieses vom BtMV-Vollängenklon abstammende Virus aus noch ungeklärten Ursachen nicht wie der Wildtyp in der Lage, Symptome auf einigen für das Wildtypvirus anfälligen Pflanzen wie Spinat (*Spinacia olerata*) und Zuckerrübe (*Beta vulgaris*; 8T0015) hervorzurufen. Weiterhin konnten auf

4. Diskussion

Gartenmelde (*Atriplex hortensis* cv. „Rheinische“) nur kleine gelbe und lokal begrenzte Chlorosen identifiziert werden, während die Pflanzen, die mit dem BtMV Wildtyp inokuliert worden waren, schwere Symptome und eine starke Stauchung aufwiesen (Hasan, 2004).

Das rekombinante Plasmid pBIN+PVM_41 wurde schließlich dazu verwendet, die Sequenz des Kartoffelvirus M zu bestimmen.

4.4.1. Motive in der ermittelten PVM-Sequenz

Die vollständige Sequenz der cDNA Kopie des PVM innerhalb des rekombinanten binären Plasmids pBIN+PVM_41 wurde ermittelt und mit verschiedenen anderen bekannten PVM-Isolaten und weiteren vollständigen Sequenzen von Viren des Genus *Carlavirus* aus der Datenbank „GenBank“ verglichen. Erwartungsgemäß wies die Sequenz des in dieser Arbeit verwendeten Isolates die größten Identitäten mit den anderen bekannten PVM-Sequenzen auf, während es mit den anderen Carlaviren weiter entfernt verwandt war. Die größte Identität (94%) bestand zwischen der ermittelten Sequenz und der eines bekannten Isolates mit der Bezeichnung „Russian Wild“ (Bezeichnung: NC_001361). Wie für Viren des Genus *Carlavirus* üblich, konnten sechs ORFs in der Sequenz des PVM identifiziert werden, und in deren Aminosäuresequenzen typische Motive festgestellt werden. Beispielsweise konnten die im ORF1 typische Methyltransferase-, Helikase- und Polymerasemotive identifiziert werden (siehe Abb. 41, Anhang), wie aus den Arbeiten von Choi und Ryu (2003) und von Hataya *et al.* (2000) zu entnehmen ist. Dabei zeigte der Aminosäurevergleich nur geringfügige Abweichungen zu den von Choi und Ryu (2003) als konserviert beschriebenen Bereichen auf. So konnte im Helikasemotiv 6 eine Mutation von Arginin zu Serin und im Polymerasemotiv 5 zwei Mutationen (Glutaminsäure zu Phenylalanin und Serin zu Asparagin) beobachtet werden. Auch in den übrigen ORFs konnten für Carlaviren typische Aminosäuremotive festgestellt werden, wie das NTP-Bindungs- und Helikasemotiv „GKS“ im TGB1 (Abb. 42, Anhang), das „TGG“ Motiv im ORF5 (siehe Abb. 45 im Anhang) und das „Zink-Finger-Motiv“ im ORF6 (Abb. 46, Anhang).

Ebenso wurden auch auf Nukleotidebene nicht nur die Sequenzen der sechs ORFs identifiziert, sondern darüber hinaus auch weitere typische Motive festgestellt, wie etwa die konservierten Sequenzen der subgenomischen Promotoren, die des Translationsverstärkers vor dem Hüllproteingen, oder das Poly-A-Signal im viralen 3'-UTR Bereich (siehe Abb. 47 im Anhang).

4.5. Abschlussbetrachtung und Ausblick

Als Beitrag zur Erleichterung zukünftiger biologischer Sicherheitsbewertungen für Freisetzungen oder Inverkehrbringungen transgener Kartoffelvarianten wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhalten sechs im Kohlenhydratmetabolismus gentechnisch veränderter Fructankartoffelvarianten im Freisetzungsvorversuch (2001 bis 2004) gegenüber verschiedenen Pflanzenviren hin untersucht. Dabei lagen die zentralen Untersuchungsgegenstände in der Erfassung der Virusabundanz und Virusvariabilität in nicht-transgenen Kartoffeln und in ihrem Kohlenhydratmetabolismus gentechnisch veränderter Kartoffellinien sowie in der Evaluierung des Auftretens und der Auswirkungen von Rekombinationsereignissen in den Kartoffelviruspopulationen.

Das PVY nahm in den anbaubegleitenden Untersuchungen eine zentrale Rolle ein, denn es wurde alljährlich sowohl bei den Pflanzen aller Varianten auf den Freisetzungsfeldern, wie auch im Rahmen der serologischen Nacherntetests in nahezu allen Varianten als das am Häufigsten vorgefundene Virus identifiziert. Nur die Vergleichssorte Solara verhielt sich hiervon abweichend, da diese sich in den verschiedenen Untersuchungen entsprechend ihrer sortenbedingten sehr geringen Anfälligkeit gegenüber diesem Virus als frei von PVY Infektionen erwies. Im Rahmen der serologischen Nachernteuntersuchungen fiel über die Jahre betrachtet von allen transgenen Varianten nur die Linie Désirée SST#18 dadurch auf, dass diese mehrfach einen im Vergleich zu der nicht-transformierten Ausgangslinie feststellbaren niedrigeren PVY Befall aufwies. Aus pflanzenvirologischer Sicht stellt dieses jedoch kein erkennbares sicherheitsrelevantes Problem dar. Da die Ursache für die geringeren PVY Befallshäufigkeiten der Linie Désirée SST#18 in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden konnten, könnte dieses Gegenstand zukünftiger und in Gewächshäusern stattfindender Untersuchungen sein. Dabei könnte auch überprüft

4. Diskussion

werden, inwieweit die Pflanzen dieser transgenen Variante eine im Vergleich zur nicht-transformierten Ausgangslinie veränderte Attraktivität auf Blattläuse besitzen.

Die RFLP-Untersuchungen von insgesamt 642 Fragmenten aus dem PVY Hüllproteingenbereich zeigte, dass sich die transgenen Varianten in Bezug auf die PVY Stammverteilungen nicht von der nicht-transgenen Vergleichsvariante Désirée WT1 unterschieden. In all diesen Varianten konnten sowohl PVY^{NTN} als auch PVY^O nachgewiesen werden, wobei der überwiegende Teil der untersuchten Fragmente dem PVY^{NTN} angehörten. Durch die basengenaue Sequenzanalyse von insgesamt 56 PVY hüllproteingehaltenden Fragmenten konnte nur ein einziges identifiziert werden, welches sich deutlich von den übrigen abhob. Dieses muss aus einer Rekombination zwischen dem PVY^{NTN} und dem PVY^O hervorgegangen sein, da das Fragment Sequenzbereiche beider Stämme aufwies. Obwohl dieses Fragment aus der Gesamt-RNA einer PVY infizierten transgenen Kartoffelpflanze (Variante Désirée SST/FFT#22/34) amplifiziert werden konnte, gibt es andererseits keine erkennbaren Zusammenhänge zwischen dem Auffinden dieses rekombinanten PVY-Fragments und der transgenen Variante. In zukünftigen Untersuchungen könnte beispielsweise der Einfluss dieses rekombinanten Sequenzbereiches auf die Fitness eines bekannten PVY Isolates dadurch genauer untersucht werden, indem dieses Fragment mit dem entsprechenden hüllproteingehaltenden Bereich eines PVY Vollängenklons ausgetauscht, und die Fitness dieses so modifizierten Virus mit der des ursprünglichen durch Inokulationsversuche verglichen werden könnte. Andere Eigenschaften könnten sich durch eine veränderte Virusausbreitungsgeschwindigkeit oder der Ausprägung untypischer Symptome auf den Blättern dieser Pflanzen bemerkbar machen.

Bei weiteren freisetzungsunabhängigen Experimenten zur Rekombination von defekten Viren (PVX) in transgenen Tabakpflanzen zeigte sich, dass etwa die Hälfte der PVX-TGB1-Deletionsmutanten aufgrund von Komplementationsereignissen ihre systemischen Ausbreitungen in PVX-TGB1- transgenen *N. benthamiana* -Pflanzen wiedererlangen konnten. Im Einklang mit den Untersuchungen von Manske und Schiemann (2005) konnten keine Rekombinationsereignisse, die zu einer Rekonstitution des vollständigen Virusgenoms geführt hätten, gefunden werden. Deshalb könnten solche ausbreitungsdefekten Pflanzenviren zukünftig verstärkt als biologisch sicherere

Expressionsvektoren Verwendung finden, da das erwünschte Fremdprotein nur in solchen Pflanzen gebildet werden kann, die auch aufgrund ihres Transgens in der Lage sind, die Ausbreitung des modifizierten Virus zu komplementieren.

Weiterhin ist es in dieser Arbeit gelungen, vom Kartoffelvirus M in zwei Schritten eine vollständige cDNA herzustellen, welche sich unter der Kontrolle eines verdoppelten 35S CaMV-Promotors bei Agroinfiltration als infektiös erwies. Darüber hinaus konnte die vollständige PVM Sequenz bestimmt werden, und bei einer ersten Überprüfung konnten keine Unterschiede zwischen dem vom Volllängenklon abstammenden Virus im Vergleich zum PVM Wildtypen bezüglich des überprüften Wirtspflanzenspektrums festgestellt werden. Somit steht der PVM-Volllängenklon nun für zukünftige Studien zur Verfügung, die sich beispielsweise mit der Ausbreitung dieses Carlaviruses in der Pflanze beschäftigen könnten. Darüber hinaus kann dieser Volllängenklon auch dazu dienen, die Auswirkungen intermolekularer Rekombinationsereignisse mit anderen Viren, z.B. dem PVX in Labor und Gewächshausversuchen aufzudecken und zu bewerten. Des Weiteren könnte der Volllängenklon auch für Resistenzuntersuchungen neuer Kartoffelsorten eingesetzt werden.

5. Anhang

5.1. PVY Anfälligkeiten der verschiedenen Kartoffelsorten

Einstufung der PVY Anfälligkeiten nach der Beschreibenden Sortenliste des Bundessortenamtes 2002:

Agria	sehr gering bis gering
Désirée	sehr gering bis gering
Granola	gering
Linda	stark bis sehr stark
Solara	sehr gering

5.2. Sequenzen phylogenetische Stammbäume

5.2.1. Sequenz des mit Hilfe der Primer PVMXCPup und PVMXCPdown amplifizierten PVM Hüllproteinfragments

PVMXCPup

aaatctagagattcaacgaagaaagctgaaactgccaaagatgtgggcacttcgcaagaaaaga
gagaagcgcgaccattgcccactgctgcccactttgaggggaaggacacatcggagaacactga
tgggcgtgctgcagatggtgatggagagatgtcattggagcggaggcttgacagcctccgagaa
ttcctgagagagcggaggggcgcaattcgagtgacaaaccgggggtagagactggcaggccaa
ggttgcagctagctgaaaacatgcgcacctgatcccacgaatccgtacaacaggccatccataga
agctctcagccggatcaagccaatcgcgatctcaacaatatggccacatctgaggatatgatg
cgcatatatgtgaacctggaggggctaggggtgcccactgagcacgtgcagcaggtagtgattc
aggctgtgctattttgcaaggacgcaagcagctccgtattcctagatccgcgaggctcgttcga
gtggccaagaggtgctataactgcggatgccgtcttggtgtgctgaagaaggatgctgaaaca
ctacgaagggtgtgtaggctgtatgccccggtgacatggaatcatatgctgacgcacaacgcgc
ctccagccgactgggctgccatgggggttcagtatgaggatcgcttcgctgctttcgactgctt
tgattacgttgagaatactgctgcagctccaaccctagagggtgatcagggcagcctacccca
aggaaaagatagctcacaatacgcacaaagacatcgactgcgtggagcaaatcgcaatcagg
tgttcagctctctcaatgccgaggtcactggtggtatgaatggtccggaactcactagggtta
tggaaagtcgaatagaactcgagttt

PVMXCPdown

Abb. 34: Sequenz des mit Hilfe der Primer PVMXCPup und PVMXCPdown amplifizierten PVM Hüllproteinfragments

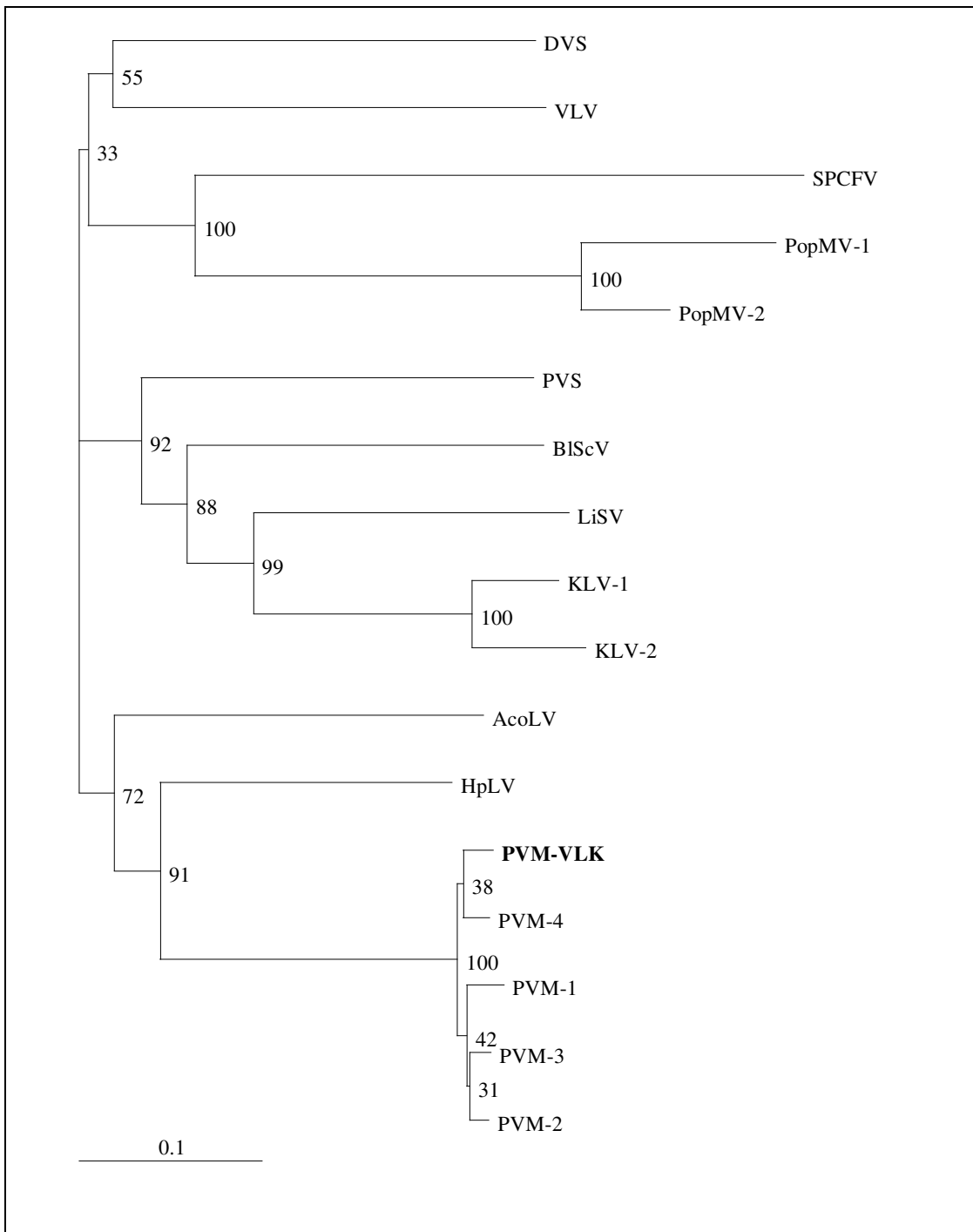


Abb. 36: Phylogenetischer Stammbaum des ORF2 (TGB1) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen

Die verwendeten Carlavirusisolate können aus Tabelle 23 entnommen werden.

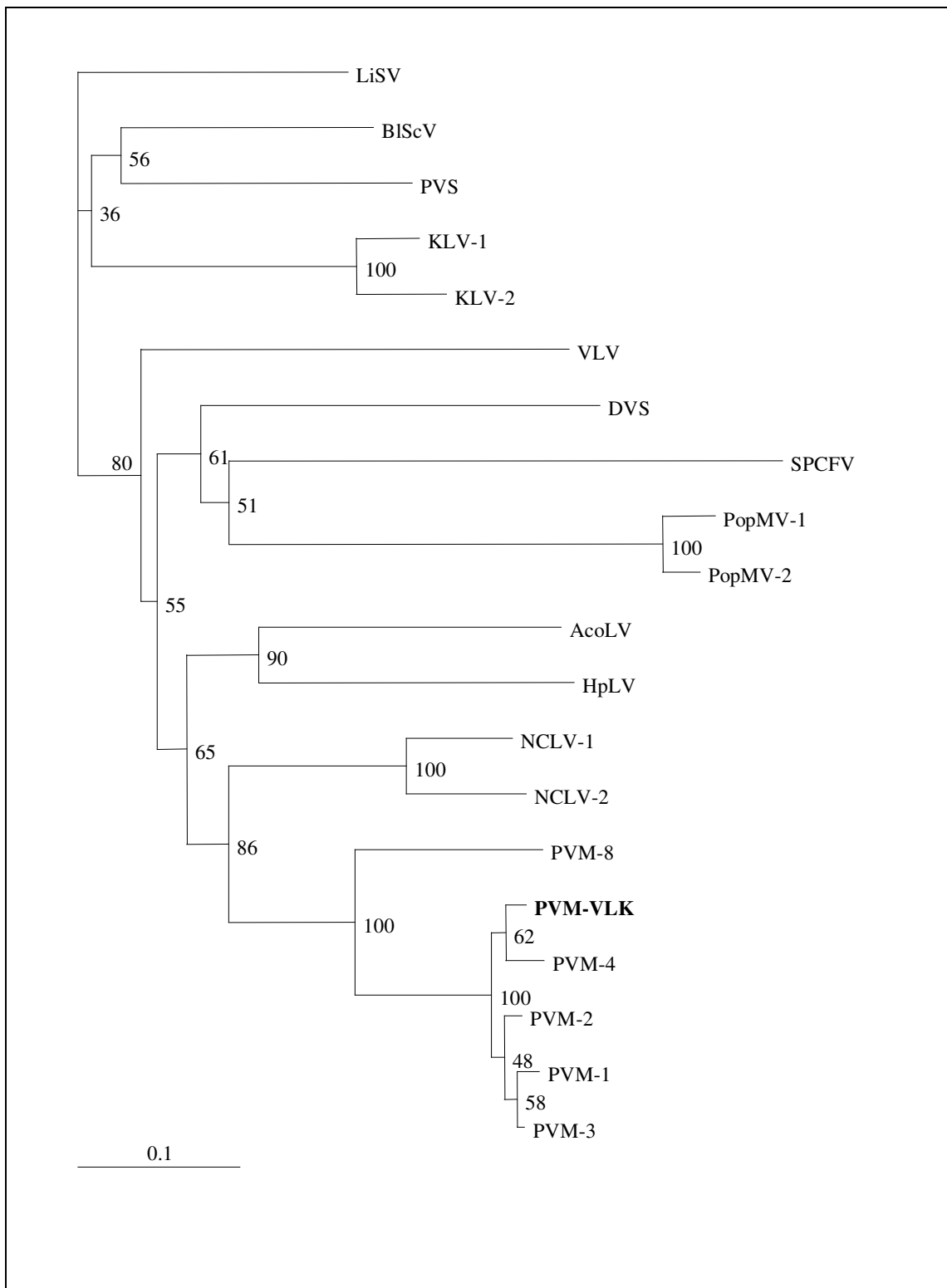


Abb. 37: Phylogenetischer Stammbaum des ORF3 (TGB2) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen

Die verwendeten Carlavirusisolate können aus Tabelle 23 entnommen werden.

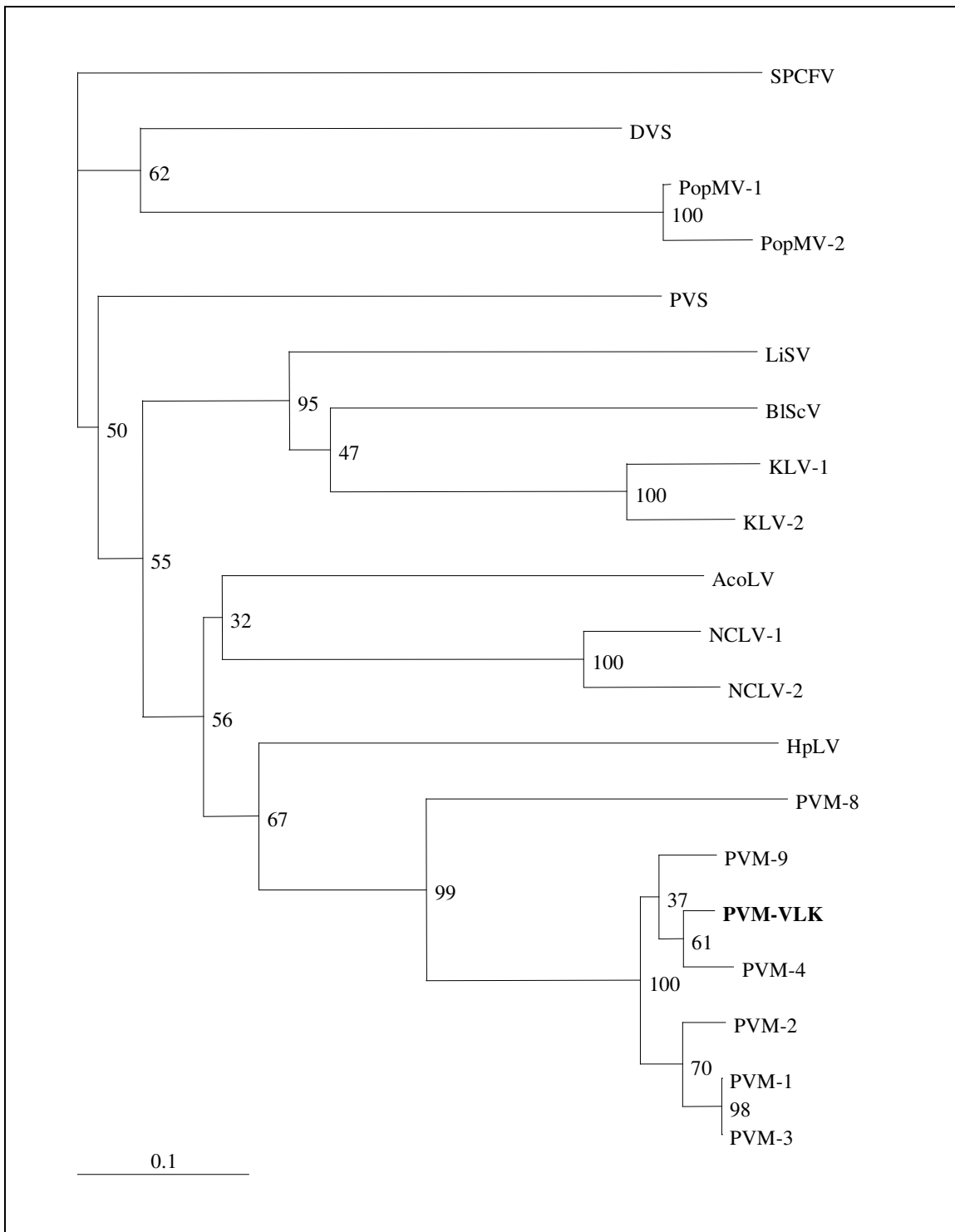


Abb. 38: Phylogenetischer Stammbaum des ORF4 (TGB3) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen

Die verwendeten Carlavirusisolate können aus Tabelle 23 entnommen werden.

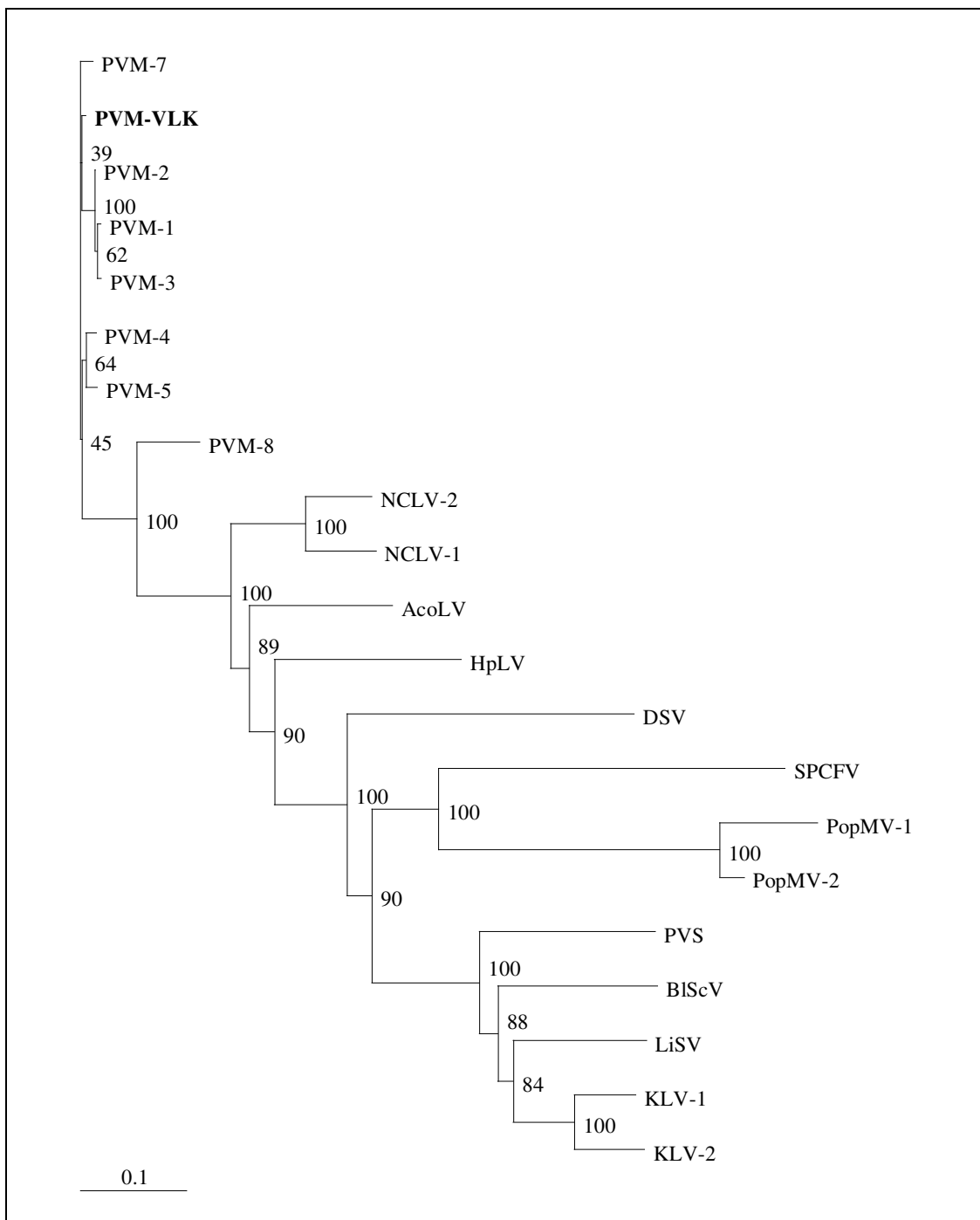


Abb. 39: Phylogenetischer Stammbaum des ORF5 (CP) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen

Die verwendeten Carlavirusisolate können aus Tabelle 23 entnommen werden.

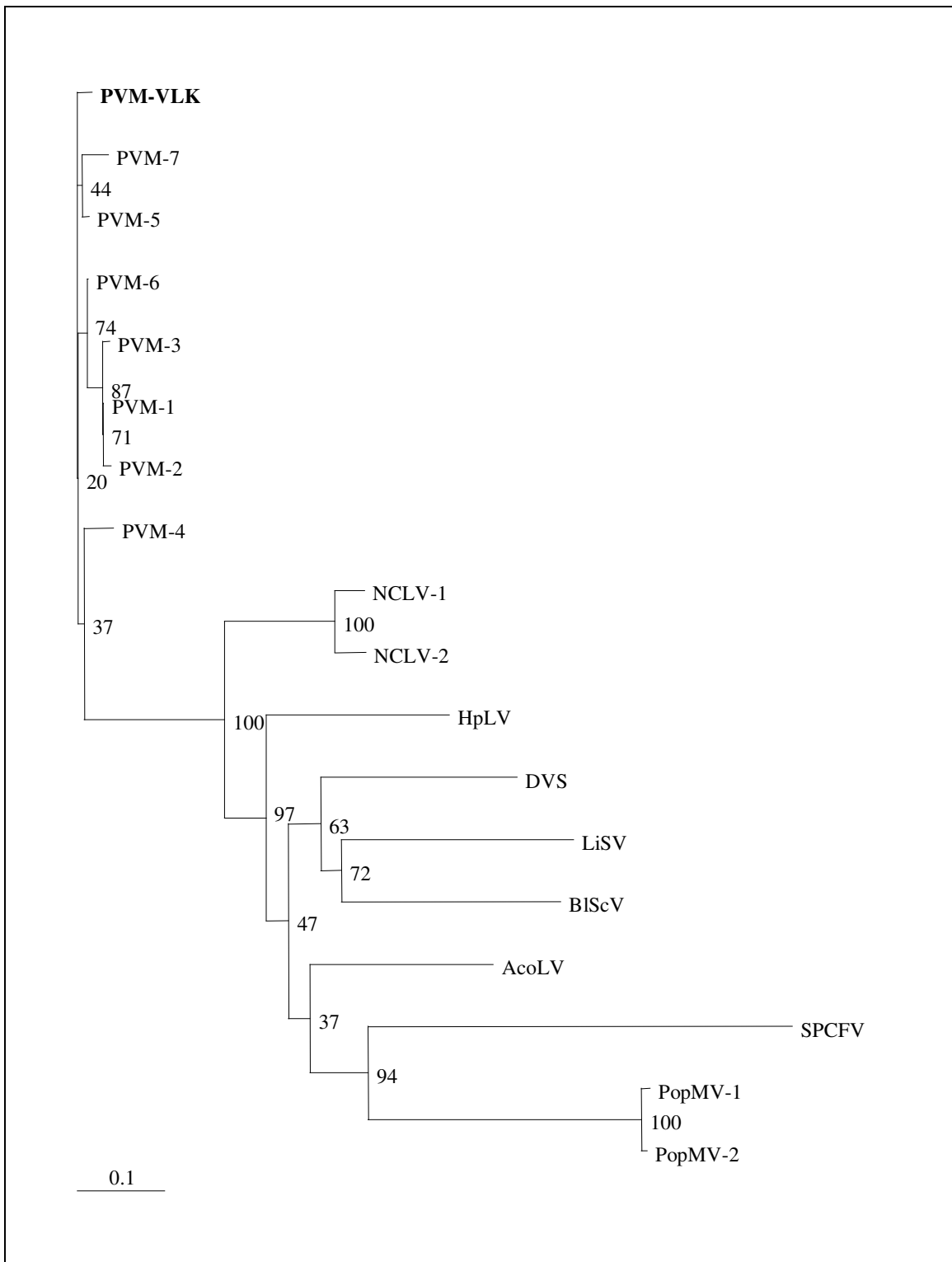


Abb. 40: Phylogenetischer Stammbaum des ORF6 (12K) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen

Die verwendeten Carlavirusisolate können aus Tabelle 23 entnommen werden.

5.2.3. Konserviert vorliegende Motive innerhalb des carlaviralen ORF1

Methyltransferasemotive (entnommen aus Choi und Ryu, 2003):

MTR-Motiv I: HSHP_xCKTLENY_xLY(_xV)
 MTR-Motiv II: VTSADRMR
 MTR-Motiv III: VQSEGYQQPLKGGYL

Helikasemotive (entnommen aus Choi und Ryu, 2003):

Hel-Motiv I: LHAIVGTFGSGKSTLFKN
 Hel-Motiv II: SLDFVSPRRALAEDF
 Hel-Motiv III: NYKVRSHRF
 Hel-Motiv V: AKVLTFGESTGLTFMHGTIYI
 Hel-Motiv VI: NERRWITALRRFRF

Helikasemotive (entnommen aus Hatayashi *et al.*, 2000)

HEL1: IVGTFQSGKSTLFKN
 HEL1A: AGKSLDFVSPRRALAEDF
 HEL2: VVILDEMQLYPPGYFDL
 HEL3: LFLVGDPAQSDYD
 HEL4: EYNYKVRSHRF
 HEL5: KVLTFGESTGLTFMHGTIYI
 HEL6: NERRWITALRRFRFN

Polymerasemotive (entnommen aus Choi und Ryu, 2003):

Pol-Motiv I: FSKSQLC
 Pol-Motiv II: AKAAQSIVCFQHAVLCRFAPYMRUYEMKVH
 Pol-Motiv III: HSGKGLEELDAWV
 Pol-Motiv IV: SDYEAFDASQD
 Pol-Motiv V: AIMRFSGEASTELFNTLANMLLFTFMRYN
 Pol-Motiv VI: ICFAGDDMCA
 Pol-Motiv VII: NKPTFCGWH
 Pol-Motiv VIII: LVLERMCIK

5.2.4. Aminosäuresequenzen der einzelnen PVM ORFs

```

1  MALTyrTPME DIVNCFEPAT QAVMANSAAT LYKNFEEQHC QYFNYYLSPL
                                     MTR1
51  AKRKLSMAGI YLSPYSAVVH SHPVCKTLEN YILYSVLPSY INSSFYFVGI
                                     MTR2
101  KERKLQLLKS KCKNLDVQV VNRyVTsADR MRyTNDfVPY GSYEHECLVH
151  KGVGLDNETL RGLVGPLRRH KARNLFLHDE LHYWSSKVLi DFLDVMRPDK
                                     MTR3
201  LLGTVVYPPE LLFKQTRSLN EWCYTYDIVG DTLMFFPDGV QSEGYQQPLK
251  GGYLLGARSL KLPDGTVMV DVLCskFAHH LVSITKGEAA APThRAFgPF
301  EAVASEALTA LSPDYPVCFP VSyEVVNkiY RYLRTLKKPD EQSAIAKLSQ
351  IIAEPsGREI DFVECFARLV IHNSsMCATI MPEQLKEFMG NWLGKMPsVL
401  ARRFSSVRAV CVNKfIRGLK PYSfTLRLNE ITWwNIWDNS YTWFFDtdAE
451  VDVPEKLDsL FMGEGACIVA HTTSRPyVGT VPLADREWNA LLCMDsQKLL
501  HAMRRMFMRG AWGPHMRVIS RGYLLKfVEA RLKSSCLIAK ARRRGQHKEK
551  LEAWEVLGLK STDALFRAMT YLCNARLEPM FSESGLRWFL TRGRNNLYGL
601  TNYTEGKHAV TEVQnQWSNV VHEVSTERHK SMIRLEKVRV TEQPRSEFTS
651  CVLEPEVLRN VEAALEIEld EVACACGARF VQGVVLSNQA GLNVREQVAG
701  ASVGLYTKDR SNLKWGNSEL LSNGWPRSLs IWMEVNSVCQ KFDVAVRLSY
751  SKEIQMNvLL PSLDGIERGA GATVVNLrKC GAFIVRCAEG GDCAGVDGPH
801  LLEVmqDCI GHECYMKGLE RENDVVVfLK KNTVSEQvAF ESAQEVsPIE
851  SKSDSGAPGV GVNLDLGGVV CSEYPASSAE RYKRVSVPGD GSCFWHsVAY
901  LVGMHhMELK RLCTSHVFEN AALNDELEQC RAPGAFVTHA AILATALRLR
951  AEIRVhNAGT GRVHRfAPKQ KNMALDLWLE SEHYEPQvLR NGCVIESVAL
1001  ALGRRNADIL AVVEERCCEE VVESVQAGLg LNLHhVEIVL RCFDIVGHcN

```

Abb. 41: Aminosäuresequenz des PVM-ORF1

Bemerkung: die für Viren des Genus *Carlavirus* konserviert vorliegenden Motive wurden dick markiert, und deren Funktionen über die hervorgehobene Sequenz geschrieben (verändert nach Choi und Ryu (2003) und Hataya *et al.* (2000).

Legende: MTR = Methyltransferasemotiv; Hel = Helikasemotiv; Pol = Polymerasemotiv

NTP-Bindungs/Helikasemotiv

1 MDVIVDLLLYK YKFERLSNKL VYPIVVHCVP **GAGKS**SLIRE LLELDSRFCA
51 YTAGVEDQPR LSGNWIRKWS GQQPEGKFVV LDEYTLLEEV PPVFALFGDP
101 IQSNTIAVQR ADFVCSVSRR FGSATCGLLQ ELGWNVQSEK ADLVQVSDIY
151 TKEPLGKVVV FEEEVGCLLR SHGVEALSLO EITGQTFEVV TFBTSENSPV
201 INRAAAYQCM TRHRTALYIL CPDATYTAA

Abb. 42: Aminosäuresequenz des PVM-ORF2 (TGBp1)

1 **MPLTPP**PDFET KVYLSAALGV SLALVVWLLT RST**LPVVGDR** **DHNLPHGGWY**
51 **RDGTK**SVFYV SPGRLNISIEA RKAPLLGQPW AIVVLLVLLI WASHKLGRPS
101 CRACGGSHV

Abb. 43: Aminosäuresequenz des PVM-ORF3 (TGBp2)

Konservierte Regionen hervorgehoben (nach Smith und Campbell, 2004)

1 MIVYVLVGLS AFCIVLYLIS QQQSDCVVLI TGESVRVQGC QINSEFGSVL
51 SKLKPFGCGS FRS

Abb. 44: Aminosäuresequenz des PVM-ORF4 (TGBp3):

1 VSMGDSTKKA ETAKDVGTSQ EKREARPLPT AADFEGKDTS ENTDGRAADV
51 DGEMSLERRL DSLREFLRER RGAIRVTNPG LETGRPRLQL AENMRPDPTN
101 PYNRPSIEAL SRIKPIAISN NMATSEMMR IYVNLEGLGV PTEHVQQVVI
151 QAVLFCKDAS SSVFLDPRGS FEWPRGATA DAVLAVLKKD AETLRRVCRL
201 YAPVTWNHML THNAPPADWA AMGFQYEDRF AAFDCFYDVE NTAAVQPLEG
251 LIRRPTPREK IAHNTHKDIA LRGANRNQVF SSLNAEV**TGG** M**NG**PELTRDY
301 GKSNRK

Abb. 45: Aminosäuresequenz des PVM-ORF5 (CP)

Basische Region

```

1  MKYVTKVALL IARAMCTSSG TFVFELAFSI AECAGRPLGG GRSKYARRRR
   Zink-Finger-Motiv
51  AISIARCHRC YRLWPPTVFT TRCDNKHCVP GISYNVRVAQ FIDEGVTEVI

101  PSVINKQE

```

Abb. 46: Aminosäuresequenz des PVM-ORF6

5.2.5. Nukleotidsequenz des PVM

```

              Primer  PVM1s
=====
      AscI
      ~~~~~
1  ATGGCGCGCC GGATAAAACA ACATACAATA TCTGAACTTA CACCACAATA
   TACCGCGCGG CCTATTTGTT TGTATGTTAT AGACTTGAAT GTGGTGTTAT

51  TACTACCAGG AAATACTATA TTCGGTCTAA GTCAACATGG CACTCACATA
   ATGATGGTCC TTTATGATAT AAGCCAGATT CAGTTGTACC GTGAGTGTAT

101  CAGAACGCCA ATGGAAGATA TTGTAAATTG CTTTCGAGCCA GCAACTCAGG
   GTCTTGCGGT TACCTTCTAT AACATTTAAC GAAGCTCGGT CGTTGAGTCC

151  CTGTGATGGC TAATAGCGCT GCTACCCTGT ACAAGAACTT CGAGGAGCAA
   GACTACTACCG ATTATCGCGA CGATGGGACA TGTTCCTTGAA GCTCCTCGTT

201  CACTGCCAAT ACTTTAATTA CTACCTTTCG CCTTTGGCTA AAAGGAAATT
   GTGACGGTTA TGAAATTAAT GATGGAAAGC GGAAACCGAT TTCCTTTAA

251  GAGCATGGCA GGCATATACT TGAGTCCGTA CTCGGCAGTC GTGCATTTCGC
   CTCGTACCGT CCGTATATGA ACTCAGGCAT GAGCCGTCAG CACGTAAGCG

301  ATCCGGTTTG TAAGACGCTG GAAAATTACA TATTGTATAG TGTCTTACCT
   TAGGCCAAAC ATTCTGCGAC CTTTTAATGT ATAACATATC ACAGAATGGA

351  TCTTACATAA ATTCTAGCTT TTA
```

Abb. 47: Nukleotidsequenz des PVM Fragments und Angabe der Primer PVM1s und PVM3as

Anhang

501 CCATATGGCT CATATGAGCA TGAATGCCTG GTGCACAAAG GAGTTGGTCT
GGTATAACCGA GTATACTCGT ACTTACGGAC CACGTGTTTC CTCAACCAGA

551 GGACAACGAA ACGCTCAGAG GACTAGTAGG TCCACTAAGG CGTCACAAAG
CCTGTTGCTT TGCGAGTCTC CTGATCATCC AGGTGATTCC GCAGTGTTTC

601 CTAGAAACCT ATTCCTTCAT GATGAGTTGC ATTACTGGAG TAGTAAGGTG
GATCTTTGGA TAAGGAAGTA CTACTIONAACG TAATGACCTC ATCATTCCAC

651 CTTATTGACT TCTTAGACGT CATGCGTCCA GATAAGCTAC TTGGTACTGT
GAATAACTGA AGAATCTGCA GTACGCAGGT CTATTGATG AACCATGACA

701 TGTGTACCCC CCAGAATTAC TATTCAAGCA AACACGTAGC TTGAATGAGT
ACACATGGGG GGTCTTAATG ATAAGTTCGT TTGTGCATCG AACTTACTCA

751 GGTGCTACAC TTATGATATA GTGGGGGACA CGCTGATGTT TTTCCCTGAT
CCACGATGTG AATACTATAT CACCCCCTGT GCGACTACAA AAAGGGACTA

801 GCGTGCAGG GCGAGGGTTA TCAGCAGCCA TTAAAGGGTG GTTACTTACT
CCGCACGTCT CGCTCCCAAT AGTCGTCGGT AATTTCCAC CAATGAATGA

851 GGGGGCAAGG AGTTTGAAAT TGCCGGACGG CACAGTGTAC ATGGTTGATG
CCCCGTTCC TCAAACTTTA ACGGCCTGCC GTGTCACATG TACCAACTAC

901 TGCTGTGCAG CAAATTTGCC CACCATTTGG TTTCGATAAC AAAAGGCGAA
ACGACACGTC GTTTAAACGG GTGGTAAACC AAAGCTATTG TTTTCCGCTT

951 GCCGCAGCGC CGACGCATCG TGCGTTCGGC CCATTTGAGG CGGTTGCATC
CGGCGTCGCG GCTGCGTAGC ACGCAAGCCG GGTAACCTCC GCCAACGTAG

1001 GGAAGCTTTG ACAGCTCTTA GTCCTGATTA CCCGGTGTGC TTTCCCGTTA
CCTTCGAAAC TGTCGAGAAT CAGGACTAAT GGGCCACACG AAAGGGCAAT

1051 GCTATGAGGT GGTTAACAAG ATCTACAGGT ACTTACGTAC ACTGAAGAAA
CGATACTCCA CCAATTGTTC TAGATGTCCA TGAATGCATG TGACTTCTTT

1101 CCCGATGAGC AGTCCGCCAT AGCAAAGCTA AGCCAAATAA TCGCTGAGCC
GGGCTACTCG TCAGGCGGTA TCGTTTCGAT TCGGTTTATT AGCGACTCGG

1151 GTCCGGGAGG GAAATTGATT TCGTGGAGTG CTTTCGCGCGG CTGGTGATTC
CAGGCCCTCC CTTTAACTAA AGCACCTCAC GAAGCGCGCC GACCACTAAG

1201 ACAATTCTAG CATGTGCGCC ACAATCATGC CAGAGCAACT GAAAGAATTC
TGTTAAGATC GTACACGCGG TGTTAGTACG GTCTCGTTGA CTTTCTTAAG

1251 ATGGGGAACCT GGCTCGGAAA GATGCCTTCA GTGCTGGCAC GTCGCTTTAG
TACCCCTTGA CCGAGCCTTT CTACGGAAGT CACGACCGTG CAGCGAAATC

(Fortsetzung der Abbildung 47)

1301	TAGTGTTAGA ATCACAATCT	GCTGTATGTG CGACATACAC	TGAACAAATT ACTTGTTTAA	CATCCGGGGC GTAGGCCCCG	CTAAAACCAT GATTTTGGTA
1351	ACAGCTTCAC TGTCGAAGTG	TCTGCGTTTG AGACGCAAAC	AATGAGATAA TTACTCTATT	CCTGGTGGAA GGACCACCTT	CATTTGGGAT GTAAACCCTA
1401	AACAGTTACA TTGTCAATGT	CCTGGTTCTT GGACCAAGAA	TGATACAGAT ACTATGTCTA	GCTGAGGTCG CGACTCCAGC	ACGTACCAGA TGCATGGTCT
1451	AAAATTGGAC TTTTAACCTG	TCTCTGTTCA AGAGACAAGT	TGGGAGAAGG ACCCTCTTCC	TGCATGCATT ACGTACGTAA	GTTGCACACA CAACGTGTGT
1501	CCACCTCTAG GGTGGAGATC	GCCCTATGTA CGGGATACAT	GGTACAGTCC CCATGTCAGG	CGTTAGCAGA GCAATCGTCT	CCGGGAGTGG GGCCCTCACC
1551	AATGCCCTGC TTACGGGACG	TGTGCATGGA ACACGTACCT	CTCGCAGAAG GAGCGTCTTC	TTGTTGCACG AACAACTGTC	CGATGAGGCG GCTACTCCGC
1601	TATGTTCATG ATACAAGTAC	AGAGGCGCTT TCTCCGCGAA	GGGGCCGCA CCCCCGGCGT	CATGCGCGTC GTACGCGCAG	ATCTCCAGGG TAGAGGTCCC
1651	GGTACTTGCT CCATGAACGA	CAAATTTGTG GTTTAAACAC	GAGGCAAGGC CTCCGTTCCG	TGAAATCAAG ACTTTAGTTC	CTGCTTAATT GACGAATTAA
1701	GCAAAGGCC CGTTTCCGGG	GAAGAAGGGG CTTCTTCCCC	TCAACATAAA AGTTGTATTT	GAGAAGCTTG CTCTTCGAAC	AGGCATGGGA TCCGTACCCT
1751	AGTTCTGGGG TCAAGACCCC	CTGAAGAGCA GACTTCTCGT	CAGATGCACT GTCTACGTGA	ATTTAGGGCC TAAATCCCGG	ATGACGTACC TACTGCATGG
1801	TGTGCAACGC ACACGTTGCG	AAGATTGGAG TTCTAACCTC	CCCATGTTCT GGGTACAAGA	CTGAGTCAGG GACTCAGTCC	CCTGAGATGG GGACTCTACC
1851	TTCTTAACGC AAGAATTGCG	GCGGAAGGAA CGCCTTCCTT	TAATCTGTAC ATTAGACATG	GGCCTCACCA CCGGAGTGGT	ATTATACAGA TAATATGTCT
1901	GGGAAAGCAT CCTTTTCGTA	GCTGTAAC TG CGACATTGAC	AGGTGCAGAA TCCACGTCTT	CCAATGGAGC GGTTACCTCG	AATGTGGTGC TTACACCACG
1951	ATGAGGTGAG TACTCCACTC	TACCGAGCGG ATGGCTCGCC	CACAAAAGCA GTGTTTTTCGT	TGATAAGGCT ACTATTCCGA	AGAGAAGGTC TCTCTTCCAG
2001	CGAGTCACAG GCTCAGTGTC	AGCAGCCCAG TCGTCCGGTC	AAGTGAGTTC TTCACTCAAG	ACAAGCTGTG TGTTTCGACAC	TGTTAGAGCC ACAATCTCGG
2051	CGAGGTATTG GCTCCATAAC	CGCAATGTGG GCGTTACACC	AAGCTGCGCT TTCGACGCGA	CGAAATCGAA GCTTTAGCTT	TTGGACGAAG AACCTGCTTC

(Fortsetzung der Abbildung 47)

Anhang

2101	TTGCTTGTGC AACGAACACG	TTGCGGCGCA AACGCCGCGT	CGATTTCGTGC GCTAAGCACG	AAGGGGTGGT TTCCCCACCA	ACTGAGCAAT TGACTCGTTA
2151	CAGGCTGGTC GTCCGACCAG	TCAATGTCCG AGTTACAGGC	TGAGCAAGTT ACTCGTTCAA	GCAGGTGCCT CGTCCACGGA	CTGTGGGGCT GACACCCCGA
2201	GTACACGAAG CATGTGCTTC	GATAGAAGCA CTATCTTCGT	ATTTGAAGTG TAAACTTCAC	GGGCAACAGT CCCGTTGTCA	GAGCTGCTTA CTCGACGAAT
2251	GCAATGGTTG CGTTACCAAC	GCCGAGGAGC CGGCTCCTCG	TTGAGCATCT AACTCGTAGA	GGATGGAGGT CCTACCTCCA	TAACTCCGTG ATTGAGGCAC
2301	TGCCAAAAAT ACGGTTTTTA	TTGATGTTGC AACTACAACG	CGTGCGTCTG GCACGCAGAC	AGTTACAGCA TCAATGTCTG	AGGAGATTCA TCCTCTAAGT
2351	GATGAACGTG CTACTTGAC	CTGCTGCCAA GACGACGGTT	GCCTTGATGG CGGAACTACC	AATAGAACGG TTATCTTGCC	GGCGCGGGCG CCGCGCCCGC
2401	CAACAGTGGT GTTGTCACCA	TAATCTGCGG ATTAGACGCC	AAGTGTGGTG TTCACACCAC	CATTCATTGT GTAAGTAACA	AAGGTGCGCT TTCCACGCGA
2451	GAGGGTGGAG CTCCACCTC	ACTGCGCTGG TGACGCGACC	CGTGGATGGA GCACCTACCT	CCACATTTGT GGTGTAACA	TGGAGGTGAT ACCTCCACTA
2501	GGGCCAAGAT CCCGTTTCTA	TGCATAGGTC ACGTATCCAG	ATGAATGCTA TACTTACGAT	TATGAAGGGT ATACTTCCCA	CTTGAGCGCG GAACTCGCGC
2551	AAAATGATGT TTTTACTACA	TGTGGTTTTTC ACACCAAAG	CTGAAAAAAA GACTTTTTTT	ACACTGTTTC TGTGACAAAG	TGAGCAGGTG ACTCGTCCAC
2601	GCTTTCGAGA CGAAAGCTCT	GTGCACAGGA CACGTGTCCT	GGTGAGCCCC CCACTCGGGG	ATTGAGAGTA TAACTCTCAT	AGAGTGATTC TCTACTAAG
2651	GGGGGCACCA CCCCGTGGT	GGAGTTGGAG CCTCAACCTC	TGAACCTCGA ACTTGGAGCT	CTTGGGTGGG GAACCCACCC	GTCGTCTGCA CAGCAGACGT
2701	GCGAGTACCC CGTTCATGGG	CGCAAGTAGT GCGTTCATCA	GCTGAGCGAT CGACTCGCTA	ATAAGCGGGT TATTCGCCCA	GTCTGTGCCC CAGACACGGG
2751	GGTGATGGTT CCACTACCAA	CCTGTTTCTG GGACAAAGAC	GCACAGTGTT CGTGTACAAA	GCATACCTAG CGTATGGATC	TTGGCATGCA AACCGTACGT
2801	TCACATGGAG AGTGTACCTC	TTGAAGCGGT AACTTCGCCA	TGTGCACGTC ACACGTGCAG	TCACGTTTTT AGTGCAAAAA	GAAAATGCCG CTTTTACGGC
2851	CACTCAATGA GTGAGTTACT	TGAGCTTGAG ACTCGAACTC	CAGTGCAGGG GTCACGTCCC	CACCAGGCGC GTGGTCCGCG	ATTCGTCACA TAAGCAGTGT
2901	CATGCCGCCA GTACGGCGGT	TACTGGCTAC ATGACCGATG	GGCTTTGAGA CCGAAACTCT	CTCAGAGCTG GAGTCTCGAC	AAATTAGAGT TTAATCTCA

(Fortsetzung der Abbildung 47)

2951	GCACAACGCT CGTGTTGCGA	GGTACAGGTA CCATGTCCAT	GAGTTCATCG CTCAAGTAGC	TTTTGCTCCC AAAACGAGGG	AAGCAGAAGA TTCGTCTTCT
3001	ACATGGCACT TGTACCGTGA	TGATTTGTGG ACTAAACACC	CTCGAGTCGG GAGCTCAGCC	AGCACTATGA TCGTGATACT	ACCACAGGTA TGGTGTCCAT
3051	CTCCGCAATG GAGGCGTTAC	GTTGCGTAAT CAACGCATTA	TGAATCCGTG ACTTAGGCAC	GCACTGGCAC CGTGACCGTG	TGGGCAGGCG ACCCGTCCGC
3101	GAATGCAGAT CTTACGTCTA	ATCCTGGCTG TAGGACCGAC	TTGTAGAAGA AACATCTTCT	GCGATGCTGT CGCTACGACA	GAGGAGGTTG CTCCTCCAAC
3151	TTGAAAGCGT AACTTTGCGA	GCAAGCTGGT CGTTCGACCA	CTTGGTCTAA GAACCAGATT	ATCTGCATCA TAGACGTAGT	TGTGGAGATT ACACCTCTAA
3201	GTGCTACGAT CACGATGCTA	GCTTTGATAT CGAAACTATA	TGTGGGGCAT ACACCCCGTA	TGCAACTTAG ACGTTGAATC	GGGATAAAGA CCCTATTTCT
3251	GATCACGCTT CTAGTGCGAA	AATGCTGGTG TTACGACCAC	GCAAAATGTC CGTTTTACAG	TTTCTGCTTC AAAGACGAAG	GATATCTCTG CTATAGAGAC
3301	ATGAGCATAT TACTCGTATA	GAGTTTCTGC CTCAAAGACG	GGACGACGCA CCTGCTGCGT	AAGACCCAG TTCTGGGGTC	CTGCAAGCTG GACGTTGCGAC
3351	GTGAGTGGTG CACTCACCAC	CATTGCATGG GTAACGTACC	CAAAATGTTT GTTTTACAAA	GCCGAATCTG CGGCTTAGAC	CGTTGTTAGA GCAACAATCT
3401	TCTGGAGAAC AGACCTCTTG	TGCGGCTTAA ACGCCGAATT	AAATAGACTT TTTATCTGAA	CGAACCAAAT GCTTGTTTTA	TGGAATCGCG ACCTTAGCGC
3451	CAGGAATGCT GTCCTTACGA	CGCAGATAGC GCGTCTATCG	ATGCATCAAG TACGTAGTTC	GAGCCACAGG CTCGGTGTCC	AGTTTTGGGT TCAAAACCCA
3501	TCTGCACTCT AGACGTGAGA	TCAACAATAA AGTTGTTATT	GCGAAATATG CGCTTTATAC	CGTGAGAAAT GCACTCTTTA	TCGTGCGTGA AGCACGCACT
3551	CACAGCTTTG GTGTCGAAAC	AGCTTGCATG TCGAACGTAC	CAATAGTGGG GTTATCACCC	TACTTTTGGC ATGAAAACCG	TCTGGAAAGA AGACCTTTCT
3601	GTACGCTGTT CATGCGACAA	CAAGAATCTA GTTCTTAGAT	CTGAAACATG GACTTTGTAC	GTGCTGGCAA CACGACCGTT	ATCGCTGGAC TAGCGACCTG
3651	TTCGTATCAC AAGCATAGTG	CGAGGCGCGC GCTCCGCGCG	ATTGGCTGAA TAACCGACTT	GACTTCAAGC CTGAAGTTTCG	GTACAGTTGG CATGTCAACC
3701	GATGAACGAG CTACTTGCTC	CGTGGCGGGA GCACCGCCCT	GAGCTAAAGC CTCGATTTTCG	GGGGCAAGAG CCCCGTTTCTC	AACTGGAGAG TTGACCTCTC

(Fortsetzung der Abbildung 47)

Anhang

3751	TCACCACGTT AGTGGTGCAA	GGAGACATTC CCTCTGTAAG	CTAGCAAGAG GATCGTTCTC	TGGAATTCCT ACCTTAAGGA	GACGGAGGGG CTGCCTCCCC
3801	CAGGTGGTCA GTCCACCAGT	TTTTGGACGA AAAACCTGCT	GATGCAGCTG CTACGTCGAC	TATCCACCTG ATAGGTGGAC	GGTACTTTGA CCATGAAACT
3851	CCTAGTTGTG GGATCAACAC	AGTATGCTTA TCATACGAAT	AAGTGGATGT TTCACCTACA	GAGGCTTTTC CTCCGAAAAG	CTTGTGGGCG GAACACCCGC
3901	ATCCTGCACA TAGGACGTGT	AAGCGACTAT TTCGCTGATA	GACAGCGAGA CTGTGCTCT	AAGATAGATT TTCTATCTAA	GGTGCTGGGA CCACGACCCT
3951	GCCATGGAGG CGGTACCTCC	AGAATATGAG TCTTATACTC	CGTCATACTT GCAGTATGAA	GGGGCACGCG CCCCGTGCGC	AATACAATTA TTATGTTAAT
4001	CAAAGTGCGA GTTTCACGCT	AGTCATCGGT TCAGTAGCCA	TTTTGAATTG AAAACCTAAC	CAATTTCATA GTTAAAGTAT	GGGAGACTTC CCCTCTGAAG
4051	CATGTGAAAT GTACACTTTA	AAATAAAGAT TTTATTTCTA	GATTGCACGA CTAACGTGCT	TTGATGAGCC AACTACTCGG	TCACATTATG AGTGTAATAC
4101	CGCATGCACC GCGTACGTGG	TTGAGAATCT AACTCTTAGA	TCTGGATGTA AGACCTACAT	GCAGAGGAGT CGTCTCCTCA	ATAAATCTGT TATTTAGACA
4151	GGTGCTCGTA CCACGAGCAT	AGCTCCTTTG TCGAGGAAAC	ACGAGAAAAT TGCTCTTTTA	GGTAGTATGC CCATCATACG	GCGCATCTCC CGCGTAGAGG
4201	CGGAGGCGAA GCCTCCGCTT	AGTGCTCACT TCACGAGTGA	TTTGGAGAAA AAACCTCTTT	GTACGGGATT CATGCCCTAA	AACTTTCATG TTGAAAGTAC
4251	CATGGCACAA GTACCGTGTT	TTTACATCTC AAATGTAGAG	CGCAGTGTC GCGTCACAGT	GAGAGGACTA CTCTCCTGAT	ATGAGCGAAG TACTCGCTTC
4301	ATGGATAACT TACCTATTGA	GCTCTCAGTC CGAGAGTCAG	GGTTTCGCTT CCAAAGCGAA	CAATTTGTGC GTTAAACACG	TTTGTGAATT AAACACTTAA
4351	GTAGCGGAAT CATCGCCTTA	GGATTATCAG CCTAATAGTC	CAGTTGGCAG GTCAACCGTC	GGAGGTACAA CCTCCATGTT	AGGTTCGAGTG TCCAGCTCAC
4401	CTTTCTAAAT GAAAGATTTA	TCTTGTGCAA AGAACACGTT	AACTGCGATT TTGACGCTAA	CCTGATGATC GGACTACTAG	TAATTGGCAT ATTAACCGTA
4451	GCTGCCAGGC CGACGGTCCG	AAAGCGCTCT TTTCGCGAGA	TCAAGAGTGA AGTTCTCACT	GTACCCGCGA CATGGGCGCT	TTGATTGGTA AACTAACCAT
4501	AAGATGAGGG TTCTACTCCC	TGTTAGAGAA ACAATCTCTT	GAGAAGCTTG CTCTTCGAAC	CAGGCGATCC GTCCGCTAGG	ATGGCTCAAG TACCGAGTTC
4551	ACAATGATCA TGTTACTAGT	ATTTGTATCA TAAACATAGT	GGCACCAGAT CCGTGGTCTA	GTGGAAATTG CACCTTTAAC	CTGAAGAGCC GACTTCTCGG

(Fortsetzung der Abbildung 47)

4601	AGAAGTGGTG TCTTCACCAC	ATGCAGGAGG TACGTCCTCC	AATGGTTTCG TTACCAAAGC	CACACATTTG GTGTGTAAAC	CCGCGTGATG GGCGCACTAC
4651	AGTTGGAGAG TCAACCTCTC	CGTTAGAGCA GCAATCTCGT	CAATGGGTCC GTTACCCAGG	ACAAGATACT TGTTCTATGA	AGCTAAGGAG TCGATTCCCTC
4701	TACAGAGAGG ATGTCTCTCC	TGCGCATGGG ACGCGTACCC	GGATATGGTG CCTATAACCAC	TCAGAACAAT AGTCTTGTTA	TCACTGACGA AGTGACTGCT
4751	TCACACCAAA AGTGTGGTTT	CAACTGGGTG GTTGACCCAC	CGAAGCAACT GCTTCGTTGA	CACAAATGCT GTGTTTACGA	GCTGAGAGAT CGACTCTCTA
4801	TCGAGACCAT AGCTCTGGTA	ATACCCCAGG TATGGGGTCC	CATAGGGCTA GTATCCCGAT	GTGATACCGT CACTATGGCA	CACTTTCCTA GTGAAAGGAT
4851	ATGGCTGTGA TACCGACACT	AGAAAAGATT TCTTTTCTAA	GAGCTTCTCC CTCGAAGAGG	AACCCTGGGA TTGGGACCCT	AGGAAAAGGG TCCTTTTCCC
4901	AAAGTTGTTC TTTCAACAAG	CATGCAGCCA GTACGTCGGT	GCTATGGTAA CGATAACCATT	AGCATTGCTA TCGTAACGAT	TCAGAGTTCC AGTCTCAAGG
4951	TCAAGCGTGT AGTTCGCACA	GCCGCTAAAG CGGCGATTTT	CCGAACCACA GGCTTGGTGT	ATGTGCGGTT TACACGCCAA	TATGGAGGAA ATACCTCCTT
5001	GCACTGTGGA CGTGACACCT	ACTTCGAAGA TGAAGCTTCT	GAAGAAGCTG CTTCTTCGAC	AGCAAAAAGTG TCGTTTTTAC	CTGCCACAAT GACGGTGTTA
5051	TGAGAATCAC ACTCTTAGTG	TCTGGACGCT AGACCTGCGA	CATGCCGGGA GTACGGCCCT	TTGGCCTACA AACCGGATGT	GATGTGGCCC CTACACCGGG
5101	AGATTTTCTC TCTAAAAGAG	AAAAAGTCAG TTTTTCAGTC	TTATGCACCA AATACGTGGT	AATTTCGACAA TTAAGCTGTT	TAGGTTCAGG ATCCAAGTCC
5151	GTTGCTAAAG CAACGATTTT	CAGCGCAGAG GTCGCGTCTC	TATCGTGTGT ATAGCACACA	TTTCAACATG AAAGTTGTAC	CGGTCTTGTTG GCCAGAACAC
5201	CCGTTTTGCA GGCAAAACGT	CCCTACATGC GGGATGTACG	GGTACATTGA CCATGTAACT	GATGAAAGTG CTACTTTCAC	CATGAGGTGC GTACTCCACG
5251	TGCCGAAGAA ACGGCTTCTT	TTACTACATC AATGATGTAG	CACTCGGGGA GTGAGCCCCT	AGGGTCTGGA TCCCAGACCT	AGAACTGGAT TCTTGACCTA
5301	GCGTGGGTCA CGCACCCAGT	AGAAGGGAAA TCTTCCCTTT	GTTTGACGGG CAAAC TGCC	ATTTGCACGG TAAACGTGCC	AGTCAGATTA TCAGTCTAAT
5351	TGAGGCATTC ACTCCGTAAG	GATGCGTCAC CTACGCAGTG	AAGATGAATT TTCTACTTAA	CATCATGGCT GTAGTACCGA	TTCGAGCTGG AAGCTCGACC

(Fortsetzung der Abbildung 47)

Anhang

5401 AATTGATGAA GTACTTAAGG TTACCAAGTG ATCTAATCGA GGATTACAAG
TTAACTACTT CATGAATTCC AATGGTTCAC TAGATTAGCT CCTAATGTTC

5451 TTTATCAAGA CCAGCCTGGG GTCTAAACTG GGCAATTTTCG CAATAATGCG
AAATAGTTCT GGTCGGACCC CAGATTTGAC CCGTTAAAGC GTTATTACGC

5501 TTTCTCCGGG GAAGCAAGCA CTTTTCTGTT TAACACACTG GCCAATATGT
AAAGAGGCCC CTTTCGTTTCGT GAAAAGACAA ATTGTGTGAC CGGTTATACA

5551 TATTCACCTT CATGAGGTAT AGCATACTGGG GTGATGAATT CATATGCTTT
ATAAGTGGAA GTACTCCATA TCGTATGCC CACTACTTAA GTATACGAAA

5601 GCTGGGGACG ATATGTGCGC ATCGCGAAGA TTGCAACCCA CGAAGAAATT
CGACCCCTGC TATACACGCG TAGCGCTTCT AACGTTGGGT GCTTCTTTAA

5651 TGCTCACTTC CTAGACAAGC TCAAACCTGAA AGCAAAGGTG CAATTCGTGA
ACGAGTGAAG GATCTGTTCG AGTTTGACTT TCGTTTCCAC GTTAAGCACT

5701 ACAAACCCAC TTTTTGTGGT TGGCACCTGT GCCCCGATGG CATATATAAG
TGTTTGGGTG AAAAACACCA ACCGTGGACA CGGGGCTACC GTATATATTC

5751 AAGCCACAGC TTGTGCTTGA GAGAATGTGC ATTGCAAAG AGATGAACAA
TTCGGTGTTC AACACGAACT CTCTTACACG TAACGTTTTTCT TCTACTTGTT

5801 CCTGAGCAAT TGCATTGATA ATTACGCCAT TGAGGTGGCG TACGCATACA
GGACTCGTTA ACGTAACTAT TAATGCGGTA ACTCCACCGC ATGCGTATGT

5851 AGTTGGGGGA AAAGGCTGTG AATAGAATGG ATGAGGAGGA AGTCGCCCGG
TCAACCCCTT TTTCCGACAC TTATCTTACC TACTCCTCCT TCAGCGGCGC

5901 TTCTACAACCT GCGTGAGAAT CATAGTGC GA ACAAACACC TCATTCGCTC
AAGATGTTGA CGCACTCTTA GTATCAGCT TTGTTTGTGG AGTAAGCGAG

5951 TGATGTAAAA CAAGTGTTTG AAGTGCTTTA ATTAGTGTAG **SgP**
ACTACATTTT GTTCACAAAC TTCACGAAAT TAATCACATC **CTTAGGTATT**
GAATCCATAA

6001 GCTATTGTAT TGAATATTTA TGGATGTGAT TG TAGATTTG TTGTATAAAT
CGATAACATA ACTTATAAAT ACCTACACTA ACATCTAAAC AACATATTTA

6051 ACAAGTTTGA GCGTCTAAGT AATAAGTTAG TGTACCCTAT AGTTGTTTAC
TGTTCAAACCT CGCAGATTCA TTATTCAATC ACATGGGATA TCAACAAGTG

6101 TGTGTGCCTG GGGCTGGCAA GAGTAGCTTA ATTCGCGAGT TGTTAGAATT
ACACACGGAC CCCGACCGTT CTCATCGAAT TAAGCGCTCA ACAATCTTAA

6151 AGATAGTCGC TTCTGTGCAT ACACAGCTGG TG TAGAGGAC CAACCAAGGT
TCTATCAGCG AAGACACGTA TGTGTCGACC ACATCTCCTG GTTGGTTCCA

6201 TGAGCGGGAA TTGGATCAGG AAGTGGAGCG GGCAACAACC GGAAGGCAAA
ACTCGCCCTT AACCTAGTCC TTCACCTCGC CCGTTGTTGG CCTTCCGTTT

(Fortsetzung der Abbildung 47)

6251	TTTGTGGTTC AAACACCAAG	TGGACGAGTA ACCTGCTCAT	CACTCTGTTG GTGAGACAAC	ACCGAAGTGC TGGCTTCACG	CTCCGGTATT GAGGCCATAA
6301	TGCATTGTTC ACGTAACAAG	GGTGACCCCA CCACTGGGGT	TACAATCGAA ATGTTAGCTT	CACGATCGCC GTGCTAGCGG	GTTCAGCGTG CAAGTCGCAC
6351	CTGACTTCGT GACTGAAGCA	GTGCTCAGTG CACGAGTCAC	AGTAGAAGGT TCATCTTCCA	TCGGCAGTGC AGCCGTCACG	CACGTGCGGG GTGCACGCCC
6401	CTGTTGCAAG GACAACGTTT	AGTTGGGCTG TCAACCCGAC	GAACGTTCAA CTTGCAAGTT	AGTGAAAAGG TCACTTTTCC	CTGACCTGGT GACTGGACCA
6451	GCAAGTATCT CGTTCATAGA	GATATATACA CTATATATGT	CAAAAGAACC GTTTTCTTGG	CCTGGGTAAA GGACCCATTT	GTTGTGTTCT CAACACAAGA
6501	TCGAGGAGGA AGTCTCTCCT	AGTGGGTTGC TCACCCAACG	TTGCTGAGAT AACGACTCTA	CACACGGGGT GTGTGCCCCA	GGAAGCCTTG CCTTCGGAAC
6551	AGCTTGCAGG TCGAACGTCC	AAATAACAGG TTTATTGTCC	CCAAACTTTC GGTTTGAAAG	GAGGTGGTAA CTCCACCATT	CTTTCGTGAC GAAAGCACTG
6601	TTCAGAGAAT AAGTCTCTTA	TCTCCAGTGA AGAGGTCACT	TCAATCGAGC AGTTAGCTCG	GGCTGCCTAT CCGACGGATA	CAGTGCATGA GTCACGTAAT
6651	CAAGGCATCG GTTCCGTAGC	AACGGCTCTG TTGCCGAGAC	TACATCTTGT ATGTAGAACA	GTCCTGATGC CAGGACTACG	CACTTACACC GTGAATGTGG
6701	GCCGCCTGAC CGGCCGACTG	TTCACAAAGG AAGTGTTTCC	TATACCTTTC ATATGGAAAG	TGCTGCACTC ACGACGTGAG	GGGGTGTGCG CCCCACAGCG
6751	TTGCTCTAGT AACGAGATCA	TGTTTGGCTG ACAAACCGAC	CTTACTAGGA GAATGATCCT	GTACACTACC CATGTGATGG	TGTGGTGGGG ACACCACCCC
6801	GATAGAGATC CTATCTCTAG	ACAATTTGCC TGTTAAACGG	ACACGGAGGT TGTGCCTCCA	TGGTACAGGG ACCATGTCCC	ACGGGACCAA TGCCCTGGTT
6851	ATCAGTGTTT TAGTCACAAA	TACAACAGCC ATGTTGTCGG	CCGGCCGACT GGCCGGCTGA	CAACTCAATA GTTGAGTTAT	GAGGCTAGAA CTCCGATCTT
6901	AAGCTCCGCT TTCGAGGCGA	ACTTGGTCAA TGAACCAGTT	CCTTGGGCTA GGAACCCGAT	TCGTCGTGCT AGCAGCACGA	GCTAGTACTG CGATCATGAC
6951	CTTATCTGGG GAATAGACCC	CGAGTCACAA GCTCAGTGTT	GCTAGGAAGG CGATCCTTCC	CCTAGCTGTA GGATCGACAT	GAGCCTGTGG CTCGGACACC
7001	CGGCTCACAC GCCGAGTGTG	CCATGATAGT GGTACTATCA	GSTATGTACTT CATACATGAA	GTGGGACTGA CACCCCTGACT	GCGCCTTCTG CGCGGAAGAC

(Fortsetzung der Abbildung 47)

Anhang

7051	CATTGTGCTG GTAACACGAC	TATTTGATCT ATAAACTAGA	CTCAGGGACA GAGTCCCTGT	ATCTGACTGT TAGACTGACA	GTAGTGCTAA CATCACGATT
7101	TTACCGGCGA AATGGCCGCT	ATCAGTGCGC TAGTCACGCG	GTGCAAGGGT CACGTTCCCA	GCCAAATTAA CGGTTTAATT	CAGTGAATTC GTCACTTAAG <u>SgP/VTE</u>
7151	GGAAGTGTGC CCTTCACACG	TATCAAAATT ATAGTTTTAA	GAAGCCGTTT CTTCGGCAAA	GGGTGTGGTT CCCACACCAA	<u>CCTTTAGGTC</u> GGAAATCCAG
7201	ATAAGGTGAA TATTCCACTT	TCTGAAATAG AGACTTTATC	TGAGTATGGG ACTCATACCC	AGATTCAACG TCTAAGTTGC	AAGAAAGCTG TTCTTTCGAC
7251	AAACTGCCAA TTTGACGGTT	AGATGTGGGC TCTACACCCG	ACTTCGCAAG TGAAGCGTTC	AAAAGAGAGA TTTTCTCTCT	AGCGCGACCA TCGCGCTGGT
7301	TTGCCGACTG AACGGCTGAC	CTGCCGACTT GACGGCTGAA	TGAGGGGAAG ACTCCCCTTC	GACACATCGG CTGTGTAGCC	AGAACACTGA TCTTGTGACT
7351	TGGGCGTGCT ACCCGCACGA	GCAGATGTTG CGTCTACAAC	ATGGAGAGAT TACCTCTCTA	GTCATTGGAG CAGTAACCTC	CGGAGGCTTG GCCTCCGAAC
7401	ACAGCCTCCG TGTCGGAGGC	AGAATTCCTG TCTTAAGGAC	CGAGAGCGGA GCTCTCGCCT	GGGGCGCAAT CCCCGCGTTA	TCGAGTGACA AGCTCACTGT
7451	AACCCGGGGT TTGGGCCCCA	TAGAGACTGG ATCTCTGACC	CAGGCCAAGG GTCGGTTC	TTGCAGCTAG AACGTCGATC	CTGAAAACAT GACTTTTGTA
7501	GCGCCCTGAT CGCGGGACTA	CCCACGAATC GGGTGCTTAG	CGTACAACAG GCATGTTGTC	GCCATCCATA CGGTAGGTAT	GAAGCTCTCA CTTCGAGAGT
7551	GCCGGATCAA CGGCCTAGTT	GCCAATCGCG CGGTTAGCGC	ATCTCAAACA TAGAGTTTGT	ATATGGCCAC TATACCGGTG	ATCTGAGGAT TAGACTCCTA
7601	ATGATGCGCA TACTACGCGT	TATATGTGAA ATATACACTT	CCTGGAGGGG GGACCTCCCC	CTAGGGGTGC GATCCCCACG	CGACTGAGCA GCTGACTCGT
7651	CGTGCAGCAG GCACGTCGTC	GTAGTGATTC CATCACTAAG	AGGCTGTGCT TCCGACACGA	ATTTTGCAAG TAAAACGTTT	GACGCAAGCA CTGCGTTCGT
7701	GCTCCGTATT CGAGGCATAA	CCTAGATCCG GGATCTAGGC	CGAGGCTCGT GCTCCGAGCA	TCGAGTGGCC AGCTCACCGG	AAGAGGTGCT TTCTCCACGA
7751	ATAACTGCGG TATTGACGCC	ATGCCGTCTT TACGGCAGAA	GGCTGTGCTG CCGACACGAC	AAGAAGGATG TTCTTCCTAC	CTGAAACACT GACTTTGTGA
7801	ACGAAGGGTG TGCTTCCCAC	TGTAGGCTGT ACATCCGACA	ATGCCCGGT TACGGGGCCA	GACATGGAAT CTGTACCTTA	CATATGCTGA GTATACGACT

(Fortsetzung der Abbildung 47)

```

7851  CGCACAAACGC GCCTCCAGCC GACTGGGCTG CCATGGGGTT TCAGTATGAG
      GCGTGTTGCG CGGAGGTCGG CTGACCCGAC GGTACCCCAA AGTCATACTC

7901  GATCGCTTCG CTGCTTTTCGA CTGCTTTGAT TACGTTGAGA ATACTGCTGC
      CTAGCGAAGC GACGAAAGCT GACGAAACTA ATGCAACTCT TATGACGACG

7951  AGTCCAACCC CTAGAGGGAC TGATCAGGCG ACCTACCCCA AGGGAAAAGA
      TCAGGTTGGG GATCTCCCTG ACTAGTCCGC TGGATGGGGT TCCCTTTTCT

8001  TAGCTCACAA TACGCACAAA GACATCGCAC TCGGTGGAGC AAATCGCAAT
      ATCGAGTGTT ATGCGTGTTT CTGTAGCGTG ACGCACCTCG TTTAGCGTTA

8051  CAGGTGTTCA GCTCTCTCAA TGCCGAGGTC ACTGGTGGTA TGAATGGTCC
      GTCCACAAGT CGAGAGAGTT ACGGCTCCAG TGACCACCAT ACTTACCAGG

      FS
8101  GGAACTCACT AGGGATTATG GAAAGTCGAA TAGAAAATGA AGTACGTAAC
      CCTTGAGTGA TCCCTAATAC CTTTCAGCTT ATCTTTTACT TCATGCATTG

8151  CAAGGTGGCT TTACTTATAG CGAGAGCTAT GTGTACTTCT TCAGGTACTT
      GTCCACCGA AATGAATATC GCTCTCGATA CACATGAAGA AGTCCATGAA

8201  TTGTGTTTGA ACTAGCTTTT AGTATTGCTG AGTGTGCGGG TCGACCACTT
      AACACAAACT TGATCGAAAA TCATAACGAC TCACACGCCC AGCTGGTGAA

8251  GCGGGTGGGA GATCCAAGTA CGCACGTCGT AGACGTGCTA TTAGTATAGC
      CCGCCACCCT CTAGGTTTCAT GCGTGCAGCA TCTGCACGAT AATCATATCG

8301  TAGGTGTCAC AGGTGCTATC GCCTGTGGCC CCCAACTGTG TTTACTACTA
      ATCCACAGTG TCCACGATAG CGGACACCGG GGGTTGACAC AAATGATGAT

8351  GGTGTGATAA TAAACATTGT GTGCCTGGTA TCTCTTACAA TGTGCGCGTG
      CCACACTATT ATTTGTAACA CACGGACCAT AGAGAATGTT ACACGCGCAC

8401  GCGCAATTTA TTGATGAAGG AGTAACCGAG GTGATACCTT CAGTCATCAA
      CCGGTTAAAT AACTACTTCC TCATTGGCTC CACTATGGAA GTCAGTAGTT

8451  CAAGCAAGAG TAGCCATTAA ATCCTATTTA ATATATAACG TGTGCTACTA
      GTTCGTTTCT ATCGGTAATT TAGGATAAAT TATATATTGC ACACGATGAT

      PA GR/TR
8501  TAAATAAAAAT TTGGTTTTTA ACTATTTTTA GCCAAAAAAA AAAAAAAAAA
      ATTTATTTTA AACCAAAAAT TGATAAAAAT CGGTTTTTTT TTTTTTTTTT

      Primer PVM3as
      =====

```

XbaI
~~~~~

```

8551  AAAAAAATCT AGATTA
      TTTTTTTAGA TCTAAT
      =====

```

**Legende:** FS= Frameshiftmotiv (nach Gramstat *et al.*, 1994); PA=Poly-A-Signal (Smith *et al.*, 2004); GR/TR=Konserviertes Motiv mit Bedeutung für Genomreplikation oder Translation (Smith *et al.*, 2004); SgP = Subgenomische Promotorensequenz (Levay *et al.*, 1991, Nicolaison und Nielson (2001) und Hataya *et al.*, 2000)

(Fortsetzung der Abbildung 47)

5.2.6. Sequenzen der PVY –hüllproteingenenthaltenden Fragmente

[1]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGTACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCCTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTGTCTATA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[2]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTCGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAGGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACACACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAATTTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAAAGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAG  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCACCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGGAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[3]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCCTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGATGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT



**[4]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCTATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACACACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAGCAAGGGAGCAACCGTGTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGCATGCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCAACTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTCGTCATGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[5]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATAAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAGCAAGGGAGCAACCGTGTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGCATGCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCAACTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAAAGTGGCAGGGTGATTCGTCATGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[6]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCCTTGGATGATGAATTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATTTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTCACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAGAGTAAAGGTGCGATTGCACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTAAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTATGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCTTTAAAATCAGCTCAATCTCGACCTTTCGATTGGATGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAAAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTGAAGAACATGTGATTGTAGT  
GTCTTTCCGGACGATATATAGATATTTATGTTTGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCGAA  
ATTAATAATCGTTTGAATATTACTGGCAGATAGGGGTGGTATAGCGATTCCGTCGTTGTAGTGACCTTAGCTGT  
CGTTTCTGTATTATTTATGTTTGTATAAAAAGTGCCGGGTTGTTGTTGTTGTGGCTGATCTATCGATTAGGTGATG  
TTGCGATTTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATTTAGTTACTTGGGTGATGCTGTGATTCTGTATAGCAGTG  
ACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[7]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGTAACTTAGAACACTTGCTCGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
GTCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGCTTAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCTCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACCTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[8]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCCTTGGATGATGAACCTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAAAACAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCACTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[9]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCCTTGGATGATGAACCTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAAAACAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAGTGAAGTGAATGCCAAAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTAAAAATCAGCCCACTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TCAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGTTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[10]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
GGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[11]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTCGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGGC  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACTCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTAGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[12]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTCGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGGC  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[13]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATCAAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAGCTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCTGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[14]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTCCGATTAGACGATGAGTTCGAATTTGACTCTTATGAAGTATATCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAAACCAGAGCAAGGCAGCATCCAATT  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAAGCAAGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAC  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAGAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTTGAATACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTGAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
GATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAAAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTGT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCTGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTACTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[15]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTCCGATTAGACGATGAGTTCGAATTTGACTCTTATGAAGTATACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAAGCAAGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTACG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTCAAGTCAATACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCCTCGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCTCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCTGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTACTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[16]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGTTTTTACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGATGCAATGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[17]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAATGACACAATGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACACACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAAGCAAGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCAGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGATGCAATGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[18]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTCGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCTAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTATGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAGTAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGATGCAATGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[19]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGACGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCCTAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATCTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACCCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAGTGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCCGCATTATTAAGTTTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCTGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[20]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCCAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTTATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCTCAACCTCGACTTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCTGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[21]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGGTGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACACACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCACCAAATGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTAAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCCGCATTATTAAGTTTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCTGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[22]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATTGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACACACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTTTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[23]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATTGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACACACTGTGCCGAAAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGGAGCGACCGTGTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTTTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[24]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCCTTGGATGATGAACCTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCATAAGAAGGATGCAAAAACAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGGACTCATACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATAACGACATATGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACACATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[25]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTCGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAATCCGAACAAAGGAAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCTCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[26]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTCGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTAAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[27]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTCGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGCACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCACAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATATGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTAAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT



**[28]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[29]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[30]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCCTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[31]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCTAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTACATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGGTGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAATCATGGCGCATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTCATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCCGCATTATTAAGTCTTAGATAAGAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[32]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATCAAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGACAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGAGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCCGTATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[33]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTGAGCAGTACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[34]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAGATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTTTGTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[35]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAGATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTTTGTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[36]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGCAAGGGAGCAACCGTGTAACTTAGAACACCTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTTGAATACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[37]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCGCAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACGGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCGTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTTGAAGTCAAAAACCAACTTAGGCAAAATCATGGCACGTTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAATCCCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[38]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTTGAAGTCAAAAACCAACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[39]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTTGAAGTCAAAAACCAACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTAAATTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[40]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACCCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGCAGTGCCTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAAAATCATGGCACACTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAAGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAGTATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[41]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGCAGTGCCTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGGTAAGAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCCGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[42]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGCAGTGCCTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCCGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[43]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACATCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATCGTGGTACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGGTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[44]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCAGACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACGGGGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[45]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAACAGTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGGTATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCGGCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[46]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACCCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[47]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGCAAGGTGCGACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTAAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACCCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[48]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGGACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCTAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCGACGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACCCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACCTTGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[49]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTACTTTTATGAGGTCACATCAGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTCCCGGTTGTCTGTTGTTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[50]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCTAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAGAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGGTGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTACTTTTATGAGGTCACATCAGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTCCCGGTTGTCTGTTGTTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[51]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGAGCAACCGTGTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAAACCAACCTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTCTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTAAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTCCCGGTTGTCTGTTATTTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAGCTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT



**[52]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGC GG TACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCCATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[53]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGC GATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGGACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGCAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[54]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGC GATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTTAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACACAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[55]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTGCTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAC  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCTGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[56]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTCGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACACACTGTGCCGAGATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAAAGCAAGGAGCAACCGTGTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGGC  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTGAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTTCAAATGAAG  
GCCGCAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCTGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGATGTGTGATTGCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

[57]

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTTCAAATGAAG  
GCCGCAGCTTTAAAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTGGATGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAAAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTGAAGAACATGTGATTGTAGT  
GTCTTTCCGGACGATATATAGATATTTATGTTTGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCGCA  
ATTAATAATCGTTTGAATATTACTGGCAGATAGGGGTGGTATAGCGATTCCGTCGTTGTAGTGACCTTAGCTGT  
CGTTTCTGTATTATGTTTGTATAAAAAGTGCCGGGTTGTTGTTGTTGTGGCTGATCTATCGATTAGGTGATG  
TTGCGATTTGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATTTAGTTACTTGGGTGATGCTGTGATTCTGTATAGCAGTG  
ACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[58]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGGGATACTTATGAAGTGCACCAT  
CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTATCATTCAACC  
AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTAT  
GCTCCACAGCAAATGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACA  
ACTTGCATACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAACATCAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTC  
GCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[59]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTCGATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTACACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAAGCAAGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTTGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGARYACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTACTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**[60]**

AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGGTTCGATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTATGAAGTATAACCAT  
CAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTC  
AAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACACACACTGTGCCGAGAATCAAGG  
CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAAAGCAAGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTAT  
GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
GATGGCATAACGACATAGGAGAAAAGTAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
GAACCTCGCCAAATGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCA  
ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGA  
AATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
GTTATGCCTTCGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTTCAAATGAAG  
GCCGAGCATTGAAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTAAAGAACATGTGATGTAGTG  
TCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATGTGGTGACTCTATCTTT  
TAATTCGCAATTATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTACTTGGGTGGTGTGTGATTTTCGTCATAACAG  
TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**NCBI\_AJ390291.1**

AAGGATCCGCTTTCCTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACCAT  
 CAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACC  
 AAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTACTGTGCCACGAATTAAG  
 CTATCACGTCCAAGATGAGAATGCCAAAAGCAAGGAGCAACCGTGTAACTTAGAACATTTGCTTGAGTAT  
 GCTCCACAACAAATGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTGCG  
 GATGGCATAACGACATAGGAGAACTGAGATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATG  
 GAACCTCGCCAAATGTAACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTTGAGTACCCGTTGAAACCA  
 ATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCTTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTGCAGAAGCGTATATAGA  
 AATGCGTAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGC  
 GTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG  
 GCCGAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACAC  
 AGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTG  
 TCTCTCCGGACGATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAA  
 TTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATGGAGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTGT  
 TAATTCGCATTATTAAGTCTTAGATAAGAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTTCATCGATTAGGTGAT  
 GTTGCGATTCTGTCTAGCAGTGACTACGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTGTGATTCCGTCATAACAG  
 TGACTGTAACTTCAATCAGGAGACTCTAGAAGCTTCCCT

**Tabelle 49: Monatliche Häufigkeitsverteilung der Windrichtungen auf dem Versuchsfeld Dahnsdorf**

(Die Daten wurden vom Institut für Folgenabschätzung der BBA zur Verfügung gestellt)

| Jahr | Monat     | Angabe der Windrichtungen in % |       |       |       |       |       |       |       |
|------|-----------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|      |           | N                              | NO    | O     | SO    | S     | SW    | W     | NW    |
| 2001 | April     | 1,13                           | 1,25  | 2,11  | 12,34 | 20,75 | 28,00 | 24,92 | 9,50  |
|      | Mai       | 4,60                           | 7,04  | 7,40  | 6,84  | 11,30 | 18,39 | 28,90 | 15,54 |
|      | Juni      | 1,17                           | 1,54  | 2,71  | 6,63  | 9,17  | 27,82 | 40,34 | 10,63 |
|      | Juli      | 3,94                           | 8,81  | 10,62 | 5,56  | 5,68  | 13,18 | 36,85 | 15,37 |
|      | August    | 2,42                           | 5,04  | 5,49  | 8,69  | 17,41 | 25,92 | 24,47 | 10,55 |
|      | September | 1,74                           | 4,31  | 6,34  | 9,91  | 19,26 | 35,88 | 17,27 | 5,30  |
| 2002 | April     | 3,80                           | 13,59 | 11,65 | 5,23  | 14,59 | 15,21 | 25,58 | 10,35 |
|      | Mai       | 2,22                           | 6,27  | 10,80 | 9,66  | 10,24 | 21,62 | 25,66 | 13,53 |
|      | Juni      | 1,90                           | 7,29  | 10,26 | 7,43  | 10,47 | 31,97 | 26,16 | 4,51  |
|      | Juli      | 2,15                           | 4,86  | 7,55  | 10,51 | 16,99 | 30,30 | 19,36 | 8,27  |
|      | August    | 5,53                           | 7,57  | 13,51 | 7,15  | 5,29  | 9,25  | 32,40 | 19,29 |
|      | September | 3,99                           | 10,45 | 8,99  | 5,89  | 6,19  | 18,68 | 30,80 | 15,02 |
| 2003 | April     | 2,99                           | 8,85  | 14,94 | 8,24  | 10,12 | 17,02 | 25,20 | 12,64 |
|      | Mai       | 2,67                           | 4,84  | 6,86  | 12,08 | 16,94 | 27,72 | 19,57 | 9,32  |
|      | Juni      | 2,52                           | 6,37  | 8,33  | 13,17 | 7,85  | 14,86 | 37,18 | 9,72  |
|      | Juli      | 1,61                           | 7,26  | 7,57  | 8,07  | 9,10  | 21,91 | 35,49 | 8,98  |
|      | August    | 3,23                           | 11,24 | 9,87  | 5,65  | 6,12  | 20,57 | 35,69 | 7,63  |
|      | September | 1,90                           | 4,77  | 7,39  | 13,24 | 10,47 | 16,42 | 33,29 | 12,53 |
| 2004 | April     | 1,53                           | 7,26  | 19,87 | 12,05 | 15,30 | 18,77 | 20,24 | 4,97  |
|      | Mai       | 1,05                           | 2,92  | 4,35  | 7,27  | 7,32  | 23,80 | 43,93 | 9,37  |
|      | Juni      | 0,71                           | 4,07  | 3,26  | 6,54  | 13,39 | 35,83 | 30,57 | 5,63  |
|      | Juli      | 0,36                           | 3,34  | 7,37  | 8,16  | 9,37  | 35,40 | 27,13 | 8,87  |
|      | August    | 1,48                           | 7,08  | 10,62 | 7,24  | 18,95 | 26,66 | 22,04 | 5,94  |
|      | September | 1,62                           | 4,03  | 5,35  | 7,57  | 15,47 | 34,68 | 25,84 | 5,44  |

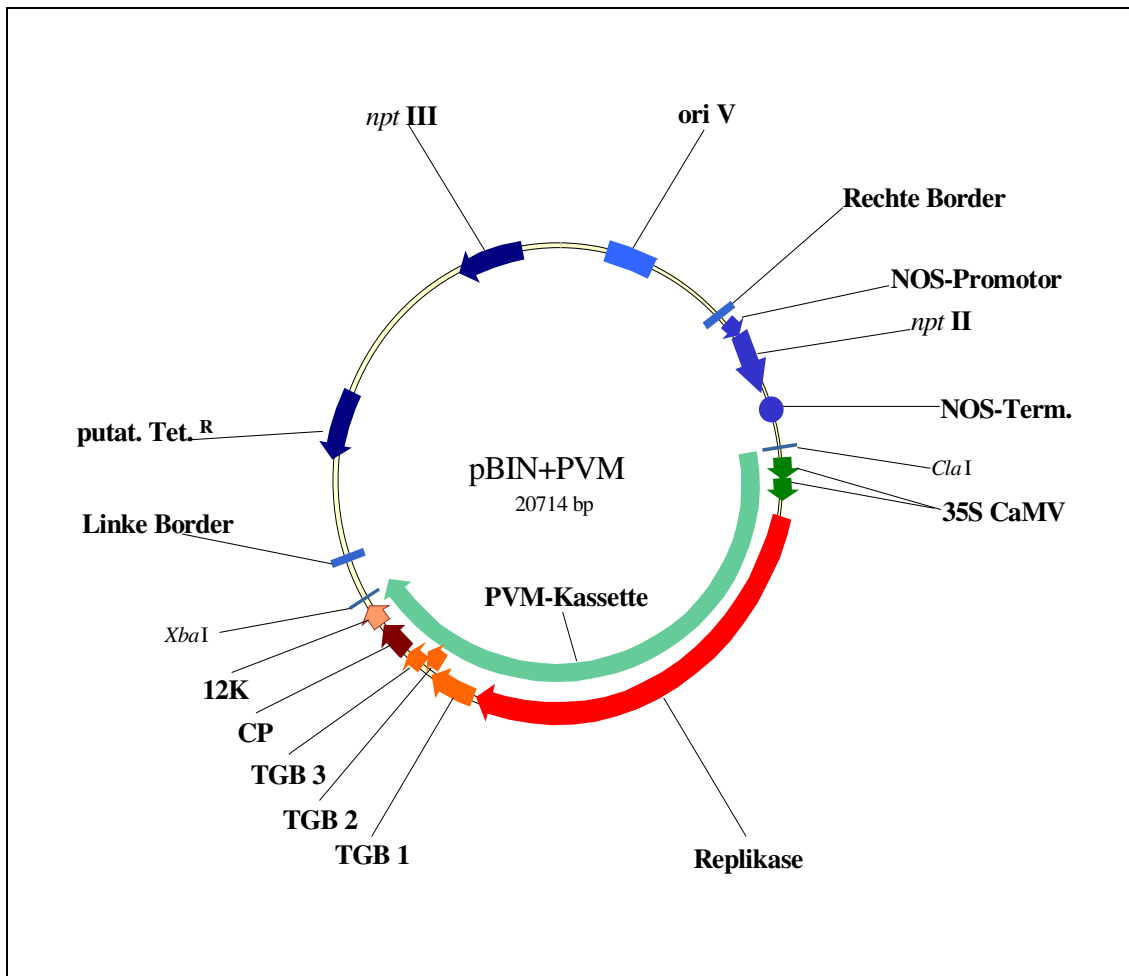


Abb. 48: Schematische Darstellung des pBIN+PVM.

Die PVM – Kassette (dargestellt als hellgrüner Pfeil), bestehend aus der verdoppelten 35S CaMV Promotorsequenz und der cDNA Kopie des PVM, wurde in den ursprünglichen binären Vektor pBIN-SN zwischen rechter und linker Border über *ClaI* und *XbaI* integriert. Die carlaviralen ORFs innerhalb der PVM-Kassette wurden als Pfeile dargestellt. Zusätzlich wurden einige Bereiche des pBIN19-SN markiert, wie die Neomycin Phototransferasen II und III, sowie das Resistenzgen gegen Tetracyclin ( $Tet^R$ ) und den Replikationsstart (Origin of replication, ori V).

### 6. Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen ....                                                                                               | 57  |
| Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte .....                                                                                                                           | 59  |
| Tabelle 3: Zusammenstellung der Verbrauchsmaterialien und der Reaktionskits .....                                                                                                | 61  |
| Tabelle 4: Eingesetzte Software mit Hersteller- und Versionsangabe .....                                                                                                         | 62  |
| Tabelle 5: PVY spezifische Sequenzierprimer .....                                                                                                                                | 62  |
| Tabelle 6: PVY spezifische Primer .....                                                                                                                                          | 63  |
| Tabelle 7: PVX spezifische Primer .....                                                                                                                                          | 63  |
| Tabelle 8: Klonierungsprimer für die Herstellung des PVM Vollängenklons .....                                                                                                    | 63  |
| Tabelle 9: weitere PVM spezifische Primer .....                                                                                                                                  | 64  |
| Tabelle 10: Primer zur Sequenzierung des PVM Vollängenklons .....                                                                                                                | 64  |
| Tabelle 11: Klonierungsprimer für die PVX/M Hüllproteinchimäre .....                                                                                                             | 65  |
| Tabelle 12: verwendete Restriktionsendonukleasen (RE).....                                                                                                                       | 66  |
| Tabelle 13: Nukleinsäure- oder proteinmodifizierende Enzyme mit Konzentrations-<br>und Herstellerangaben .....                                                                   | 67  |
| Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten Antikörper (IgG) und deren Hersteller ....                                                                                            | 68  |
| Tabelle 15: Verwendete Plasmide und Nukleinsäuren mit Referenzangaben.....                                                                                                       | 68  |
| Tabelle 16: Übersicht über die verschiedenen Marker .....                                                                                                                        | 69  |
| Tabelle 17: verwendete PVX Vollängenklone .....                                                                                                                                  | 69  |
| Tabelle 18: Verwendete Bakterienstämme.....                                                                                                                                      | 69  |
| Tabelle 19: Test- und Erhaltungspflanzen für die verschiedenen Pflanzenviren .....                                                                                               | 70  |
| Tabelle 20: Transgene <i>N. benthamiana</i> -Tabaklinien und ihre Herkünfte .....                                                                                                | 70  |
| Tabelle 21: Kartoffelvarianten der Freisetzungen 2001-2004.....                                                                                                                  | 71  |
| Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Virusisolate und deren Herkünfte.....                                                                                                 | 72  |
| Tabelle 23: Übersicht über verwendete Carlavirussequenzen aus der Datenbank<br>(GenBank) .....                                                                                   | 72  |
| Tabelle 24: Termine über die Durchführung verschiedener Kulturmaßnahmen.....                                                                                                     | 94  |
| Tabelle 25: Ergebnisse der Knollenvortestungen für die Freisetzungen 2002 - 2004..                                                                                               | 135 |
| Tabelle 26: Visuelle Bonitur des Gesamtbefalles (Pflanzen mit Symptomen sowie<br>Anzahl serologisch überprüfter Blattproben, die als virusverdächtig<br>eingestuft wurden) ..... | 138 |
| Tabelle 27: Vergleich der Anteile an infizierten Pflanzen (bzw. Knollen) pro Variante<br>und Jahr bei der Knollenvortestung und bei der visuellen Bonitur .....                  | 142 |
| Tabelle 28: Virusbefall von Kartoffelknollen anhand der Nacherntetestung 2001.....                                                                                               | 145 |
| Tabelle 29: Virusbefall von Kartoffelknollen anhand der Nacherntetestung 2002.....                                                                                               | 146 |
| Tabelle 30: Virusbefall von Kartoffelknollen anhand der Nacherntetestung 2003.....                                                                                               | 147 |
| Tabelle 31: Virusbefall von Kartoffelknollen anhand der Nacherntetestung 2004.....                                                                                               | 148 |
| Tabelle 32: Zusammenstellung aller PVY-Infektionen der Nacherntetestungen.....                                                                                                   | 149 |
| Tabelle 33: PVY-Infektionen in den geernteten Knollen aus den einzelnen<br>Freisetzungen.....                                                                                    | 150 |
| Tabelle 34: Gegenüberstellung des bei der visuellen Bonitur und bei der<br>Nachernteuntersuchung vorgefundenen Gesamtbefalls an virusinfizierter<br>Pflanzen .....               | 152 |

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 35: Ergebnis der statistischen Analyse von PVY Infektionen ermittelt in serologischen Untersuchungen von geernteten Knollen der Freisetzen der Jahre 2001 bis 2004 ..... | 156 |
| Tabelle 36: Übersicht über die Fragmente, die nach enzymatischem Verdau der PVY-Hüllproteinamplifikate entstehen .....                                                           | 161 |
| Tabelle 37: RFLP-Analyse von PVY-CP Fragmenten sowie Anzahl der sequenzierten Proben je Variante und Freisetzung.....                                                            | 163 |
| Tabelle 38: Übersicht über die Anteile an PVY <sup>NTN</sup> und PVY <sup>O</sup> bezogen auf den Gesamtbefall und auf die transgenen und nicht-transgenen Varianten ...         | 166 |
| Tabelle 39: Anteile an PVY <sup>NTN</sup> und PVY <sup>O</sup> in den transgenen Versuchsvarianten sowie in den Varianten Wildtyp 1 und Wildtyp 2.....                           | 166 |
| Tabelle 40: P1- und CP- Analysen ausgewählter PVY-Proben der Jahre 2003 und 2004 .....                                                                                           | 167 |
| Tabelle 41: Infektiositätstestungen verschiedener PVX-Volllängklone und deren Deletionsmutanten auf sowohl transgenen wie auch nicht-transgenen Tabakpflanzen .....              | 179 |
| Tabelle 42: Fragmentlängen nach der Restriktionsspaltung mit dem entsprechenden Restriktionsenzymen im amplifizierten Bereich des PVX.....                                       | 184 |
| Tabelle 43: pPVX/M-CP Inokulationen in vier Versuchswiederholungen (28dpi) .....                                                                                                 | 185 |
| Tabelle 44: Partikel-Bombardement zur Überprüfung der rekombinanten Plasmide pe35+PVM .....                                                                                      | 189 |
| Tabelle 45: Feststellung der PVM Infektionen und Symptombonitur der Testpflanzen (28 dpi).....                                                                                   | 192 |
| Tabelle 46: Infektiositätsprüfung einzelner PVM-Konstrukte nach Agroinfektion.....                                                                                               | 192 |
| Tabelle 47: Mechanische Übertragbarkeit des PVM-VLK und Vergleich der Symptomausprägungen bei verschiedenen Pflanzen.....                                                        | 196 |
| Tabelle 48: Identitäten zwischen der ermittelten PVM - Sequenz des Volllängklons und anderer PVM- bzw. Carlavirussequenzen. ....                                                 | 198 |
| Tabelle 49: Monatliche Häufigkeitsverteilung der Windrichtungen auf dem Versuchsfeld Dahnsdorf .....                                                                             | 284 |

### 7. Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der pflanzlichen Fructansynthese .....                                                                                                                                                                                           | 6   |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung des PVY-Genoms .....                                                                                                                                                                                                             | 12  |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genome verschiedener PVY-Stämme<br>(PVY <sup>O</sup> , PVY <sup>NTN</sup> , PVY <sup>N-W</sup> , PVY <sup>N:O</sup> und PVY <sup>N</sup> ).....                                                                              | 23  |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Genomstruktur und -expression des PVX 26                                                                                                                                                                                     |     |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der Genomorganisation und der -expression des<br>PVM .....                                                                                                                                                                       | 38  |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung des PLRV-Genoms und der für das Virus<br>typischen Translationsprodukte.....                                                                                                                                                     | 45  |
| Abbildung 7: Schematische Darstellungen der Anbaupläne der Freisetzungen 2001 und<br>2002 .....                                                                                                                                                                        | 92  |
| Abbildung 8: Schematische Darstellungen der Anbaupläne der Freisetzungen 2003 und<br>2004 .....                                                                                                                                                                        | 93  |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung der Partikel-Kanone. Ganze Pflanzen wurden<br>mit DNA behafteten Wolframpartikel beschossen.....                                                                                                                                 | 119 |
| Abbildung 10: Schematische Darstellung der Anteile (in %) an virusinfizierten Knollen<br>innerhalb aller untersuchten Knollen der transgenen Linien (T) und aller<br>nicht-transgenen Linien (NT).....                                                                 | 136 |
| Abbildung 11: Aufnahme von der Freisetzung 2003 Im Vordergrund ist ein Teilbereich<br>der Kartoffelparzelle des Blockes C zu erkennen. Im Hintergrund können<br>die Parzellen des Blockes B erkannt werden.....                                                        | 137 |
| Abbildung 12: Vergleich der Ergebnisse der Knollenvortestung mit denen der visuellen<br>Bonitur von PVY Infektionen in der Freisetzung 2003.....                                                                                                                       | 143 |
| Abbildung 13: Vergleich der Ergebnisse der Knollenvortestung mit denen der visuellen<br>Bonitur von PVY Infektionen in der Freisetzung 2004.....                                                                                                                       | 143 |
| Abbildung 14: Vergleich der visuellen Bonitur mit der Knollentestung der Freisetzung<br>2001 .....                                                                                                                                                                     | 153 |
| Abbildung 15: Vergleich der visuellen Bonitur mit der Knollentestung der Freisetzung<br>2003 .....                                                                                                                                                                     | 153 |
| Abbildung 16: Vergleich der visuellen Bonitur mit der Knollentestung der Freisetzung<br>2004 .....                                                                                                                                                                     | 153 |
| Abbildung 17: Darstellung der PVY-Befallswerte der einzelnen Varianten je<br>Freisetzung als Box-Plots .....                                                                                                                                                           | 155 |
| Abbildung 18: Schematische Darstellung der Positionen verschiedener<br>Restriktionsendonukleasen innerhalb eines PVY <sup>NTN</sup> bzw. eines PVY <sup>O</sup> -<br>Fragments (beide 1224 bp), die nach Sequenzierung als Vergleichsisolate<br>Verwendung fanden..... | 160 |
| Abbildung 19: Agarosegele, die unverdaute oder nach enzymatischer Restriktion<br>entstandene Fragmente von Isolaten des PVY <sup>NTN</sup> (N) und des PVY <sup>O</sup> (O)<br>zeigen.....                                                                             | 162 |
| Abbildung 20: Phylogenetischer Stammbaum von PVY-Fragmenten, basierend auf<br>ihren Nukleotidsequenzen. ....                                                                                                                                                           | 170 |



|                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 21: Vergleich der Sequenz 205 (V6_S-02) auf Nukleotidebene mit denen aus der GeneBank stammenden Kontrollen PVY <sup>NTN</sup> und PVY <sup>O</sup> sowie einer weiteren Vergleichssequenz (AJ390291).....                                       | 172 |
| Abbildung 22: Übersicht über die deletierten Bereiche innerhalb des TGBp1 der beiden PVX-Vollängenklone PVX1 und PVX2 .....                                                                                                                                | 177 |
| Abbildung 23: Übersicht über die deletierten Bereiche innerhalb des TGB2 der beiden PVX-Vollängenklone PVX1 und PVX2. Innerhalb dieses ORFs weisen sowohl die Ausgangssequenzen, wie auch die Deletionsmutanten untereinander keine Unterschiede auf. .... | 177 |
| Abbildung 24: Infektionen von PVX2 und PVX2-Del1 in nicht-transgenen und in TGB1 transgenen <i>N. benthamiana</i> .....                                                                                                                                    | 180 |
| Abbildung 25: Schematische Darstellung des 1910 bp PVX Fragments .....                                                                                                                                                                                     | 183 |
| Abbildung 26: Schematische Darstellung der Region zwischen dem 35S CaMV-Promotor 3'-Terminus (35S, unterstrichen) und dem Beginn der viralen Sequenz (PVM, unterstrichen). ....                                                                            | 187 |
| Abbildung 27: PVM Genom unter Kontrolle eines verdoppelten 35S CaMV Promotors (pe35PVM). ....                                                                                                                                                              | 188 |
| Abbildung 28: Teilbereich des Derivates des binären Vektors pBIN-SN zwischen Rechter und Linker Grenze (Border).....                                                                                                                                       | 191 |
| Abbildung 29: Vergleich der Stiele und der Blätter von zwei <i>N. hesperis</i> -Pflanzen. .                                                                                                                                                                | 193 |
| Abbildung 30: PVM Nachweis durch Western-Blot mittels PVM-CP spezifischer Antikörper.....                                                                                                                                                                  | 194 |
| Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Darstellung eines ca. 700 nm langen PVM - Partikels .....                                                                                                                                                           | 195 |
| Abbildung 32: Sequenzierung des PVM Genoms (schematisch als grauer Balken dargestellt) und Angabe der dafür verwendeten Primer.....                                                                                                                        | 197 |
| Abbildung 33: Paarweises FLAG Alignment der vollständigen Nukleinsäuresequenzen des PVM-VLKs und der Vergleichssequenz (NC_001361). ....                                                                                                                   | 199 |
| Abbildung 34: Sequenz des mit Hilfe der Primer PVMXCPup und PVMXCPdown amplifizierten PVM Hüllproteinfragments.....                                                                                                                                        | 242 |
| Abbildung 35: Phylogenetischer Stammbaum des ORF1 (Replikase) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen .....                                                                                                                    | 243 |
| Abbildung 36: Phylogenetischer Stammbaum des ORF2 (TGB1) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen.....                                                                                                                          | 244 |
| Abbildung 37: Phylogenetischer Stammbaum des ORF3 (TGB2) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen.....                                                                                                                          | 245 |
| Abbildung 38: Phylogenetischer Stammbaum des ORF4 (TGB3) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen.....                                                                                                                          | 246 |
| Abbildung 39: Phylogenetischer Stammbaum des ORF5 (CP) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen.....                                                                                                                            | 247 |
| Abbildung 40: Phylogenetischer Stammbaum des ORF6 (12K) der PVM Sequenzen und anderer Carlaviren auf Basis der AS-Sequenzen.....                                                                                                                           | 248 |
| Abbildung 41: Aminosäuresequenz des PVM-ORF1 .....                                                                                                                                                                                                         | 250 |
| Abbildung 42: Aminosäuresequenz des PVM-ORF2 (TGBp1).....                                                                                                                                                                                                  | 252 |
| Abbildung 43: Aminosäuresequenz des PVM-ORF3 (TGBp2).....                                                                                                                                                                                                  | 252 |
| Abbildung 44: Aminosäuresequenz des PVM-ORF4 (TGBp3):.....                                                                                                                                                                                                 | 252 |
| Abbildung 45: Aminosäuresequenz des PVM-ORF5 (CP).....                                                                                                                                                                                                     | 252 |

## **Abbildungsverzeichnis**

---

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 46: Aminosäuresequenz des PVM-ORF6 .....                                      | 253 |
| Abbildung 47: Sequenz des PVM Fragments und Angabe der Primer PVM1s und<br>PVM3as ..... | 253 |
| Abbildung 48: Schematische Darstellung des pBIN+PVM. ....                               | 285 |

## 8. Literaturverzeichnis

Aaziz, R. & Tepfer, M. (1999a). Recombination between genomic RNAs of two cucumoviruses under conditions of minimal selection pressure. *Virology* 263, (2): 282-289

Aaziz, R. & Tepfer, M. (1999b). Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *Journal of General Virology* 80 (6): 1339-1346.

Adair T. L. & Kearney C. M. (2000). Recombination between a 3-kilobase tobacco mosaic virus transgene and a homologous viral construct in the restoration of viral and nonviral genes. *Archives of Virology* 145 (9): 1867-1883

Adams, M. J. (1991). Transmission of plant viruses by fungi. *Ann. Appl. Biol.* 118: 479-492

Adang, M. J., Brody, M. S., Cardineau, G., Eagan, N., Roush, R. T., Shewmaker, C. K., Jones, A., Oakes, J. V. & McBride, K. E. (1993). The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIII<sub>A</sub> gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.* 21 (6): 1131-1145.

Agranovsky, A. A., Folimonov, A. S., Folimonova, S. Y., Morozov, S. Y., Schiemann, J., Lesemann, D.-E. & Atabekov, J. G. (1998). Beet yellows closterovirus HSP70-like protein mediates the cell-to-cell movement of a potexvirus transport-deficient mutant and a hordeivirus-based chimeric virus. *Journal of General Virology* 79 (4): 889-895.

Ajjikuttira, P., Loh, C.-S. & Wong, S.-M. (2005). Reciprocal function of movement proteins and complementation of long-distance movement of cymbidium mosaic virus RNA by odontoglossum ringspot virus coat protein. *Journal of General Virology* 86 (5): 1543-1553.

Al Abdallah, Q. (2002). Construction of plum pox virus (PPV) chimeric full length clones and their use for detection of homologous recombination of PPV. Masterarbeit an der Universität Hannover.

Alejska, M., Kurzynska-Kokorniak, A., Broda, M., Kierzek, R. & Figlerowicz, M. (2001). How RNA viruses exchange their genetic material. *Acta Biochimica Polonica* 48 (2): 391-407.

Alejska, M., Figlerowicz, M., Malinowska, N., Urbanowicz, A. & Figlerowicz, M. (2005). A universal BMV-based RNA recombination system - how to search for general rules in RNA recombination. *Nucleic Acids Research* 33 (12), 1-14.

Aleman-Verdaguer, M. E., Goudou-Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R. N. & Fauquet, C. (1997). Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. *Journal of General Virology* 78 (6): 1253-1264.

- Allison, R. F., Greene, A. E. & Schneider, W. L. (1997). Significance of RNA recombination in capsid protein mediated virus-resistant transgenic plants. In: Virus resistant transgenic plants: potential ecological impact. Tepfer, M. & Balázs, E. (Eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Alt-Moerbe, J., Neddermann, P., von Lintig, J., Weiler, E.W. & Schröder, J. (1988). Temperature-sensitive step in Ti plasmid vir-region induction and correlation with cytokinin secretion by Agrobacteria. *Mol. Gen. Genet.*, 213 (1): 1-8.
- Alt-Moerbe, J., Kühlmann, H. & Schröder, J. (1989). Differences in induction of Ti plasmid virulence genes virG and virD and continued control of virD expression by four external factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2 (6): 301-308.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. & Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (22): 13079-13084.
- Angell, S. M., Davies, C. & Baulcombe, D. C. (1996). Cell-to-cell movement of potato virus X is associated with a change in the size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology* 216 (1): 197-201.
- Anindya, R. & Savithri, H. S. (2004). Potyviral NIa proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (31): 32159-32169
- Aranda, M. A., Fraile, J., Dopazo, J., Malpica, J. M. & Garcia-Arenal, F. (1997). Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *Journal of Molecular Evolution* 44 (1): 81-88.
- Arbatova, J., Lehto, K., Pehu, E. & Pehu, T. (1998). Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *Journal of General Virology* 79 (10): 2319-2323.
- Arenz, B. & Hunnius, W. (1959). Grundlagen und Technik des Pflanzkartoffelbaus. *BLV Verlagsgesellschaft München*.
- Ares, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R. N. & Mentaberry, A. (1998). Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses. *Journal of Virology* 72 (1): 731-738.
- Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V. & Poljakov, V. Y. (2000). The movement protein -triggered *in situ* conversion of potato virus X virion RNA from nontranslatable into a translatable form. *Virology* 271 (2): 259-263.
- Atkinson, H. J., Green, J., Cowgill, S. E. & Levesley, A. (2001). The case for genetically modified crops with a poverty focus. *Trends Biotechnol.* 19: 91-96.

- Atreya, C. D., Raccah, B. & Pirone, T. P. (1990). A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of potyviruses. *Virology* 178: 161-165.
- Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: Effects of amino acid substitutions, deletions and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (24): 11919-11923.
- Atreya, P. L., Lopez-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* 76 (2): 265-270.
- Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M. A. & Hay, R. T. (1990). Expression of the genome of potato leafroll virus readthrough of the coat protein termination codon in vivo. *Journal of General Virology*, 71 (10): 2251-2256.
- Ballut, L., Drucker, M., Pugnière, M., Cambone, F., Blanc, S., Roquet, F., Candresse, T., Schmid, H. P., Nicolas, P., Le Gall, O. & Badaoui, S. (2005). HC-Pro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymatic activities. *Journal of General Virology* 86: 2595-2603.
- Bancroft, J. B., Rouleau, M., Johnston, R., Prins, L. & Mackie, G. A. (1991). The entire nucleotide sequence of foxtail mosaic virus RNA. *Journal of General Virology* 72 (9): 2173-2181.
- Baratova, L. A., Grebenshchikov, N. I., Dobrov, E. N., Gedrovich, A. V., Kashirin, I. A., Shishkov, A. V., Efimov, A. V., Jarvekulg, L., Radavsky, Y. L. & Saarma, M. (1992). The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology* 188 (1): 175-180.
- Barker, H. & Harrison, B. D. (1986). Restricted distribution of potato leafroll virus antigen in resistant potato genotypes and its effects on transmission of the virus by aphids. *Ann. Appl. Biol.* 109 (3): 595-604.
- Baroth, M., Orlich, M., Thiel, H. J. & Becher, P. (2000). Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology* 278 (2): 456-466.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S. & Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal* 7 (6): 1045-1053.
- Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y. & Baulcombe, D. C. (2005). Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal* 44 (3): 471-482.
- Beck, D. L., Guilford, P. J., Voot, D. M. Andersen, M. T. & Foster, R. L. S. (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* 183 (2): 695-702.

- Beck, D. L., Van Dolleweerd, C. J., Lough, T. J., Balmori, E., Voot, D. M. Andersen, M. T., O'Brien, I. E. W. & Forster, R. L. S. (1994). Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (22): 10310-10314.
- Beczner, L., Horváth, H., Romhányi, J. & Förster, H. (1984). Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research* 27: 339-352.
- Bercks, R. (1970) Potato virus X. In CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, no. 4 (Harrison, B.D. und Murant, A.F., eds). Kew: Commonwealth.
- Berger, P. H., Hunt, A. G., Domier, L. L., Hellmann, G. M., Stram, Y., Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. (1989). Expression in transgenic plants of a viral gene product that mediates insect transmission of potyviruses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86 (21): 8402-8406.
- Bertram Reuter, L. (1988). Das älteste deutsche Kartoffelrezept wird 400 Jahre alt. *Kartoffelbau* 39: 413-414.
- Bertram Reuter, L. (1997). Eine neue Kartoffel-Briefmarke. *Kartoffelbau* 48: 378-379.
- Bertram Reuter, L. (1998). Vor 400 Jahren kamen die ersten Kartoffeln nach Deutschland. *Kartoffelbau* 39: 72-74.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* 7 (6): 1513-1523.
- Blanc, S., Lopez-Moya, J. J., Wang, R. Y., Garcia-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 (1): 141-147.
- Blanco-Urgoiti, B., Sánchez, F., Pérez de San, R. C., Dopazo, J. & Ponz, F. (1998). Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *J. Gen. Virol.* 79: 2037-2042.
- Blanco-Urgoiti, B., Sánchez, F., Dopazo, J. & Ponz, F. (1996). A strain-type clustering of potato virus Y based on the genetic distance between isolates calculated by RFLP analysis of the amplified coat protein gene. *Archives of Virology* 141 (12): 2425-2442.
- Blanco-Urgoiti, B., Tribodet, M., Leclere, S., Ponz, F., Pérez de San Román, C., Legorburu, F. J. & Kerlan, C. (1998a). Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. *European Journal of Plant Pathology* 104 (8): 811-819.
- Blanco-Urgoiti, B., Sánchez, F., Pérez de San Román, C., Dopazo, J. & Ponz, F. (1998b). Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *J. Gen. Virol.* 79 (8): 2037-2042.

- Bleykasten, C., Gilmer, D., Guilley, H., Richards, K. E. & Jonard, G. (1996). The beet necrotic yellow vein virus 42-kilodalton triple gene block protein binds nucleic acids in vitro. *Journal of General Virology* 77 (5): 889-897.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim van Dillen, P. M. E. & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (3): 495-503.
- Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P. & Barker, I. (2002). The detection of tuber necrotic isolates of potato virus Y and the accurate discrimination of PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 102 (1-2): 103-112.
- Boonham, N., Walsh, K., Smith, P., Madagan, K., Grham, I. & Barker, I. (2003). Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *Journal of Virological Methods* 108 (2): 181-187
- Borgstrom, B. & Johansen, I. E. (2001); Mutations in pea seedborne mosaic virus genome-linked protein VPg alter pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Mol. Plant Microbe Interactions* 14 (6): 707-714
- Borja, M., Rubio, T., Scholthof, H. B. & Jackson, A. O. (1999). Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Mol. Plant - Microbe Interact.* 12 (2): 153-162.
- Boyer, J. C. & Haenni, A. L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 198 (2): 415-426.
- Brantley, J. D. & Hunt, A. G. (1993). The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA-binding protein. *Journal of General Virology* 74 (6): 1157-1162.
- 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. *The EMBO Journal* 14 (4): 650-659.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. & Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO Journal* 17 (22): 6739-6746.
- Brunt, A. A., Foster, G. D., Morozov, S. Y. & Zavriev, S. K. (2000). Genus Carlavirus. In: Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B.(eds): *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego*, 969-975

- Bruyere, A., Wantroba, M., Flasiniski, S., Dzianott, A. & Bujarski, J. J. (2000). Frequent homologous recombination events between molecules of one RNA component in a multipartite RNA virus. *Journal of Virology* 74 (9): 4214-4219.
- Bruyere, A. V., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M. T., van den Heuvel, J. F. J. M., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G. & Herrbach, E. (1997). Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms and aphid transmission. *Virology* 230 (2): 323-334.
- Bujarski, J. J. & Kaesberg, P. (1986). Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature (London)* 321: 528-531.
- Bujarski, J. J. & Nagy, P. D. (1994). Targeting of the site of nonhomologous recombination in brome mosaic virus. *Archives of Virology* 0 (9): 231-238
- Bujarski, J. J., Nagy, P. D. & Flawinski, S. (1997). Molecular studies of genetic RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. *Adv. Virus Res.* 43: 275-302
- Bujarski, J. J. & Nagy, P. D. (1996). Different mechanisms of homologous and nonhomologous recombination in brome mosaic virus: role of RNA sequences and replicase proteins. *Seminars in Virology* 7: 363-372.
- Bundessortenamt (Hrsg.) (2002). Beschreibende Sortenliste Kartoffeln, Landbuch Verlagsgesellschaft mbH, Hannover
- Bystricka, D., Lenz, O., Mraz, I., Piherova, L., Kmoch, S. & Sip, M. (2005). Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* 128 (1-2): 176-182.
- Callaway, A. S., George, C. G. & Lommel, S. A. (2004). A sobemovirus coat protein gene complements long-distance movement of a coat protein-null dianthovirus. *Virology* 330 (1): 186-195.
- Calvert, L. A., Cuervo, M. I., Ospina, M. D., Fauquet, C. M. & Ramirez, B. C. (1996). Characterization of cassava common mosaic virus and a defective RNA species. *Journal of General Virology* 77 (3): 525-530.
- Campbell, R. N. (1979). Fungal vectors of plant viruses. In: fungal Viruses. XII<sup>th</sup> Int. Congr. Microbiol. Mycol. Sect., Munich, 1978. Molitoris, H. P., Hollings, M. and Wood, H. A. (Hg.) 8-24, Springer-Verlag Berlin
- Campbell, R. N., (1996). Fungal transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 87-108
- Carrington, J. C., Cary, S. M. & Dougherty, W.G. (1988). Mutational analysis of tobacco etch virus polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of polyproteins containing the 49-kilodalton proteinase. *J. Virol.* 62 (7): 2313-2320.



- Carrington, J. C., Cary, S. M., Parks, T. D. & Dougherty, W. G. (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *The EMBO Journal* 8 (2): 365-370.
- Carrington, J. C. & Freed, D. D. (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology* 64: 1590-1597.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K. & Schaad, M. C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8 (10): 1669-1681.
- Carrington, J. C., Jensen, P. E. & Schaad, M. C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal* 14 (4): 393-400.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D. & Johansen, L. K. (2001). Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* 281 (1): 1-5.
- Cascone, P. J., Carpenter, C. D., Li, X. H. & Simon, A. E. (1990). Recombination between satellite RNAs of turnip crinkle virus. *EMBO J.* 9: 1709-1715
- Cascone, P. J., Haydar, T. F. & Simon, A. E.. (1993). Sequences and structures required for recombination between virus-associated RNAs. *Science* 260 (5109): 801-805
- Catchpole, G. S., Beckman, M., Enot, D. P., Mondhe, M., Zywicki, B., Taylor, J., Hardy, N., Smith, A., King, R. D., Kell, D. B., Fiehn, O. & Draper, J. (2005). Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (40): 14458-14462.
- Cavileer, T. D., Halpern, B. T., Lawrence, D. M., Podleckis, E. V., Martin, R. R. & Hillman, B. I. (1994). Nucleotide sequence of the carlavirus associated with blueberry scorch and similar diseases. *Journal of General Virology* 75 (4): 711-720.
- Cervera, M. T., Riechmann, J. L., Martin, M. T. & Gracia, J. A. (1993). 3' -terminal sequence of the plum pox virus PS and o6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology* 74 (3): 329-334.
- Chachulska, A. M., Chrzanowska, M., Robaglia, C. & Zagórski, X. (1997). Tobacco vein necrosis determinants are unlikely to be located within the 5' and 3' terminal sequences of the potato virus Y genome. *Archives of Virology* 142 (4): 765-779.
- Chakraborty, S., Chakraborty, N. & Datta, A. (2000). Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (7): 3724-3729.
- Chalcroft, J. P. & Matthews, R. E. F. (1966). Cytological changes induced by turnip yellow mosaic virus infections. *Virology* 28: 555-562.

Chalcroft, J. P. & Matthews, R. E. F. (1967a). Virus strains and leaf ontogeny as factors in the production of leaf mosaic patterns by turnip yellow mosaic virus. *Virology* 33 (1): 167-171.

Chalcroft, J. P. & Matthews, R. E. F. (1967b). Role of virus strains and leaf ontogeny in the production of mosaic patterns by turnip yellow mosaic virus. *Virology* 33 (4): 659-673.

Chan, M. T., Chen, L. J. & Chang, H. H. (1996). Expression of *Bacillus thuringiensis* (B.t.) insecticidal crystal protein gene in transgenic potato. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 37: 17-23.

Chapman, S., Hills, G., Watts, J. & Baulcombe, D. C. (1992). Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* 191 (1): 223-230.

Chay, C. A., Gunasinge, U. B., Dinesh Kumar, S. P., Miller, W. A. & Gray, S. M. (1996). Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow draft luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and the 17-kDA protein, respectively. *Virology* 219 (1): 57-65.

Che, X., Mawassi, M. & Bar-Joseph, M. (2002). A novel class of large and infectious defective RNAs of citrus tristeza virus. *Virology* 298 (1): 133-145.

Chen, I. H., Chou, W. J., Lee, P. Y., Hsu, Y. H. & Tsai, C. H. (2005). The AAUAAA motif of bamboo mosaic virus RNA is involved in minus-strand RNA synthesis and plus-strand RNA polyadenylation. *Journal of Virology* 79, 14555-14561.

Chen, J., Chen, J. & Adams, M. J. (2001). A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology* 146 (4): 757-766.

Chen, Y. K., Goldbach, R. & Prins, M. (2002). Inter- and intramolecular recombinations in the cucumber mosaic virus genome related to adaption to *Alstroemeria*. *Journal of Virology* 76 (8): 4119-4124.

Cheng, C. P. & Tsai, C. H. (1999). Structural and functional analysis of the 3'-untranslated region of bamboo mosaic potexvirus genomic RNA. *J. Mol. Biol.* 288 (4): 555-565.

Cheng, C. P. & Nagy, P. D. (2003). Mechanism of RNA recombination in carmo- and tombusviruses: Evidence for template switching by the RNA-dependent RNA polymerase in vitro. *Journal of Virology* 77 (22): 12033-12047.

Choi, I. R.; Stenger, D. C. & French, R. (2000). Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritimovirus. *Virology* 267 (2): 185-198

Choi, I. R., Hall, J. S., Henry, M., Zhang, L., Hein, G. L., French, R. & Stenger, D. C. (2001). Contributions of genetic drift and negative selection on the evolution of three strains of wheat streak mosaic tritimovirus. *Archives of Virology* 146 (3): 619-628.

Choi, I.-R., Horken, K. M., Stenger, D. C. & French, R. (2005). An internal RNA element in the P3 cistron of wheat streak mosaic virus revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *Journal of General Virology* 86: 2605-2614.

Choi, S. A. & Ryu, K. H. (2003). The complete nucleotide sequence of the genome RNA of lily symptomless virus and its comparison with that of other carlaviruses. *Archives of Virology* 148 (10): 1943-1955.

Chrzanowska, M. (1991). New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. *Potato Research* 34 (2): 179-182.

Chrzanowska, M. (1994). Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathol. Pol.* 8: 15-20.

Chrzanowska, M., Kerlan, C. & Zagorska, H. (1998). Resistance of polish potato cultivars to PVY<sup>N</sup> strains. In: Proceedings of the 10th EAPR Virology Section meeting. 56-61

Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34(3): 475-483

Coffin, J. M. (1978). Structure, replication and recombination of retrovirus genomes. Some unifying hypotheses. *Journal of General Virology* 42 (1):1-26

Cooper, B., Schwitz, I., Rao, A. L. N., Beachy, R. N. & Dodds, J. A. (1996). Cell-to-cell transport of movement-defective cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in transgenic plants expressing heterologous movement protein genes. *Virology* 216 (1): 208-213.

Cooper, P. D., Steiner-Pryor, A., Scotti, P. D. & DeLong, D. (1974). On the nature of poliovirus genetic recombinants. *Journal of General Virology* 23 (1): 41-49.

Cowan, G. H., Lioliopoulou, F., Ziegler, A. & Torrance, L. (2002). Subcellular localisation, protein interactions and RNA binding of Potato mop-top virus triple gene block proteins. *Virology* 298 (1): 106-115.

Cowgill, S. E., Wright, C. & Atkinson, H. J. (2002). Transgenic potatoes with enhanced levels of nematode resistance do not have altered susceptibility to nontarget aphids. *Mol. Ecol.* 11 (14): 821-827.

Crosslin, J. M., Hamm, P. B., Shiel, P. J., Hane, D. C., Brown, C. R. & Berger, P. H. (2005). Serological and molecular detection of tobacco vein necrosis isolates of potato

## Literaturverzeichnis

---

- virus Y (PVY<sup>N</sup>) from potatoes grown in the western United States. *Am. J. Potato Res.* 82: 263-269.
- Cruz, S. S., Chapman, S., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A. M. & Oparka, K. J. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (13): 6286-6290.
- Dagless, E. M., Shintaku, M. H., Nelson, R. S. & Foster, G. D. (1997). A CaMV 35S promoter driven cDNA clone of tobacco mosaic virus can infect host plant tissue despite being un Infectious when manually inoculated onto leaves. *Archives of Virology* 142 (1): 183-191.
- Davenport, G. F. & Baulcombe, D. C. (1997). Mutation of the GKS motif of the RNA - dependent RNA polymerase from potato virus X disables or eliminates virus replication. *Journal of General Virology* 78 (6): 1247-1251.
- Davies, C., Hills, G. & Baulcombe, D. C. (1993). Sub-cellular localization of the 25-kDa protein encoded in the triple gene block of potato virus X. *Virology* 197 (1): 166-175.
- Dawson, W. O., Beck, D. L., Knorr, D. A. & Grantham, G. L. (1986). cDNA cloning of the complete genome of Tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1): 1832-1836.
- De Bokx, J. A. & Huttinga, H. (1981). Potato virus Y No.242 In: Description of plant viruses. *Common Mycol. Inst/Assoc. Appl. Biol.* 242 Kew, Surrey.
- Deng, L. & Shuman, S. (1997). Elongation properties of vaccinia virus RNA polymerase: pausing, slippage, 3' end addition and termination site choice. *Biochemistry* 36 (50): 15892-15899.
- Deom, C.M., Lapidot, M. & Beachy, R. N. (1992). Plant virus movement proteins. *Cell* 69: 221-224
- Divéki, Z., Salánki, K. & Balázs, E. (2002). Limited utility of blue fluorescent protein in monitoring plant virus movement. *Biochimie* 84 (10): 997-1002.
- Dietrich, C. & Maiss, E. (2003). Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of General Virology* 84 (10): 2871-2876.
- Dolja, V. V. & Koonin, E. V. (1991). Phylogeny of capsid proteins of small icosahedral RNA plant viruses. *Journal of General Virology* 72 (7): 1481-1486.
- Dolja, V. V., Karasev, A. V. & Koonin, E. V. (1994). Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 261-285.

Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandebosch, K. A. & Carrington, J. C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206 (2): 1007-1016.

Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C., Martin-Hernandez, A. M., Saiz, J. C. & Escarmis, C. (1998). Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 521-527.

Donald, R. G. K., Lawrence, D. M. & Jackson, A. O. (1997). The barley stripe mosaic virus 58-kilodalton  $\beta$ b protein is a multifunctional RNA binding protein. *Journal of Virology* 71 (2): 1538-1546.

Donini, M., Lico, C., Baschieri, S., Conti, S., Magliani, W., Polonelli, L. & Benvenuto, E. (2005). Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a potato virus X expressing system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (10): 6360-6367.

Dore, J. M., Erny, C. & Pinck, L. (1990). Biologically active transcripts of alfalfa mosaic virus RNA3. *FEBS Lett.* 264 (2): 183-186.

Doronin, S. V. & Hemenway, C. (1996). Synthesis of potato virus X RNAs by membrane-containing extracts. *J. Virol.* 70 (7): 4795-4799.

Dougherty, W. G. & Carrington, J. C. (1988). Expression and function of potyviral gene products. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 123-143

Dubnik, H. (1991). Blattläuse. Artenbestimmung - Biologie - Bekämpfung. *Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen - Buer.*

Düring, K., Porsch, P., Fladung, M. & Lörz, H. (1993). Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal* 3: 587-598.

Düring, K. (1996). Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. *Mol. Breed.* 2 (4): 297-305.

Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S. & Robaglia, C. (2002). The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* 32: 927-934.

Edelman, J. & Jefford, T. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Heliantus tuberosus*. *New Phytol.* 67: 517-531.

Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19: 1349.

Eggen, R., Verver, J., Wellink, J., de Jong, A., Goldbach, R. & Van Kammen, A. (1989). Improvements of the infectivity of in vitro transcripts from cloned cowpea mosaic virus cDNA: impact of terminal nucleotide sequences. *Virology* 173 (2): 447-455.

Eigen, M. (1996). On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol.* 4: 216-217.

Erhardt, M., Herzog, E., Lauber, E., Fritsch, C., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Bouzoubaa, S. (1999a). Transgenic plants expressing the TGB1 of peanut clump virus complement movement of TGB1-defective peanut clump virus but not of TGB1-defective beet necrotic yellow vein virus. *Plant Cell Rep.* 18 (7-8): 614-619

Erhardt, M., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. and Bouzoubaa, S. (1999b). The first triple gene block protein of peanut clump virus localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology* 264 (1): 220-229

Erhardt, M., Morant, M., Ritzenthaler, C., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., Bouzoubaa, S. & Gilmer, D. (2000). P42 movement protein of beet necrotic yellow vein virus is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (5): 520-528.

Eskandari, F., Sylvester, E. S. & Richardson, J. (1979). Evidence for lack of propagation of Potato leafroll virus in its aphid vector *Myzus persicae*. *Phytopathology* 69 (1): 45-47.

Fairman, M. E., Maroney, P. A., Wang, W., Bowers, H. A., Gollinck, P., Nilsen, T. W. & Jankowsky, E. (2004). Protein displacement by DExH/D "RNA helicases" without duplex unwinding. *Science* 304 (5671): 730-734.

Falk, B. W. & Bruening, G. (1994). Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? *Science* 263 (5152): 1395-1396.

Fedorkin, O. N., Mertis, A., Lucchesi, J., Solovyev, A. G., Saarma, M., Morozov, S. Y. & Mäkinen, K. (2000). Complementation of the movement-deficient mutations in potato virus X: potyvirus coat protein mediates cell-to-cell trafficking of C-terminal truncation but not deletion mutant of potexvirus coat protein. *Virology* 270 (1): 31-42.

Fedorkin, O. N., Solovyev, A. G., Yelina, N. E., Zamyatnin, A. A., Jr, Zinovkin, R. A., Mäkinen, K., Schiemann, J. & Morozov, S. Yu. (2001). Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein. *Journal of General Virology* 82 (2): 449-458.

Fellers, J. P., Tremblay, D., Handest, M. F. & Lommel, S. A. (2002). The potato virus Y M<sup>SN</sup>R N1b - replicase is the elicitor of a veinal necrosis - hypersensitive response in root knot nematode resistant tobacco. *Molecular Plant Pathology* 3 (3): 145-152.

- Fernandez-Cuartero, B., Burgyan, M. A., Aranda, M. A., Salanki, E., Moriones, E. & Gracia-Arenal, F. (1994). Increase in the relative fitness of a plant virus RNA associated with its recombinant nature. *Virology* 203 (2): 373-377.
- Fernández, A., Laín, S. & García, J. A. (1995). RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Research* 23 (8): 327-332.
- Figlerowicz, M., Nagy, P. D. & Bujarski, J. J. (1997). A mutation in the putative RNA polymerase gene inhibits nonhomologous, but not homologous, genetic recombination in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94 (5): 2073-2078.
- Figlerowicz, M. & Bujarski, J. J. (1998). RNA recombination in brome mosaic virus, a model plus strand RNA virus. *Acta Biochimica Polonica* 45 (4): 847-868.
- Forster, R. L. S., Beck, D. L., Guilford, P. J., Voot, T. M., Vandolleweerd, C. J. & Anderson, M. T. (1992). The coat protein of white clover mosaic potyvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology* 191 (1): 480-484.
- Foster, G. D., Meehan, B. M. & Mills, P. R. (1990). A comparison of the nucleotide sequence homologies between isolates of the andean and ordinary strains of potato virus S and their relationship to other carlaviruses. *Virus Genes* 4 (3): 257-260.
- Foster, G. D. & Mills, P. R. (1991). Occurrence of chloroplast ribosome recognition sites with conserved elements of the RNA genomes of carlaviruses. *FEBS Lett.* 280: 341-343.
- Foster, G. D. (1992). The structure and expression of the genome of carlaviruses. *Res. Virol.* 143: 103-112.
- Foster, G. D. & Mills, P. R. (1992). Translation of Potato virus S RNA in vitro: evidence of protein processing. *Virus Genes* 6 (1): 47-52.
- Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K. & Angell, S. (2003). Tip, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of potato virus X. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (2): 132-140.
- Fuji, S., Yamamoto, H., Inoue, M., Yamashita, K., Fukui, Y., Furuya, H. & Naito, H. (2002). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Aconitum latent virus (genus Carlavirus) isolated from *Delphinium* sp. *Archives of Virology* 147 (4): 865-870.
- Fujisawa, I., Matsui, C. & Yamaguchi, A. (1967). Inclusion bodies associated with sugar beet mosaic. *Phytopathology* 57: 210-213
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., Raccach, B. (1991). Infectious in vitro RNA transcripts derived from cloned cDNA of the cucurbit potyviruses, Zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Virology* 72 (11): 2639-2644

Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W. J., Raccah, B. & Gaba, V. (1995). Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. *Journal of General Virology* 76 (12): 3223-3227.

Gal-On, A., Meiri, E., Raccah, B. & Gaba, V. (1998). Recombination of engineered defective RNA species produces infective potyvirus in planta. *Journal of Virology* 72 (6): 5268-5270.

García-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Ann. Rev. Phytopathol* 39: 157-186.

Garcia, J. A., Lain, S., Cervera, M.T., Riechmann, J.L. & Martin, M.T. (1990). Mutational analysis of plum pox potyvirus polyprotein processing by the NIa protease in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* 71: 2773-2779.

Gibbs M. J. (1994). Risks in using transgenic plants? *Science* 264: 1650-1651

Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. & Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108 (4): 975-982.

Gilmer, D. B., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H.; Richards, K., & Jonard, G. (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* 189 (2): 40-47.

Glais, L., Kerlan, C., Tribodet, M., Astier-Manifacier, S. & Robaglia, C. (1996). Molecular characterization of potato virus Y<sup>N</sup> isolates by PCR-RFLP: Differentiation of PVY<sup>N</sup> isolates by PCR-RFLP. *Eur. J. Plant Pathol.* 102 (7): 655-662.

Glais, L., Tribodet, M., Gauthier, J. P., Astier-Manifacier, S., Robaglia, C. & Kerlan, C. (1998). RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. *Archives of Virology* 143 (11): 2077-2091.

Glais, L., Tribodet, M. & Kerlan, C. (2002). Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY<sup>NW</sup> and PVY<sup>NTN</sup> variants are single to multiple recombinants between PVY<sup>O</sup> and PVY<sup>N</sup> isolates. *Archives of Virology* 147 (2): 363-378.

Glais, L., Tribodet, M. & Kerlan, C. (2005). Specific detection of the PVY<sup>N</sup>-W variant of potato virus Y. *Journal of Virological Methods* 125 (2): 131-136.

Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Moury, B., Kúdela, O. & Quiot, J. B. (2002). Molecular variability of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct isolates of Plum pox virus. *Arch. Virol.* 147: 563-575

Goodman, R. M. & Ross, A. F. (1974). Enhancement of potato virus X synthesis in doubly infected tobacco occurs in doubly infected cells. *Virology* 58 (1): 16-24.

Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are



probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.* 235: 16-24.

Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Blinov, V. M. & Koonin, E. V. (1989a). Cystein proteinases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett.* 243: 103-114.

Gorbalenya, A. E., Blinov, V. M., Donchenko, A. P. & Koonin, E. V. (1989b). An NTP-binding motif is the most conserved sequence in a highly diverged monophyletic group of proteins involved in positive strand RNA viral replication. *Journal of Molecular Evolution* 28 (3): 256-268.

Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. (1989). Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Research* 17: 8413-8440

Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biology* 3: 419-429.

Goulden, M. G., Koehm, B. A., Cruz, S. S., Kavanagh, T. A. & Baulcombe, D. C. (1993). A feature of the coat protein of potato virus X affects both induced virus resistance in potato and viral fitness. *Virology* 197 (1): 293-302.

Govier, D. A., Kassanis, B. & Pirone, T. P. (1977). Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* 78 (1): 306-314.

Gramstat, A., Courtpozanis, A. & Rhode, W. (1990). The 12 kDa protein of potato virus M displays properties of a nucleic acid binding protein. *FEBS Lett.* 276, 38.

Gramstat, A., Prüfer, D. & Rohde, W. (1994). The nucleic acid-binding zinc finger protein of potato virus M is translated by internal initiation as well as by ribosomal frameshifting involving a shifty stop codon and a novel mechanism of P-site slippage. *Nucleic Acids Research.* 22 (19): 3911-3917.

Gray, D. H., Hiebert, E., Lin, C. M., Compton, M. E., McColley, D. W., Harrison, R. J. & Gaba, V. P. (1994). Simplified construction and performance of a device for particle bombardment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 37 (2): 179-184.

Gray, S. & Gildow, F. E. (2003). Luteovirus-aphid interactions. *Ann Rev Phytopathol* 41: 539-566.

Greene, A. E. & Allison, R. F. (1994). Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 263 (5152): 1423-1425.

Greene, A. E. & Allison, R. F. (1996). Deletions in the 3' untranslated region of Cowpea chlorotic mottle virus transgene reduce recovery of recombinant viruses in transgenic plants. *Virology* 225 (1): 231-234

- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T. & Walden, R. (1986). "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti-plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (10): 3282-3286.
- Guilford, P. J., Beck, D. L. & Forster, R. L. S. (1991). Influence of the poly (A) tail and putative polyadenylation signal on the infectivity of White clover mosaic potyvirus. *Virology* 182 (1): 61-67.
- Guo, D., Rajamäki, M. L., Saarma, M. & Valkonen, J. P. T. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology* 82 (4): 935-939.
- Guo, D., Spetz, C., Saarma, M. & Valkonen, J. P. T. (2003). Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HCpro. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16 (5): 405-410.
- Hall, J. S., French, R., Hein, G. L., Morris, T. J. & Stenger, D. C. (2001). Three distinct mechanisms facilitate genetic isolation of sympatric wheat streak mosaic virus lineages. *Virology* 282 (2): 230-236
- Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286 (5441): 950-952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21 (17): 4671-4679.
- Hampton, R.; Ball, E.; De Boer, S. (*Editors*) (1990). Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual. *American Phytopathological Society. St. Paul, Min.*
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harrison, B. D. (1984). Potato leafroll virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*: 291.
- Hasan, H. (2004). Generation of an infectious beet mosaic virus (BtMV) full-length clone based on the complete nucleotide sequence of a German isolate. Dissertation an der Universität Hannover
- Hassairi, A., Masmoudi, K., Albouy, J., Robaglia, C., Jullien, M. & Ellouz, R. (1998). Transformation of two potato cultivars 'Spunta' and 'Claustar' *Solanum tuberosum* with lettuce mosaic virus coat protein gene and heterologous immunity to potato virus Y. *Plant Science* 136 (1): 31-46.
- Hataya, T., Uchino, K., Arimoto, R., Suda, N., Sano, T., Shikata, E. & Uyeda, I. (2000). Molecular characterization of hop latent virus and phylogenetic relationships among viruses closely related to carlaviruses. *Archives of Virology* 145 (12): 2503-2524.

- Hataya, T., Arimoto, R., Suda, N. & Uyeda, I. (2001). Molecular characterization of hop mosaic virus: its serological and molecular relationship to hop latent virus. *Archives of Virology* 146 (10): 1935-1948.
- Haupt, S., Stroganova, T., Ryabov, E., Kim, S. H., Fraser, G., Duncan, G., Mayo, M. A., Barker, H. & Taliansky, M. (2005). Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *Journal of General Virology* 86 (10): 2891-2896.
- Haylor, M. T., Brunt, A. A. & Coutts, R. H. (1990). Conservation of the 3' terminal nucleotide sequence in five carlaviruses. *Nucleic Acids Research* 18: 6127.
- Hefferon, K. L., Khalilian, H. & Abouhaidar, M. G. (1997). Expression of the PVY<sup>O</sup> coat protein (CP) under the control of the PVX CP gene leader sequence: protection under greenhouse and field conditions against PVY<sup>O</sup> and PVY<sup>N</sup> infection in three potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 94 (2): 287-292.
- Hefferon, K. L., Doyle, S. & Abouhaidar, M. G. (1997b). Immunological detection of the 8K protein of potato virus X (PVX) in cell walls of PVX-infected tobacco and transgenic potato. *Archives of Virology* 142 (2): 425-433.
- Hefferon, K. L., Xu, J. & Abouhaidar, M. G. (2000). Identification and *in vivo* expression of a procaryotic-like ribosome recognition sequence upstream of the coat protein gene of potato virus X. *Archives of Virology* 145 (5): 945-956.
- Heitefuss, R., König, K., Obst, A. & Reschke, M. (1993) Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau. 3. Auflage, Verlagsunion Agrar
- Hellwege, E. M., Czapla, S., Jahnke, A., Willmitzer, L. & Heyer, A. G. (2000). Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (15): 8699-8704.
- Henderson, J., Gibbs, M. J., Edwards, M. L., Clarke, V. A., Gardner, K. A. & Cooper, J. I. (1992). Partial nucleotide sequence of Poplar mosaic virus RNA confirms its classification as a carlavirus. *Journal of General Virology* 73 (7): 1887-1890.
- Hendry, G. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.* 123 (1): 3-14.
- Herzog, E., Hemmer, O., Hauser, S., Meyer, G., Bounzoubaa, S. & Fritsch, C. (1998). Identification of genes involved in replication and movement of peanut clump virus. *Virology* 248 (2): 312-322.
- Hillman, B. I. & Lawrence, D. M. (1995) Carlaviruses. In: Singh, R. P., Singh, U. S. & Kohmoto, K. Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Pergamon, London., 35-50.
- Hirst, G. K. (1962). Genetic recombination in the Newcastle disease virus, poliovirus and influenza. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 27: 303-309.

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. & Schilpoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.

Hoffmann, G. M., Niehaus, F., Poehling, H. M., Schönbeck, F. Weltzien, H. C. & Wilbert, H. (1994) Lehrbuch der Phytomedizin, 3. Auflage. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin

Howard, A. R., Heppler, M. L., Ju, H. J., Krishnamurthy, K., Payton, M. E. & Verchot-Lubicz, J. (2004). Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology* 328 (2): 185-197.

Hsu, H. T., Hsu, Y. H., Bi, I. P., Lin, N. S. & Chang, B. Y. (2004). Biological functions of the cytoplasmic TGBp1 inclusions of bamboo mosaic potexvirus. *Archives of Virology* 149: 1027-1035.

Huang, C. Y., Huang, Y. L., Meng, M., Hsu, Y. H. & Tsai, C. H. (2001). Sequences at the 3' untranslated region of the bamboo mosaic potexvirus RNA interact with the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology* 75: 2818-2824.

Huisman, M. J., Linthorst, H. J. M., Bol, J. F. & Cornelissen, B. J. C. (1988). The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus - stranded RNA viruses. *Journal of General Virology* 69 (8): 1789-1798.

Huisman, M. J., Jongedijk, E., Posthumus-Lutke Willink, D., van der Wilk, F. & Cornelissen, B. J. C. (1992). Molecular breeding for virus resistant potato plants. *Neth. J. Pl. Path.* 98: 29-36.

Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. 4<sup>th</sup> edn. Academic Press San Diego

Hull, R. & Plaskitt, A. (1970). Electron microscopy on the behavior of two strains of alfalfa mosaic virus in mixed infections. *Virology* 42 (3): 773-776

Hunius, W. (1971) *Verwertungsgerechter Kartoffelbau*. DLG-Verlag, Frankfurt (Main)

Itaya, N. N., Buckeridge, M. S. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. (1997). Biosynthesis *in vitro* of high-mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *New Phytol.* 136 (1): 53-60.

Jager, J. & Pata, J. D. (1999). Getting a grip: polymerases and their substrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 21-28.

Jakab, D., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D. & Malnoe, P. (1997). Infectious *in vivo* and *in vitro* transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *Journal of General Virology* 78: 3141-3145

- Janda, M., French, R. & Ahlquist, P. (1987). High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions of transcript infectivity. *Virology* 158 (1): 259-262.
- Jarvis, T. C. & Kirkegaard, K. (1991). The polymerase in its labyrinth: mechanisms and implications of RNA recombination. *Trends Genet.* 7: 186-191.
- Jenner, C. E., Tomimura, K., Ohshima, K., Hughes, S. L. & Walsh, J. A. (2002). Mutations in turnip mosaic virus P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* 300 (1): 50-59.
- Jenner, C. E., Wang, X., Tomimura, K., Ohshima, K., Ponz, F. & Walsh, J. A. (2003). The dual role of the potyvirus P3 protein of turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (9): 777-784.
- Jeong, B. R. & Housley, T. L. (1992). Purification and characterization of wheat  $\beta$  (2,1) fructan: Fructan fructosyl transferase activity. *Plant Physiology* 100 (1): 199-204.
- Jonczyk, M., Borodynko, N. & Pospieszny, H. (2004). Restriction analysis of genetic variability of Polish isolated of *Tomato black ring virus*. *Acta Biochimica Polonica* 51 (3): 673-681.
- Jones, R. A. C. (1990). Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Ann. Appl. Biol.* 117 (1): 93-106.
- Ju, H. J., Samuels, T. D., Wang, Y.-S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R. S. & Verchot-Lubicz, J. (2005). The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiology* 138 (4): 1877-1895.
- Kalinina, N. O., Fedorkin, O. N., Samuilova, O. V., Maiss, E., Korpela, T., Morozov, S. Yu. & Atabekov, J. G. (1996). Expression and biochemical analyse of the recombinant potato virus X 25K movement protein. *FEBS Letters* 397 (1): 75-78.
- Kalinina, N. O., Rakitina, D. A., Yelina, N. E., Zamyatnin, A. A., Stroganova, T. A., Klinov, D. V., Prokhorov, V. V., Ustinova, S. V., Chernov, B. K., Schiemann, J., Solovyev, A. G. & Morozov, S. Y. (2001). RNA-binding properties of the 63-kDa protein encoded by triple gene block of poa semilattent hordeivirus. *Journal of General Virology* 82 (10): 2569-2578.
- Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Solovyev, A. G., Schiemann, J. & Morozov, S. Yu. (2002). RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology* 296 (2): 321-329.
- Kamer, G. & Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research* 12: 7269-7282.

- Kaniewski, W., Lawson, G., Sammons, B., Haley, L., Hart, J., Delannay, X. & Turner, N. E. (1990). Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. *Biotechnology* 8, 750-754.
- Kasschau, K. D., Cronin, S. & Carrington, J. C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228 (2): 251-262.
- Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95 (4): 461-470.
- Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (2001). Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* 285 (1): 71-81.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. & Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* 4 (2): 205-217.
- Keese, P., Martin, R. R., Kawchuk, L. M., Waterhouse, P. M. & Gerlach, W. L. (1990). Nucleotide sequences of an Australian and a Canadian isolate of Potato leafroll luteovirus and their relationships with two European isolates. *Journal of General Virology* 71 (3): 719-724.
- Kekarainen, T., Mertis, A., Oruetxebarria, I., Rajamäki, M.-L. & Valkonen, J. P. T. (1999). Comparison of the complete sequences of five different isolates of potato virus A (PVA), genus Potyvirus. *Archives of Virology* 144 (12): 2355-2366.
- Keller, E. R., Hanus, H. & Heyland, K. U. (1999). "Handbuch des Pflanzenbaues." Knollen und Wurzelfrüchte, Körner und Futterleguminosen. Verlag Eugen Ulmer GmbH und Co.
- Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L. & Guillet, M. (1999). Variability of potato virus Y in potato crops in France. *Journal of Phytopathology* 147 (11-12): 643-651.
- Khatchikian, D., Orlich, M. & Rott, R. (1998). The increased pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into hemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* 340: 156-157.
- Killick, R. J. (1979). The effect of infection with potato leafroll virus (PLRV) on yield and some of its components in a variety of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology* 91 (1): 67-74.
- Kim, M. J. & Kao, C. (2001). Factors regulating template switch *in vitro* by viral RNA-dependent RNA polymerases: Implications for RNA-RNA recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (9): 4972-4977.

Kim, K. H., Kwon, S. J. & Hemenway, C. (2002). Cellular protein binds to sequences near the 5' terminus of potato virus X RNA that are important for virus replication. *Virology* 301 (2): 305-312

Kiselyova O. I., Yaminsky, I. V., Karpova, O. V., Rodionova, N. P., Kozlovsky, S. V., Arkhipenko, M. V. & Atabekov, J. G. (2003). AFM study of potato virus X disassembly induced by movement protein. *J. Mol. Biol.* 332 (2): 321-325

Klein, P. G., Klein, R. R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A. G. & Shaw, J. G. (1994). Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204 (2): 759-769.

Klug, A. & Rhodes, D. (1987). Zinc fingers: a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem. Sci.* 12: 464-469.

Knipp, G. & Honermeier, B. (2006). Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *Journal of Plant Physiology* 163 (4): 392-397.

Kobayashi, K., Cabral, S., Calamante, G., Maldonado, S. & Mentaberry, A. (2001). Transgenic tobacco plants expressing the potato virus X open reading frame 3 gene develop specific resistance and necrotic ring symptoms after infection with the homologous virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (11): 1274-1285.

Kobayashi, K., Sarrobert, C., Ares, X., Rivero, M. M., Maldonado, S., Robaglia, C. & Mentaberry, A. (2004). Over-expression of potato virus X TGBp1 movement protein in transgenic tobacco plants causes developmental and metabolic alterations. *Plant Physiology and Biochemistry* 42 (9): 731-738.

Koenig, R. & Lesemann, D.-E. (1989). Potato virus X. *CMI/AAB. Description of Plant Viruses* 354.

Koenig, R., Lesemann, D.-E., Engelmann, J., Commandeur, U., Deml, G., Schiemann, J., Aust, H. & Burgermeister, W. (2006). Zygocactus virus X-based expression vectors and formation of rod-shaped virus-like particles in plants by the expressed coat proteins of beet necrotic yellow vein virus and soil-borne cereal mosaic virus. *Journal of General Virology* 87 (2): 439-443.

Kok-Jacon, G. A., Vincken, J. P., Suurs, L. C. J. M., Wang, D., Liu, S. & Visser, R. G. F. (2005). Production of dextran in transgenic potato plants. *Transgenic Research* 14 (4): 385-395.

Kondrák, M., Kutas, J., Szenthe, B., Patthy, A., Bánfalvi, Z., Nádasy, M., Gráf, L. & Asbóth, B. (2005). Inhibition of Colorado potato beetle larvae by a locust proteinase inhibitor peptide expressed in potato. *Biotechnology Letters* 27 (12): 829-834.

Koonin, E. V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 72 (9): 2197-2206.

- Koonin, E. V. & Dolja, V. V. (1993). Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 375-430.
- Koops, A. J. & Jonker, H. H. (1994). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* "Columbia" fructan:fructan 1-fructosyl transferase. *J. Exp. Bot.* 45 (280): 1623-1631.
- Koops, A. J. & Jonker, H. H. (1996). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Columbia: II. Purification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and recombination of fructan synthesis in vitro with purified SST and FFT. *Plant Physiology* 110 (4): 1167-1175.
- Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A. & Darst, S. A. (2000). A structural model of transcription elongation. *Science* 289 (5479): 619-625.
- Krishnamurthy, K., Mitra, R., Payton, M. E. & Verchot-Lubicz, J. (2002). Cell-to-cell movement of the PVX 12K, 8K, or coat proteins may depend on the host, leaf developmental stage and the PVX 25 K protein. *Virology* 300 (2): 269-281.
- Krishnamurthy, K., Heppler, M. L., Mitra, R., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R. S. & Verchot-Lubicz, J. (2003). The potato virus X TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology* 309 (1): 135-151.
- Kuipers, A. G. J., Soppe, W. J. J., Jacobsen, E. & Visser, R. G. F. (1994). Field evaluation of transgenic potato plants expressing an antisense granule-bound starch synthase gene: increase of the antisense effect during tuber growth. *Plant Mol. Biol.* 26 (6): 1759-1773.
- Kuipers, G. J., Vreem, J. T. M., Meyer, H., Jacobsen, E., Feenstra, W. J. & Visser, R. G. F. (1991). Field evaluation of antisense RNA mediated inhibition of GBSS gene expression in potato. *Euphytica* 59 (1): 83-91.
- Kujawa, A. B., Dugeon, G., Hulanicka, D. & Haenni, A. L. (1993). Structural requirements for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA-dependent RNA polymerase of potato leafroll virus. *Nucleic Acids Research* 21 (9): 2165-2171.
- Kürzinger, W. (1997). "Die Erzeugung von Pflanzkartoffeln." AgriMedia, Holm.
- Kwon, S. J., Park, M. R., Kim, K. W., Plante, C. A., Hemenway, C. L. & Kim, K. H. (2005). cis-acting sequences required for coat protein binding and in vitro assembly of Potato virus X. *Virology* 334 (1), 83-97.
- Lai, M. M. (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 61-79.



Laín, S., Riechmann, J. L. & Garcia, J. A. (1990). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* 18: 7003-7006.

Laín, S., Martin, M. T., Riechmann, J. L. & Gracia, J. A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *Journal of Virology* 65: 1-6.

Lampel, G. (1968). Die Biologie des Blattlaus-Generationswechsels. *Gustav Fischer Verlag, Jena*.

Langenberg, W. G. & Zhang, L. (1997). Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J. Struct. Biol.*, 118 (3): 243-247.

Lauber, E., Bleykasten-Grosshans, C., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Jonard, G., Richards, K. E. & Guilley, H. (1998). Cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus. I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11, (7): 618-625.

Lawrence, D. M. & Hillman, B. I. (1994). Synthesis of infectious transcripts of blueberry scorch carlavirus *in vitro*. *Journal of General Virology* 75 (9): 2509-2512.

Lawrence, D. M., Rozanov, M. N. & Hillman, B. I. (1995). Autocatalytic processing of the 223-kDa protein of blueberry scorch carlavirus by a papain-like proteinase. *Virology* 207 (1): 127-135.

Lawson, G., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P. & Turner, N. E. (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology* 8: 127-134.

Leclerc, Y., Donnelly, D. J., Coleman, W. K. & King, R. R. (1995). Microtuber dormancy in three potato cultivars. *American Pot. J.* 72 (4): 215-223.

Ledinko, N. (1963). General recombination in the poliovirus type 1 studies of crossovers between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine-resistant mutants of the same strain. *Virology* 20: 107-119.

Lee, B. Y., Choi, S. H. & Ryu, K. H. (2003). Characterization of the 3'-terminal nucleotide sequence of two Korean isolates of daphne virus S support its placement as a distinct species of the genus Carlavirus. *Archives of Virology* 148: 1915-1924.

Lee, B. Y., Min, B. E., Ha, J. H., Lee, M. Y., Paek, K. H. & Ryu, K. H. (2006). Genome structure and complete sequence of genomic RNA of daphne virus S. *Archives of Virology*. 151 (1): 193-200

- Lee, L., Kaplan, I. B., Ripoll, D. R., Liang, D., Palukaitis, P. & Gray, S. M. (2005). A surface loop of the potato leafroll virus coat protein is involved in virion assembly, systemic movement and aphid transmission. *Journal of Virology* 79 (2): 1207-1214.
- Lee, Y. S. & Ross, J. P. (1972). Top necrosis and cellular changes in soybean doubly infected by soybean mosaic virus and bean pod mottle viruses. *Phytopathology* 62 (8): 839-845
- Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (19): 9136-9140.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G. & Laliberte, J. F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* 74 (17): 7730-7737.
- Leonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M.G. & Laliberte, J.F. (2004). Interaction of VPg-Pro of turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J. Gen. Virol.* 85 (4): 1055-1063.
- Le Romancer, M., Kerlan, C. & Nedellec, M. (1994). Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y including superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology* 43 (1): 138-144.
- Le Romancer, M. & Nedellec, M. (1997). Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *Plant Pathology* 46 (1): 104-111.
- Levay, K. & Zavriev, S. K. (1991). Nucleotide sequence and gene organization of the 3'-terminal region of Chrysanthemum virus B genomic RNA. *Journal of General Virology* 72 (10): 2333-2338.
- Lewis, D. H. (1993). Nomenclature diagrammatic representation of oligomeric fructans: a paper for discussion. *New Phytol.* 124: 583-594.
- Lin, N. S., Hsu, Y. T. & Hsu, H. T. (1990). Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80 (9): 824-828
- Linder, P. (2003). Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. *Biol. Cell* 95 (3-4): 157-167.
- Lindner, K., Lesemann, D.-E., Vetten, H. J. & Flatken, S. (2004). Vorkommen von PVY-Stämmen und -Stammgruppen in Deutschland in Abhängigkeit von der Kartoffelsorte und der Anbauregion. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft* 369, 82-83

- Liu, L. & Lomonosoff, G. P. (2002). Agroinfection as a rapid method for propagating cowpea mosaic virus-based constructs. *Journal of Virological Methods* 105 (2): 343-348.
- Llave, C., Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (24): 13401-13406.
- Longstaff, M., Brigneti, G., Boccard, F., Chapman, S. & Baulcombe, D. (1993). Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO Journal* 12 (2): 379-386
- López-Moya, J. J. & Garcia, J. A. (2000). Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of Plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Res.* 68 (2): 99-107
- López-Moya, J. J., Wang, R. Y. & Pirone, T. P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J. Gen. Virology* 80(12): 3281-3288
- Lorenc-Kukula, K., Jafra, S., Oszmianski, J., Szopa, J. (2005). Ectopic expression of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in potato tuber causes increased resistance to bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 53: 272-281
- Lorenzen, J. H., Meacham, T., Berger, P. H., Shiel, P. J., Crosslin, J. M., Hamm, P. B. & Kopp, H. (2006). Whole genome characterization of potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. *Archives of Virology* 151: 1055-1074
- Lough, T. J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B., Hofstra, K. R., Beck, D. L., Balmori, E., Forster, R. L. S. & Lucas, W. J. (1998). Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(8): 801-814.
- Lough, T. J., Netzler, N. E., Emerson, S. J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D. L., Lucas, W. J. & Forster, R. L. S. (2000). Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant-Microbe Interaction* 13 (9), 962-974.
- Lough, T. J., Emerson, S. J., Lucas, W. J. & Forster, R. L. S. (2001). Trans-complementation of long-distance movement of white clover mosaic virus triple gene block protein (TGB) mutants: Phloem-associated movement of TGBp1. *Virology* 288 (1): 18-28.
- López-Moya, J. J., Wang, R. Y. & Pirone, T. P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J. Gen. Virol.* 80 (12): 3281-3288.

- Lu, R., Martin-Hernandez, A. M., Peart, J. R., Malcuit, I. & Baulcombe, D. C. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30 (4): 296-303.
- Lucas, W.J. & Wolff, S. (1999). Connections between virus movement, macromolecular signalling and assimilate allocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 192-197
- Lukhovilskaya, N. I., Solovyev, A. G., Koshkina, T. E., Zavriev, S. K. & Morozov, S. Yu. (2005). Interaction cysteine-rich protein of carlavirus with the plant defense system. *Molecular Biology* 39 (5): 896-904.
- Lüscher, M., Frenkel, M. J. & Nösberger, J. (1993). Purification and some properties of fructan:fructan fructosyltransferase from dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). *New Phytol.* 123: 437-442.
- Lüscher, M., Erdin, C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., Boller, T. & Wiemken, A. (1996). Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Lett.* 385 (1-2): 39-42.
- MacFarlane, S. A., Taylor, S. C., King, D. I., Hughes, G. & Davies, J. W. (1989). Pea early browning virus RNA1 encodes four polypeptides including a putative zinc-finger protein. *Nucleic Acids Research* 17 (6): 2246-2260.
- MacKenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S. & Green, M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81 (2): 222-226.
- MacKenzie, D. J., Tremaine, J. & Stace-Smith, R. (1989). Organization and interviral homologies of the 3'-terminal portion of potato virus S RNA. *Journal of General Virology* 70 (5): 1053-1063.
- Mahajan, S., Dolja, V. V. & Carrington, J. C. (1996). Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *J. Virol.* 70 (7): 4370-4379.
- Maia, I. G., Haenni, A.-L. & Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology* 77 (7): 1335-1341.
- Maia, I. G. & Bernardi, F. (1996). Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. *Journal of General Virology* 77 (5): 869-877.
- Maiss, E., Timpe, U., Briske, R. A., Lesemann, D. E. & Casper, R. (1992). Infectious in vivo transcripts of plum pox potyvirus full-length cDNA clone containing the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *Journal of General Virology* 73 (3): 709-713

- Maki-Valkama, T., Pehu, T., Santala, A., Valkonen, J. P. T., Koivu, K., Lehto, K. & Pehu, E. (2000). High level of resistance to potato virus Y expressing P1 sequence in antisense orientation in transgenic potato. *Molecular Breeding* 6 (1): 95-104.
- Mallory, A. C., Ely, L., Smith, T. H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V. B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13 (3): 571-583.
- Mallory, M.C., Mlotshwa, S., Bowman, L.H. & Vance, V. B. (2003). The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J.* 35: 82-92.
- Malnoe, P., Farinelli, L., Collet, G. & Reust, W. (1994). Small-scale field tests with transgenic potato cv. Bintje, to test resistance to primary and secondary infections with potato virus Y. *Plant Mol. Biol.* 25 (6): 963-975.
- Manske, U. & Schiemann, J. (2005). Development and assessment of potato virus X-based expression system with improved biosafety. *Environ. Biosafety Res.* 4 (1): 45-57.
- Marusic, C., Rizza, P., Lattanzi, L., Mancini, C., Spada, M., Belardelli, F., Benvenuto, E. & Capone, I. (2001). Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 75 (18): 8434-8439.
- Masuta, C., Ueda, S., Suzuki, M., Uyeda, I. (1998). Evolution of a quadripartite hybrid virus by interspecific exchange and recombination between replicase components of two related tripartite RNA viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (18): 10487-10492.
- Mayo, M. A., Barker, H., Robinson, D. J., Tamada, T. & Harrison, B. D. (1982). Evidence that potato leafroll virus RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. *Journal of General Virology* 59: 163-167.
- Mayo, M. A. & Jolly, C. A. (1991). The 5'-terminal sequence of potato leafroll virus RNA: evidence of recombination between virus and host RNA. *Journal of General Virology* 72 (10): 2591-2595.
- Mayo, M. A., Robinson, D. J., Jolly, C. A. & Hyman, L. (1989). Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *Journal of General Virology* 70 (5): 1037-1051.
- Mayo, M. A. & Ziegler Graff, V. (1996). Molecular biology of luteoviruses. *Adv. Virus Res.* 46: 413-460.
- Mayo, M. A. & Miller, W. A. (1999). The structure and expression of luteovirus genomes. In: Smith, H. G. & Barker, H. (Hrg). *The Luteoviridae*. CABI Publishing, Wallford, England, 23-67

## Literaturverzeichnis

---

- McKinney, H. H. (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agric. Res.* 39: 557-578.
- Meehan, B. M. & Mills, P. R. (1991a). Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of carnation latent virus. *Intervirology* 32 (4): 262-267.
- Meehan, B. M. & Mills, P. R. (1991b). Cell-free translation of carnation latent virus RNA and analysis of virus specific dsRNA. *Virus Genes* 5 (2): 175-181.
- Memelink, J., van der Vlugt, C. I. M., Linthorst, H. J. M., Derk, A. F. L. M., Asjes, C. J. & Bol, J. F. (1990). Homologies between the genomes of a carlavirus (lily symptomless virus) and a potyvirus (lily virus X) from lily plants. *Journal of General Virology* 71 (4): 917-924.
- Menzel, W. (2003). Entwicklung, Optimierung und Erprobung von Nachweisverfahren von Viren an Apfel und Untersuchungen zur Ätiologie der Gummiholzkrankheit (ARW), Dissertation an der Universität Hannover
- Merits, A., Guo, D. & Saarma, M. (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato virus A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *Journal of General Virology* 79 (12): 3123-3127.
- Merits, A. K., Rajamäki, M. L., Lindholm, P., Rundeberg-Roos, P., Kekkarainen, T., Puustinen, P., Mäkeläinen, K., Valkonen, J. P. T. & Saarma, M. (2002). Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *Journal of General Virology* 83 (5): 1211-1221.
- Mertis, A., Guo, D., Järvekülg, L. & Saarma, M. (1999). Biochemical and genetic evidence for interactions between potato virus A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* 263 (1): 15-22.
- Mestre, P., Brigneti, G., Durrant, M. C. & Baulcombe, D. C. (2003). Potato virus Y N1a protease activity is not sufficient for elicitation of *Ry*-mediated disease resistance in potato. *The Plant Journal* 36 (6): 755-761.
- Mette, M. F., Matzke, A. J. & Matzke, M. A. (2001). Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. *Curr. Biol.* 11 (14): 1119-1123.
- Miller, W. A., Brown, C. M. & Wang, S. (1997). New punctuation for the genetic code: luteovirus gene expression. *Seminars in Virology* 8: 3-13.
- Mindich, L., Qiao, X., Gottlieb, P. & Strassman, J. (1992). Heterologous recombination in the dsRNA bacteriophage φ6. *Journal of Virology* 66 (5): 2605-2610.
- Milne, R. G. & Lesemann, D. E. (1984). Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. *Methods in Virology* 8: 85-101

Milne, R.G. (1985). *The Plant Viruses*, Vol. 4. Filamentous Plant Viruses. New York: Plenum Press.

Missiou, A., Kalantidis, K., Boutla, A., Tzortzakaki, S., Tabler, M. & Tsagris, M. (2004). Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Molecular Breeding* 14 (2): 185-197.

Mitra, R., Krishnamurthy, K., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R. S. & Verchot-Lubicz, J. (2003). The potato virus X TGBp2 protein association with the endoplasmic reticulum plays a role in but is not sufficient for viral cell-to-cell movement. *Virology* 312 (1): 35-48.

Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M. F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S. W., Pruss, G. & Vance, V. B. (2002). RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell*, 14: 289-301

Moreno, I. M., Malpica, J. M., Diaz-Pendon, J. A., Moriones, E., Fraile & García-Arenal F. (2004). Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology* 318 (1): 451-460

Morozov, S. Yu., Lukasheva, L. I., Chernov, B. K., Skryabin, K. G. & Atabekov, J. G. (1987). Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in potato virus X genome. *FEBS Lett.* 213: 438-442.

Morozov, S. Yu., Dolja, V. V. & Atabekov, J. G. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *J. Mol. Evol.* 29 (1): 52-62.

Morozov, S. Yu., Miroshnichenko, N. A., Zelenina, D. A., Fedorkin, O. N., Solovijev, A. G., Lukasheva, L. I. & Atabekov, J. G. (1990a). Expression of RNA transcripts of potato virus X full-length and subgenomic cDNAs. *Biochimie* 72 (9): 677-684.

Morozov, S. Yu., Kanyuka, K., Levay, K. & Zavriev, S. K. (1990b). The putative RNA replicase of potato virus M: obvious sequence similarity with potex- and tymoviruses. *Virology* 179 (2): 911-914.

Morozov, S. Yu., Miroshnichenko, N. A., Solovyev, A. G., Fedorkin, O. N., Zelenina, D. A., Lukasheva, L. I., Karasev, A. V., Dolja, V. V. & Atabekov, J. G. (1991). Expression strategy of the potato virus X triple gene block. *Journal of General Virology* 72: 2039-2042.

Morozov, S. Yu., Fedorkin, O. N., Juttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D. C. & Atabekov, J. G. (1997). Complementation of a potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *Journal of General Virology* 78 (8): 2077-2083.

Morozov, S. Yu., Solovyev, A. G., Kalinina, N. O., Fedorkin, O. N., Samuilova, O. V., Schiemann, J. & Atabekov, J. G. (1999). Evidence for two nonoverlapping functional domains in the potato virus X 25K movement protein. *Virology* 260 (1): 55-63.

- Morozov, S. Yu. & Solovyev, A. G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* 84 (6): 1351-1366.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. & Jacquemond, M. (2004). Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17 (3): 322-329.
- Munzel, U. & Hothorn, L. A. (2001). An unified approach to simultaneous rank test procedures in the unbalanced one-way layout. *Biometrical Journal* 43: 553-559
- Murphy, J. F., Rychlik, W., Rhoads, R. E., Hunt, A. G. & Shaw, J. G. (1991). A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links to the viral RNA. *Journal of Virology* 65 (1): 511-513.
- Nagai, M., Sakoda, Y., Mori, M., Hayashi, M., Kida, H. & Akashi, H. (2003). Insertion of a cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Journal of General Virology* 84 (2): 447-452.
- Nagy, P. D. & Bujarski, J. J. (1993). Targeting the site of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus with antisense sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (14): 6390-6394.
- Nagy, P. D. & Bujarski, J. J. (1995). Efficient system of homologous RNA recombination in brome mosaic virus: sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. *Journal of Virology* 69 (1): 131-140.
- Nagy, P. D. & Bujarski, J. J. (1996). Homologous RNA recombination in brome mosaic virus: AU-rich sequences decrease the accuracy of crossovers. *Journal of Virology* 70 (1): 415-426.
- Nagy, P. D. & Bujarski, J. J. (1997). Engineering of homologous recombination hot spots with AU-rich sequences in brome mosaic virus. *Journal of Virology* 71: 3799-3810.
- Nagy, P. D., Dzianott, A., Ahlquist, P. & Bujarski, J. J. (1994). Effect of mutations in the helicase-like domain of 1a protein on RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. *Journal of Virology* 69: 2547-2556.
- Nagy, P. D. & Simon, A. E. (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235 (1): 1-9.
- Nagy, P. D., Ogiela, C. & Bujarski, J. J. (1999). Mapping sequences active in homologous RNA recombination in brome mosaic virus: prediction of recombination hot spots. *Virology* 254: 92-104.



- Naidu, R. A., Gowda, S., Satyanarayana, T., Boyko, V., Reddy, A. S., Dawson, W. O. & Reddy, D. V. R. (1998). Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus Carlavirus. *Archives of Virology* 143 (4): 769-780.
- Naylor, M., Reeves, J., Cooper, J. I., Edwards, M. L. & Wang, H. (2005). Construction and properties of a gene-silencing vector based on poplar mosaic virus (genus Carlavirus). *Journal of Virological Methods* 124 (1-2): 27-36
- Nicolaisen, M., Johansen, E., Poulsen, G. B. & Bokhardt, B. (1992). The 5' untranslated region from pea seedborne mosaic potyvirus RNA as a translational enhancer in pea and tobacco protoplasts. *FEBS Lett.* 303 (2-3): 169-172.
- Nicolaisen, M. & Nielsen, S. L. (2001). Analysis of the triple gene block and coat protein sequences of two strains of kalanchoe latent carlavirus. *Virus Genes* 22 (3): 265-270.
- Nicholas K B & Nicholas H B (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author
- Nie, X. & Singh, R. P. (2000). Detection of multiple potato viruses using an oligo (dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 86 (2): 179-185.
- Nie, X. & Singh, R. P. (2001). A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. *Journal of Virological Methods* 91 (1): 37-49.
- Nie, X. & Singh, R. P. (2002a). Probable geographical grouping of PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>NTN</sup> based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY<sup>NTN</sup>. *Journal of Virological Methods* 103 (2): 145-156.
- Nie, X. & Singh, R. P. (2002b). A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 104 (1): 41-54.
- Nie, X. & Singh, R. P. (2003a). Evolution of North American PVY<sup>NTN</sup> Strain Tu 660 from local PVY<sup>N</sup> by mutation rather than recombination. *Virus Genes* 26: 39-47.
- Nie, X. & Singh, R. P. (2003b). Specific differentiation of recombinant PVY<sup>N:O</sup> and PVY<sup>NTN</sup> isolates by multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 113 (2): 69-77.
- Nie, X., Singh, R. P. & Singh, M. (2004). Molecular and pathological characterization of N:O isolates of the potato virus Y from Manitoba, Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 26 (4): 573-583.
- Okamoto, D., Nielsen, S. V. S., Albrechtsen, M. & Borkhardt, B. (1996). General resistance against potato virus Y introduced into a commercial potato cultivar by genetic transformation with PVY<sup>N</sup> coat protein. *Potato Research* 39 (2): 271-282.

- Olsen, B. S. & Johansen, I. E. (2001). Nucleotide sequence and infectious cDNA clone of the L1 isolate of pea seed-borne mosaic potyvirus. *Archives of Virology* 146 (1): 15-25.
- Onodera, S., Qiao, X., Gottlieb, P., Strassman, J., Frilander, M. & Mindich, L. (1993). RNA structure and heterologous recombination in the dsRNA bacteriophage phi 6. *Journal of Virology* 67 (8): 4914-4922.
- Oparka, K. J., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A. M. & Santa Cruz, S. (1996). Viral coat protein is targeted to, but does not gate plasmodesmata during cell-to-cell movement in potato virus X. *The Plant Journal* 10 (5): 805-813.
- Oparka K. J. (2004). Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci.* 9 (1): 33-41
- Orman, B. E., Celnik, R. M., Mandel, A. M., Torres, H. N. & Mentaberry, A. N. (1990). Complete cDNA sequence of a South American isolate of potato virus X. *Virus Res.* 16 (3): 293-305.
- Osusky, M., Osuska, L., Hancock, R. E., Kay, W. W. & Misra, S. (2004). Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Research*: 13 (2): 181-190.
- Paalme, V., Gammelgard, E., Järveklüg, L. & Valkonen, J. P. T. (2004). In vitro recombinants of two nearly identical potyviral isolates express novel virulence and symptom phenotypes in plants. *Journal of General Virology* 85: 739-747.
- Palucha, A., Sadowy, E., Kujawa, A., Juszczuk, M., Zagórski, W. & Helanicka, D. (1994). Nucleotide sequence of RNA of a Polish isolate of potato leafroll luteovirus. *Acta Biochimica Polonica* 41 (4): 405-414.
- Park, S., Kang, T. S., Kim, C. K., Han, J. S., Kim, S., Smith, R. H., Pike, L. M. & Hirschi, K. D. (2005). Genetic manipulation for enhancing calcium content in potato tuber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5598-5603.
- Pathak, V. K. & Hu, W. S. (1997). "Might as well jump!" Template switching by retroviral reverse transcriptase, defective genome formation and recombination. *Semin. Virol.* 8 (2): 141-150.
- Pehu, T., Maki-Valkama, T., Valkonen, J. P. T., Koivu, K., Lehto, K. & Pehu, E. (1995). Potato plants transformed with a potato virus Y P1 gene sequence are resistant to PVY<sup>O</sup>. *Am. Potato Journal* 72: 523-532.
- Peremyslov, V. V., Hagiwara, Y. & Dolja, V. V. (1998). Genes required for replication of the 15,5-kilobase RNA genome of a plant closterovirus. *Journal of Virology* 72: 5870-5876.

- Perlak, F. J., Stone, T. B., Muskopf, Y. M., Petersen, L. V., Parker, G. B., McPherson, S. A., Wyman, J., Love, S. & Reed, G. (1993). Genetically improved potatoes: protection from damage by colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* 22 (2): 313-321.
- Petty, I. T. D. & Jackson, A. O. (1990). Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA. *Virology* 179 (2): 712-718
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (2002). P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76 (13): 6815-6824.
- Piche, L. M., Singh, R. P., Nie, X. & Gudmestad, N. C. (2004). Diversity among potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States. *Phytopathology* 94 (12): 1368-1375.
- Pirone, T. P. & Thornbury, D. W. (1983). Role of virion and helper-component in regulating aphid transmission of tobacco etch virus. *Phytopathology* 73 (6): 872-875.
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D. & Bron, P. (2003). Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23753-23761.
- Pluthero, F. G. (1993). Rapid purification of high-activity *Taq* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 21 (20): 4850-4851.
- Plyusnin, A., Kukkonen, S. K. J., Plyusnina, A., Vapalahti, O. & Vaheri, A. (2002). Transfection-mediated generation of functionally competent tula hantavirus with recombinant S RNA segment. *The EMBO Journal* 21 (6): 1497-1503.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. & Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal* 8: 3867-3874
- Pringle, C. R. (1998). Virus taxonomy-San Diego 1998. Report of the 27th Meeting of the Executive Committee of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* 143: 1449-1459.
- Pruss, G. J., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C. & Vance, V. B. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9 (6): 859-868.
- Pruss, G. J., Lawrence, C. B., Bass, T., Li, Q. Q., Bowman, L. H. & Vance, V. (2004). The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology* 320 (1): 107-120.
- Prüfer, D., Tacke, E., Schmitz, J., Kull, B., Kaufmann, A. & Rohde, W. (1992). Ribosomal frameshifting in plants: a novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative viral replicase of potato leafroll luteovirus. *The EMBO Journal* 11 (3): 1111-1117.

## Literaturverzeichnis

---

- Prüfer, D., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Guilley, H., Lecoq, H. & Jonard, G. (1995). Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* 214 (1): 150-158.
- Prüfer, D., Schmitz, J., Tacke, E., Kull, B. & Rohde, W. (1997). In vivo expression of a full-length cDNA copy of potato leafroll virus (PLRV) in protoplasts and transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 253 (5): 609-614.
- Putz, B. (1997). Die Geschichte der Kartoffel. *Kartoffelbau* 48: 118-120.
- Puustinen P. & Mäkinen, K. (2004). Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J. Biol. Chem.* 279 (37): 38103-38110
- Racchah, B., Huet, H., & Blanc, S. (2001). Potyviruses. In: K.F. Harris, O. P. Smith, & J.E. Duffus (Eds.), *Virus-Insect-Plant Interactions*, Academic Press, London, 181-206.
- Rajamäki, M. L. & Valkonen, J. P. (1999). The 6K2 protein and the VPg of Potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12 (12): 1074-1081.
- Rakitina, D. V., Kantidze, O. L., Leshchiner, A. G., Solovyev, A. G., Novikov, V. K., Morozov, S. Yu. & Kalinina, N. O. (2005). Coat proteins of two filamentous plant viruses display NTPase activity in vitro. *FEBS Lett.* 579 (22): 4955-4960.
- Reaney, D. C. (1987). Genetic error and genome design. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 52: 751-757.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Yang, S. J., Lot, H., Le Gall, O. & Candresse, T. (2001). Lettuce mosaic virus (LMV) pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 14 (6): 804-810.
- Reid, M. S. & Matthews, R. E. F. (1966). On the origin of the mosaic induced by turnip yellow mosaic virus. *Virology* 28: 563-570
- Reinbold, C., Gildow, F. E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Concalves, C., van den Heuvel, J. F. J. M. & Brault, V. (2001). Studies on the role of the minor capsid protein in transport of beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *Journal of General Virology* 82 (8): 1995-2007.
- Rek, J. (1987). Untersuchungen über die Eignung des ELISA-Verfahrens zum serienmäßigen Nachweis von Viren (PLRV und PVY) bei der Kartoffel unter der Berücksichtigung des Infektionszeitpunktes der Pflanzen und des physiologischen Zustandes der Knolle. Dissertation Nr. 8285 der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich: 37-41

- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M. & Dunez, J. (1996). Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Virology* 77 (8): 1953-1965.
- Riechmann, J. L., Lain, S., García, J. A. (1990). Infectious in vitro transcripts from a plum pox potyvirus clone. *Virology* 177 (2): 710-716
- Riechmann, J. L., Laín, S. & García, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73: 1-16.
- Ritsema, T. & Smeekens, S. C. M. (2003). Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology* 160 (7): 811-820.
- Rizzo, T. M. & Palukaitis, P. (1990). Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: generation of infectious transcripts. *Molecular and General Genetics* 222 (2-3): 249-256.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S. & CasseDelbart, F. (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology* 70: 935-347.
- Roberfroid, M. (1993). Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33: 103-148.
- Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., Arkhipenko, M. V. & Atabekov, J. G. (2003). Linear remodeling of helical virus by movement protein binding. *Journal of Molecular Biology* 333 (4): 565-572.
- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T. P. & Shaw, J. G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* 74: 1945-1949.
- Rohde, W., Gramstat, A., Schmitz, J., Tacke, E. & Prüfer, D. (1994). Plant viruses as model systems for the study of non-canonical translation mechanisms in higher plants. *Journal of General Virology* 75 (9): 2141-2149.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. & Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237 (2): 283-295.
- Roossinck, M. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Rev. Phytopathology* 35: 191-209.
- Roossinck, M. J. (2003). Plant virus evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 406-409.
- Rott, M. E. & Jelkmann, W. (2001). Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaption of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Phytopathology* 107 (4): 411-420.

Roudet-Tavert, G., German-Retana, S., Delaunay, T., Delécolle, B., Candresse, T. & Le Gall, O. (2002). Interaction between potyvirus helper component-proteinase and capsid protein in infected plants. *Journal of General Virology* 83: 1765-1770.

Rouleau, M., Smith, R. J., Bancroft, J. B. & Mackie, G. A. (1994). Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexvirus 26-kDa protein. *Virology* 204 (1): 254-265.

Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. & Chait, B. T. (2000). The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture and transport mechanism. *J. Cell. Biol.* 148 (4): 635-651.

Rozanov, M. N., Koonin, E. V. & Gorbalenya, A. E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 73: 2129-2134.

Rubio, T., Borja, M., Scholthof, H. B. & Jackson, A. O. (1999). Recombination with host transgenes and effects on virus evolution: an overview and opinion. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (2): 87-92.

Rupasov, V. V., Morozov, S. Y., Kanyuka, K. V. & Zavriev, S. K. (1989). Partial nucleotide sequence of potato virus M RNA shows similarities to potexviruses in gene arrangement and the encoded amino acid sequences. *Journal of General Virology* 70: 1861-1869.

Puurand, U., Valkonen, J. P. T., Makinen, K., Rabenstein, F. & Sarma, M., (1996). Infectious in vitro transcripts from cloned cDNA of the potato A potyvirus. *Virus Res.* 40 (2): 135-140

Puustinen, P. & Mäkinen, K.M. (2004). Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J. Biol. Chem.* 279: 38103-38110.

Ryu, J. H., Park, W. M., Lee, S. Y. & Ryu, K. H. (2000). Molecular analysis of the 3'-terminal region of lily latent Carlavirus from *Lilium lancitoium*. *Plant Path J* 16: 231-235.

Sadowy, E., Juszczuk, M., David, C., Gronenborn, B. & Hulanicka, M. D. (2001). Mutational analysis of the proteinase function of potato leafroll virus. *Journal of General Virology* 82: 1517-1527.

Saenz, P., Cervera, M. T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J. B., Riechmann, J. L. & Garcia, J. A. (2000). Identification of a pathogenicity determinant of plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3 + 6K(1). *Journal of General Virology* 81: 557-566.

Saenz, P., Quiot, L., Quiot, J. B., Candresse, T. & Garcia, J. A. (2001). Pathogenicity determinants in the complex virus population of a plum pox virus isolate. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 (3): 278-287.

- Salaman, R. N. (1970). History and early influence of the potato. Cambridge, England: *Cambridge University Press*
- Saldarelli, P., Dell'Orco, M. & Minafra, A. (2000). Infectious cDNA clones of two grapevine viruses. *Archives of Virology* 145: 397-405.
- Sambrook, J. & Russel, D. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santa Cruz, S., Chapman, S., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A. M. & Oparka, K. J. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93 (13): 6286-6290.
- Santa Cruz, S., Roberts, A. G., Prior, D. A. M., Chapman, S. & Oparka, K. (1998). Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X: The role of virions. *Plant Cell* 10 (4): 495-510.
- Savenkov, E. I. & Valkonen, J. P. T. (2002). Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* 83 (9): 2325-2335.
- Schaad, M. C., Haldeman-Cahil, R., Cronin, S. & Carrington, J. C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing and genome amplification. *J. Virol.* 70 (10): 7039-7048.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. & Carrington, J. C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO Journal* 16 (10): 4049-4059.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J. & Carrington, J. C. (2000). Strain-specific interaction of tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273 (2): 300-306.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schepetilnikov, M. V., Manske, U., Solovyev, A. G., Zamyatnin, A. A., Schiemann, J. & Morozov, S. Yu. (2005). The hydrophobic segment of potato virus X TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking. *Journal of General Virology* 86 (8): 2379-91.
- Schubert, J., Matousek, J. & Mattern, D. (2004). Pathogen-derived resistance in potato to potato virus Y - aspects of stability and biosafety under field conditions. *Virus Res.* 100: 41-50.

## Literaturverzeichnis

---

Seppänen, P., Puska, R., Honkanen, J., Tyulkina, L. G., Fedorkin, O. N., Morozov, S. Ya. & Atabekov, J. G. (1997). Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *Journal of General Virology* 78: 1241-1246.

Shapka, N. & Nagy, P. D. (2004). The AU-rich RNA recombination hot spot sequence of brome mosaic virus is functional in tombusviruses: implications for the mechanism of RNA recombination. *Journal of Virology* 78: 2288-2300.

Shepardson, S. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* 1105: 379-392.

Shi, X. M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J. C. & Vance, V. B. (1997). Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* 231 (1): 35-42.

Shintaku, M. H., Carter, S. A., Bao, Y. M. & Nelson, R. S. (1996). Mapping nucleotides in the 126-kDa protein gene that control the differential symptoms induced by two strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 221: 218-225.

Shukla, D. D., Frenkel, M. J. & Ward, C. W. (1991). Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Can. J. Plant Pathol.* 13 (2): 178-191.

Shukla, D. D. & Brunt, A. A. (1994). The Potyviridae. *CAB International, Wallingford, UK*.

Simon-Buela, L., Guo, H. S. & Garcia, J. A. (1997). Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *Journal of General Virology* 78 (10): 2691-2699

Silbernagel, M. J., Mink, G. I., Zhao, R. L. & Zheng, G. Y. (2001). Phenotypic recombination between bean common mosaic and bean common mosaic necrosis potyviruses in vivo. *Archives of Virology* 146: 1007-1020.

Simón-Buela, L., Guo, H. S. & García, J. A. (1997). Long sequences in the 5' noncoding region of plum pox virus are necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology* 233 (1): 157-162.

Skryabin, K. G., Morozov, S. Yu., Kraev, A. S., Rozanov, M. N., Chernov, B. K., Lukasheva, L. I. & Atabekov, J. G. (1988). Conserved and variable elements in RNA genomes of potexviruses. *FEBS Lett.* 240 (1-2): 33-40.

Smith, C. M. & Campbell, M. M. (2004). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of poplar mosaic virus (genus Carlavirus). *Archives of Virology* 149: 1831-1841.



- Smith, H. A., Powers, H., Swaney, S., Brown, C. & Dougherty, W. G. (1995). Transgenic potato virus Y resistance in potato: evidence for an RNA-mediated cellular response. *Phytopathology* 85 (8): 864-870.
- Smith, K. M. (1931). Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group. *Nature* 127: 702.
- Smith, O. P. & Harris, K. F. (1990). Potato leafroll virus 3' genome organization: sequence of the coat protein gene and identification of a viral subgenomic RNA. *Phytopathology* 80 (7): 609-614.
- Solomon-Blackburn, R. M. & Barker, H. (2001). Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity* 86 (1): 17-35.
- Solovyev, A. G., Savenkov, E. I., Agranovsky, A. A. & Morozov, S. Yu. (1996). Comparisons of the genomic cis-elements and coding regions in RNA components of the hordeiviruses barley stripe mosaic virus, lychnis ringspot virus and poa semilatifolia virus. *Virology* 219: 9-18.
- Solovyev, A. G., Savenkov, E. I., Grdzeliashvili, V. Z., Kalinina, N. O., Morozov, S. Yu., Schiemann, J. & Atabekov, J. G. (1999). Movement of hordeivirus hybrids with exchanges in the triple gene block. *Virology* 253 (2): 278-287.
- Solovyev, A. G., Stroganova, T. A., Zamyatnin, A. A., Fedorkin, O. N., Schiemann, J. & Morozov, S. Yu. (2000). Subcellular sorting of small membrane-associated triple gene block proteins: TGBp3- assisted targeting of TGBp2. *Virology* 269 (1): 113-127.
- Song, S. I., Choi, J. N., Song, J. T., Ahn, J. H., Lee, J. S., Kim, M., Cheong, J. J. & Choi, Y. D. (2002). Complete genome sequence of garlic latent virus, a member of the carlavirus family. *Mol. Cells* 14 (2): 205-213.
- Soumounou, Y. & Laliberte, J. F. (1994). Nucleic-acid binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. *Journal of General Virology* 75 (10): 2567-2573.
- Spetz, C. & Valkonen, J. P. T. (2003). Genomic sequence of wild potato mosaic virus as compared to the genomes of other potyviruses. *Archives of Virology* 148 (2): 373-380.
- Spetz, C. & Valkonen, J. P. T. (2004). Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol. Plant Microbe Interactions* 17 (5): 502-510
- Spillane, C., Verchot, J., Kavanagh, T. A. & Baulcombe, D. C. (1997). Concurrent suppression of virus replication and rescue of movement - defective virus in transgenic plants expressing the coat protein of potato virus X. *Virology* 236: 76-84.

- Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Boller, T. & Wiemken, A. (1995). Purification, cloning and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11652-11656.
- Sriskanda, V. S., Pruss, G., Ge, X. & Vance, V. B. (1996). An eight-nucleotide sequence in the potato virus X 3'untranslated region is required for both host protein binding and viral multiplication. *J. Virology* 70 (8): 5266-5271
- Stachel, S. E., Messens, E., van Montagu, M. & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318 (6047): 624-628.
- St John, J. A., Bonnett, G. D., Simpson, R. J. & Tanner, G. J. (1997). A fructan:fructan fructosyltransferase activity from *Lolium rigidum*. *New Phytol.* 135 (2): 235-247.
- Stephan, D. & Maiss, E. (2006). Biological properties of beet mild yellowing virus derived from a full-length cDNA clone. *Journal of General Virology* 87: 445-449.
- Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D. & Weingartner, D. P. (2001). Compendium of potato diseases. 2<sup>nd</sup> ed. The American Phytopathological Society.
- Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T. & Okuda, S. (2004). An important determinant of the ability of turnip mosaic virus to infect Brassica spp. and/or Raphanus sativus is in its P3 protein. *J. Gen. Virol.* 85 (7): 2087-2098.
- Suzuki, Y., Gojobori, T. & Nakagomi, O. (1998). Intragenic recombination in rotaviruses. *FEBS Lett.* 427 (2): 183-187.
- Sylvester, E. S. (1980). Circulative and propagative virus transmission and control. *Annual Review of Entomology* 25: 106-111.
- Symons, R.H. (1997). Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* 25 (14): 2683-2689.
- Tacke, E., Schmitz, S., Prüfer, D. & Rohde, W. (1993). Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* 197 (1): 274-282.
- Takahashi, Y., Takahashi, T. & Uyeda, I. (1997). A cDNA clone to clover yellow vein potyvirus genome is highly infectious. *Virus Genes* 14 (3): 235-243.
- Tamai, A. & Meshi, T. (2001). Cell-to-cell movement of potato virus X: the role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol. Plant-Microbe Interaction* 14 (10): 1158-1167.
- Tamai, A., Kubota, K., Nagano, H., Yoshii, M., Ishikawa, M., Mise, K. & Meshi, T. (2003). Cucumovirus- and bromovirus-encoded movement functions potentiate cell-to-cell movement of tobamo- and potexviruses. *Virology* 315 (1): 56-67.

- Tan, Z., Wada, Y., Chen, J. & Ohshima, K. (2004). Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of turnip mosaic virus. *Journal of General Virology* 85 (9): 2683-2696.
- Tanne, E. & Sela, I. (2005). Occurrence of a DNA sequence of a non-retro RNA virus in a host plant genome and its expression: evidence for recombination between viral and host RNAs. *Virology* 332: 614-622.
- Tavantzis, S. M. (1991). Coat protein and protease activity as in vitro translation products of potato carlavirus M RNA. *Archives of Virology* 120 (3-4): 241-252.
- Tepfer, M. (1993). Viral genes and transgenic plants: What are the potential environmental risks? *BioTechnology* 11: 1125-1132
- Teycheney, P. Y., Marais, A., Svannella-Dumas, L., Dulucq, M. J. & Candresse, T. (2005). Molecular characterization of banana virus X (BVX), a novel member of the *Flexiviridae* family. *Archives of Virology* 150: 1715-1727.
- Thiele, A., Herold, M., Lenk, I., Quail, P. H. & Gatz, C. (1999). Heterologous expression of Arabidopsis phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiology* 120: 73-81.
- Thole, Y., Dalmay, T., Burgyan, J. & Balazs, E. (1993). Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian Isolate) genomic RNA. *Genes* 123 (2): 149-156.
- Thornbury, D. W., Hellman, G. M., Rhoads, R. E. & Pirone, T. P. (1985). Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 144 (1): 260-267
- Tordo, V. M. J., Chachulska, A. M., Fakhfakh, H., Le Romancer, M., Robaglia, C. & Astier-Manifacier, S. (1995). Sequence polymorphism in the 5'-NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *Journal of General Virology* 76: 939-949.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C. & Jacquot, E. (2005). Characterization of potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY<sup>N</sup> isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Journal of General Virology* 86: 2101-2105.
- Tsai, C. H., Cheng, C. P., Peng, C. W., Lin, B. Y., Lin, N. S. & Hsu, Y. H. (1999). Sufficient length of a poly(A) tail for the formation of a potential pseudoknot is required for efficient replication of bamboo mosaic potexvirus RNA. *Journal of Virology* 73: 2703-2709.

- Turner, R. & Foster, G. D. (1997). Deletion analysis of a translational enhancer upstream from the coat protein open reading frame of potato virus S. *Archives of Virology* 142: 167-175.
- Turner, R. L., Bate, N., Twell, D. & Foster, G. D. (1994a). Analysis of a translational enhancer upstream from the coat protein open reading frame of potato virus S. *Archives of Virology* 134: 321-333.
- Turner, R. L., Twell, D. & Foster, G. D. (1994b). In vivo characterisation of a translational enhancer upstream from the coat protein open reading frame of potato virus S. *Archives of Virology* 137: 123-132.
- Turner, R. L., Glynn, M., Taylor, S. C., Cheung, M. K., Spurr, C., Twell, D. & Foster, G. D. (1999). Analysis of a translational enhancer present within the 5'-terminal sequence of the genomic RNA of potato virus S. *Archives of Virology* 144: 1451-1461.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L. & Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74 (1-2): 157-175.
- Urwin, P. E., Troth, K. M., Zubko, E. I. & Atkinson, H. J. (2001). Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Mol. Breed.* 8 (1): 95-101.
- Urwin, P. E., Green, J. & Atkinson, H. J. (2003). Expression of a plant cystatin confers partial resistance to *Globodera*, full resistance is achieved by pyramiding a cystatin with natural resistance. *Mol. Breed.* 12 (3): 263-269.
- Van den Ende, W., Van Wontergem, D., Verhaert, P., Dewil, E. & Van Laere, A. (1996). Purification and characterization of fructan:fructan fructosyl transferase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 199: 493-502.
- Van den Ende, W. & Van Laere, A. (1996). De-novo synthesis of fructans from sucrose *in vitro* by a combination of two purified enzymes (sucrose:sucrose fructosyl transferase and fructan:fructan fructosyl transferase) from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 200: 335-342.
- Van den Heuvel, J. F. J. M., Van der Vlugt, R. A. A., Verbeek, M., De Haan, P. T. & Huttinga, H. (1994). Characteristics of a resistance breaking isolate of potato virus Y causing potato tuber necrotic ringspot disease. *European Journal of Plant Pathology* 100 (5): 347-356.
- van der Werf, S., Bradley, J., Wimmer, E., Studier, F. W. & Dunn, J. (1986). Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (8): 2330-2334.
- van der Wilk, F., Huisman, M. J., Cornelissen, B. C., Huttinga, H. & Goldbach, R. (1989). Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. *FEBS Lett.* 245 (1-2): 51-56.

- van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A. M. & van den Heuvel, J. F. J. M. (1997). The genome-linked protein of potato leafroll virus is located downstream of the putative protease domain of the ORF1 product. *Virology* 234 (2): 300-303.
- van Hoof, H.A. (1980). Aphid vectors of potato virus Y. *Neth. J. Pl. Path.* 86: 159-162.
- Van Laere, A. & Van den Ende, W. (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant Cell Environ.* 25 (6): 803-815.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M. & Bishop, D. H. L. (2000). Virus Taxonomy: Seventh Report of the Internal Committee on Taxonomy. San Diego, Academic Press.
- Vance, V. B., Berger, P. H., Carrington, J. C., Hunt, A. G. & Shi, X. M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X / potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206 (1): 583-590.
- Varrelmann, M. & Maiss, E. (2000). Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* 81: 567-576.
- Varrelmann, M., Palkovics, L. & Maiss, E. (2000). Transgenic or plant expression vector-mediated recombination in plum pox virus. *Journal of Virology* 74: 7462-7469.
- Veidt, I., Bouzoubaa, S. E., Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1992). Synthesis of full-length transcripts of beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology* 186 (1): 192-200.
- Verchot-Lubicz, J. (2005). A new cell-to-cell transport model for potexviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 283-290.
- Verchot, J., Koonin, E. V. & Carrington, J. C. (1991). The 35-kDa protein from the N terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185 (2): 527-535.
- Verchot, J., Angell, S. M. & Baulcombe, D. C. (1998). In vivo translation of the triple gene block of potato virus X (PVX) requires two subgenomic mRNAs. *Journal of Virology* 72 (10): 8316-8320.
- Vergauwen, R., Van Laere, A. & Van den Ende, W. (2003). Properties of Fructan:Fructan 1-Fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two Asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiology* 133: 391-404.
- Verhoeven, J. T. J. & Roenhorst, J. W. (2003). Detection of a broad range of potato viruses in a single assay by mechanical inoculation of herbaceous test plants. *Bulletin OEPP* 33 (2): 305-311.

- Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. & Fuchs, M. (2004). Population structure and genetic variability within isolates of grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology* 85 (8): 2435-2445.
- Voinnet, O., Lederer, C. & Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103 (1): 157-167.
- von Hippel, P. H. (1998). An integrated model of the transcription complex in elongation, termination and editing. *Science* 281 (5377): 660-665.
- Wang, R. Y., Powell, G., Hardie, J. & Pirone, T. P. (1998). Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. *Journal of General Virology* 79 (6): 1519-1524.
- Ward, C. W. & Shukla, D. D. (1991). Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* 32: 269-296.
- Weidemann, H. L. (1990). Viren der Kartoffel. *Kartoffelbau* 41: 270-273.
- Weidemann, H. L. & Maiss, E. (1996). Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY<sup>NTN</sup>) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 103 (4): 337-345.
- White, K. A., Bancroft, J. B. & Mackie, G. A. (1991). Defective RNAs of clover yellow mosaic virus encode nonstructural-coat protein fusion products. *Virology* 183 (2): 479-486.
- White, K. A., Bancroft, J. B. & Mackie, G. A. (1992). Coding capacity determines in vivo accumulation of a defective RNA of clover yellow mosaic virus. *Journal of Virology* 66 (5): 3069-3076.
- White, K. A. & Morris, T. J. (1994). Recombination between defective tombusvirus RNAs generates functional hybrid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 91 (9): 3642-3646.
- Wierzchoslowski, R., Dzianott, A., Kunimalayan, S. & Bujarski, J. (2003). A transcriptionally active subgenomic promoter supports homologous crossovers in a plus-strand RNA virus. *Journal of Virology* 77: 6769-6776.
- Wierzchoslowski, R., Dzianott, A. & Bujarski, J. (2004). Dissecting the requirement for subgenomic promoter sequences by RNA recombination of brome mosaic virus in vivo: evidence for functional separation of transcription and recombination. *Journal of Virology* 78 (16): 8552-8564.

- Wilson, K. S. & von Hippel, P. H. (1995). Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (19): 8793-8797.
- Wilson, R., Smith, J., Yonts, D. & Hibbert, C. (1999). Chicory production in Nebraska (USA) for inulin processing. In: Fuchs, A. und van Laere, A (Edt.) Proceedings of the Seventh Seminar on Inulin. 13-24.
- Wirsing, M. (1988). Einführung des Kartoffelanbaues in Deutschland durch Pilgrimsreuther 1648. *Zeitschr. für Agrargesch. und Agrarsoz.* 36: 23-32.
- Wisler, G. C., Purcifull, D. E. & Hiebert, E. (1995). Characterization of the P1 protein and coding region of the zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Virology* 76 (1): 37-45.
- Worobey, M. & Holmes, E. C. (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology* 80 (10): 2535-2543.
- Wung, C. H., Hsu, Y. H., Liou, D. Y., Huang, W. C., Lin, N. S. & Chang, B. Y. (1999). Identification of the RNA binding sites of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potexvirus. *Journal of General Virology* 80 (5): 1119-1126.
- Wylie, S. J., Kueh, J., Welsh, B., Smith, L. J., Jones, M. G. K. & Jones, R. A. C. (2002). A non-aphid-transmissible isolate of bean yellow mosaic potyvirus has an altered NAG motif in its coat protein. *Archives of Virology* 147 (9): 1813-1820.
- Xu, H., Khalilian, H., Eweida, M., Squire, S. & Abouhairda, M. J. (1995). Genetically engineered resistance to potato virus X in four commercial potato cultivars. *Plant Cell Reports* 15 (1-2): 91-96.
- Yambao, Ma. L. ; Masuta, C., Nakahara, K. & Uyeda, I. (2003). The central and C-terminal domains of VPg of clover yellow vein virus are important for VPg-HC-Pro and VPg-VPg- interactions. *Journal of General Virology* 84: 2861-2869
- Yang, S. J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O. L., Candresse, T. & Dunez, J. (1998). Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. *Archives of Virology* 143 (12): 2443-2451.
- Yang, Y., Ding, B., Baulcombe, D. C. & Verchot, J. (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of potato virus X is regulated by three other viral proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (6): 599-605.
- Yang, S. & Ravelonandro, M. (2002). Molecular studies of the synergistic interactions between plum pox virus HC-Pro protein and potato virus X. *Archives of Virology* 147 (12): 2301-2312.

## Literaturverzeichnis

---

Yeh, T. Y., Lin, B. Y., Chang, Y. C., Hsu, Y. H. & Lin, N. S. (1999). A defective RNA associated with bamboo mosaic virus and the possible common mechanisms for RNA recombination in potexviruses. *Virus Genes* 18 (2): 121-128.

Young, M. J., Kelly, L., Larkin, P. J., Waterhouse, P. M. & Gerlach, W. L. (1991). Infectious in vitro transcripts from a cloned cDNA of barley yellow dwarf virus. *Virology* 180 (1): 372-379.

Zavriev, S. K., Kanyuka, K. V. & Levay, K. E. (1991). The genome organization of potato virus M RNA. *Journal of General Virology* 72 (1): 9-14.

Zhang, J. & Temin, H. M. (1993). Rate and mechanism of nonhomologous recombination during single cycle of retroviral replication. *Science* 259 (5092): 234-238.

Zheng, H. Y., Chen, M. J., Adams, M. J. & Chen, J. P. (2006). Complete nucleotide sequence and affinities of the genomic RNA of narcissus common latent virus (genus Carlavirus). *Archives of Virology* 151 (8): 1667-1672.

### Internetseiten:

[www.uky.edu/~dhild/biochem/13/lect13.html](http://www.uky.edu/~dhild/biochem/13/lect13.html)

University of Kentucky

[www.biosicherheit.de](http://www.biosicherheit.de)

Biosicherheit: Gentechnik – Pflanze – Umwelt (gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung)

[www.rhg-hannover.de/scripts.de](http://www.rhg-hannover.de/scripts.de)

AGRAVIS Raiffeisen AG



## 9. Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit

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

**Flatken, S.; Maiss, E. (2002):** Sicherheitsforschung an gentechnisch veränderten und unveränderten Kartoffelpflanzen – Untersuchungen zum Auftreten der Kartoffelviren PVM, PVA, PVY, PVS, PVX und PLRV. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 390, 497

**Flatken, S.; Maiss, E. (2003):** Detection of different potato viruses in transgenic and non-transgenic potato plants. Jahrestreffen des DPG- Arbeitskreises „Viruskrankheiten der Pflanzen“ in Heidelberg, [http://dpg-bcpc-symposium.de/fileadmin/alte\\_Webseiten/ak/15/Tagung2003.htm](http://dpg-bcpc-symposium.de/fileadmin/alte_Webseiten/ak/15/Tagung2003.htm)

**Flatken, S.; Maiss, E. (2004):** Untersuchungen zur homologen Rekombination des *Potato virus X* in transgenen Pflanzen. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 396, 554

**Flatken, S.; Maiss, E. (2005):** Construction and agroinfection of a *Potato virus M* full-length clone. Nederlandse Kring voor Plantevirologie and the DPG Arbeitskreis Viruskrankheiten der Pflanzen: Fourth Joint Meeting of Dutch and German Plant Virologists in Wageningen, [http://dpg-bcpc-symposium.de/fileadmin/alte\\_Webseiten/ak/15/Tagung2005.htm](http://dpg-bcpc-symposium.de/fileadmin/alte_Webseiten/ak/15/Tagung2005.htm)

**Flatken, S.; Maiss, E. (2005):** Construction of an infectious *Potato virus M* full-length clone. Tagungsband der Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting 2005, 330

**Flatken, S.; Maiss, E. (2005).** Construction of an infectious *Potato virus M* full-length clone. International Union of Microbiological Society, San Francisco, Abstracts of the International Congress of Virology, July 23-27 (2005) San Francisco, California, U.S.A., 144

### 10. Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name: Stefan Flatken  
Geburtsdatum: 12.4.1976  
Geburtsort: Cloppenburg  
Familienstand: ledig

#### Schulbildung

1982-1986: Grundschule „Wallschule“ in Cloppenburg  
1986-1988: Orientierungsstufe „Don-Bosco-Schule“ in Cloppenburg  
1986-1989: Gymnasium „Unserer Lieben Frau“ in Cloppenburg mit dem Abitur abgeschlossen

#### Studium

10/1995-09/2001: Universität Hannover, Studium des Gartenbaus  
Diplomarbeit mit dem Titel „Etablierung eines Kreuzungssystems zur Nutzung der *quartet* - Mutation bei *Arabidopsis thaliana* als Voraussetzung für eine Interferenzanalyse an Tetraden“ am Institut für Zierpflanzenbau, Baumschule und Pflanzenzüchtung in der Abteilung „Angewandte Genetik“ angefertigt.  
Abschluss: Diplom-Agraringenieur

**Promotion**

Seit 10/2001      Promotion an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover am Institut für Pflanzenschutz und Pflanzenkrankheiten, „Auftreten, Variabilität und Rekombination von Kartoffelviren unter besonderer Berücksichtigung des Kartoffelvirus Y (*Potato virus Y*) in transgenen und nicht-transgenen Kartoffeln“

**Berufliche Tätigkeit**

09/2001-09/2004      Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzenschutz und Pflanzenkrankheiten der Universität Hannover  
  
Bearbeitung des Teilprojektes „Sicherheitsbewertung von Rekombinationsereignissen bei Kartoffelviren in nicht-transgenen und transgenen Pflanzen“ innerhalb des BMBF finanzierten Forschungsverbundes „Im Kohlenhydratmetabolismus gentechnisch veränderte Kartoffeln im Freisetzungversuch“

Hannover, im März 2006

### **11. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass ich den Doktorgrad nicht besitze und mich auch früher nicht um den Doktorgrad beworben habe.

Hannover, im März 2006

Stefan Flatken

## **Danksagung**

Einen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Edgar Maiß für die sehr gute Betreuung, Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft, die mir während dieser Arbeit zu teil wurde, aussprechen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Carmen Büttner für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Poehling bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.

Weiterhin möchte ich mich beim Verbundkoordinator Herrn Dr. Bernd Hommel und seinem Team für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ebenfalls sei Herr Prof. Dr. Ludwig Hothorn und seine Arbeitsgruppe für die statistische Beratung gedankt.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Ulrike Manske und an Herrn Dr. Reinhard Götz für die Bereitstellung des transgenen Tabaksaatgutes, sowie an Frau Dr. Kerstin Lindner für die zur Verfügung gestellten ELISA Presssaftproben.

Bei allen derzeitigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Maiß sowie des Instituts möchte ich mich für die Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima bedanken. Mein besonderer Dank gilt den Gärtnern Herrn Seelbinder und Herrn Arndt.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Vorhaben wurde aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0312632E gefördert.

Zuletzt möchte ich mich neben meiner Familie ganz herzlich bei Nina Leischulte bedanken, die mich während dieser Zeit stets unterstützte und enorm viel Geduld aufbringen musste.