

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom- Biologin Anja Arntjen

aus Westerstede

Tag der mündlichen Prüfung:

Herstellung infektiöser *in vitro* Transkripte und Vollängen cDNA Klone
von *Apple stem pitting virus* (ASPV) und *Apple stem grooving virus*
(ASGV) und Untersuchungen zur jahreszeitlichen Nachweisbarkeit
dieser Viren im Apfelbaum

Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Jelkmann

Prof. Dr. Thomas Rausch

Für meinen Vater

“Keep your focus on your passion in life and the things you enjoy doing.

You’ll get there. Trust me. I’m doing it.”

(Tim Samaras 1957 - 2013)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	12
Zusammenfassung	14
Summary	16
1. Einleitung	18
1.1 Der Kulturapfel und seine Bedeutung	18
1.2 Die Familie der <i>Betaflexiviridae</i>	19
1.2.1 <i>Apple stem pitting virus</i>	21
1.2.2 <i>Apple stem grooving virus</i>	23
1.2.3 <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	24
1.3 Infektiöse Vollängen cDNA Klone	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Pflanzenmaterial	30
2.1.2 Viren	30
2.1.3 Antikörper	30
2.1.4 Plasmide, Klonierungsvektoren und Größenstandards	30
2.1.5 Oligonukleotide	31
2.1.6 Reaktionskits	35
2.1.7 Bakterienstämme	35
2.1.8 Enzyme und Reaktionspuffer	35
2.1.9 Chemikalien und Lösungen	38
2.1.10 Geräte	38
2.1.11 Sonstige Materialien	39

2.1.12 Software	39
2.2 Methoden	39
2.2.1 Anzucht des Pflanzenmaterials	39
2.2.2 Nukleinsäureextraktion aus Pflanzenmaterial	39
2.2.2.1 Silica capture	39
2.2.2.2 RNeasy Extraktion.....	41
2.2.2.3 DsRNA Extraktion.....	41
2.2.3 DNase Verdau von Silicaproben	42
2.2.4 Reverse Trankription (RT- PCR).....	42
2.2.4.1 Reverse Transkription mit Random Primer.....	42
2.2.4.2 Reverse Transkription mit spezifischem Primer	43
2.2.4.3 Reverse Transkription mit RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase	43
2.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	44
2.2.5.1 Standard PCR Ansatz	44
2.2.5.1.1 PCR Programme.....	44
2.2.5.2 PCR mit der Precisor High- Fidelity DNA Polymerase.....	44
2.2.5.2.1 Precisor PCR Programme.....	45
2.2.6 Reinigung von PCR- und RT- PCR Produkten.....	45
2.2.7 Restriktionsverdaue	45
2.2.8 Gelelektrophorese.....	46
2.2.9 Gelextraktion	46
2.2.10 Ligation	46
2.2.11 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen	47
2.2.12 Elektroporation	48
2.2.13 Colony PCR	49
2.2.14 Plasmid- DNA Präparation aus E. coli NM 522	49
2.2.14.1 Herstellung von Bakterien für die Langzeitlagerung	50

3.4 Mischinfektionsversuch mit ASPV, ACLSV und ASGV	65
3.5 Bestimmung der Sequenz von zwei ASPV Isolaten	71
3.5.1 ASPV PB66	71
3.5.2 ASPV Hannover	72
3.5.3 Vergleich der ASPV Isolate ASPV PB66, ASPV Hannover und ASPV PA66	73
3.6 Herstellung eines Vollängen cDNA Klons	78
3.6.1 Herstellung eines Vollängen cDNA Klons von ASPV PB66 mit Hilfe der entwickelten Ligationsstrategie	78
3.6.1.1 Sequenzierung eines durch die Ligationsstrategie generierten Vollängen cDNA Klons des ASPV	82
3.6.1.2 Umklonierung des Vollängen cDNA Klons vom ASPV in einen binären Vektor	83
3.6.2 Entwicklung einer Vollängen PCR für ASPV und ASGV	85
3.6.2.1 <i>In vitro</i> Transkription von Vollängen PCR Produkten	87
3.6.3 Herstellung eines cDNA Vollängen Klons mit Hilfe der Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode	91
3.6.4 Infektionsversuche mit den generierten Vollängen cDNA Klonen	96
4. Diskussion	102
5. Literatur	123
6. Anhang	136
6.1 Nukleotidsäuresequenz des ASPV cDNA Vollängen Klones p1657_ASPV .	136
Veröffentlichungen	140
Danksagung	142

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
35S	35S Promotor des CaMV
A	Adenin
aa	Aminosäure
Amp	Ampicillin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
abs.	absolut
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
ApLV	<i>Apricot latent virus</i>
ASGV	<i>Apple stem grooving virus</i>
ASPV	<i>Apple stem pitting virus</i>
ATP	Adenosin- Trisphosphat
BCIP	5- Bromo-4-chlor-3-indolyl Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>
cDNA	kopierte DNA ("copy DNA")
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	Hüllprotein ("coat protein")
CPEC	Circular Polymerase Extension Cloning
CTP	Cytidin- Trisphosphat
cv	cultivar
dATP	Desoxyadenosin- Trisphosphat
dCTP	Desoxycytidin- Trisphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonsäure
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosin- Trisphosphat

DIECA	Diethyldithiocarbonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoythymidin- Trisphosphat
dUTP	Desoxyuridin- Trisphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
ELISA	Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Nachweis (‘Enzyme linked Immunosorbend Assay’)
et al	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequoria victoria</i>
GRSPaV	<i>Grapevine rupestris stem pitting virus</i>
GTP	Guanosin- Trisphosphat
h	Stunde
HDVpA	Terminationssequenz aus dem <i>Hepatitis delta virus</i>
Hrsg	Herausgeber
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPTG	Isopropyl- α -D-thio-galactopyranosid
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KGMMV	<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i>
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
M	Molar
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
NBT	Nitroblautetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTR	nicht translatierte Region
OBDV	<i>Oat blue dwarf virus</i>
ORF	offenes Leseraster
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMMoV	<i>Pepper mild mottle virus</i>
PopMV	<i>Poplar mosaic virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVX	<i>Potato virus X</i>
qPCR	Realtime PCR
RACE	Rapid Amplification of cDNA ends
Rif	Rifampicin
RMV	<i>Ribgrass mosaic virus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transcriptase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super optimal broth with catabolic repressor
sp	Spezies
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
T	Thymin
T7	Bakteriophage T7

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyl- Transferase
TE	Tris- EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamid
TGB	Triple Gene Block
Tm	Schmelztemperatur
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
TTP	Thymidin- Trisphosphat
U	Uracil
u	Enzymeinheit ("unit")
UTP	Uridin- Trisphosphat
V	Volumen
X- Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
ZGMMV	<i>Zucchini green mottle mosaic virus</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Ordnung der <i>Tymovirales</i>	20
Abbildung 2: <i>Apple stem pitting virus</i> Symptome auf dem Bioindikator <i>Malus pumila</i> cv. Virginia crab.	22
Abbildung 3: Schematischer Genomaufbau des <i>Apple stem pitting virus</i>	22
Abbildung 4: Schematischer Genomaufbau des <i>Apple stem grooving virus</i>	23
Abbildung 5: Schematischer Genomaufbau des <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> ...	24
Abbildung 6: Symptome von drei verwendeten ASPV Isolaten auf <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B.....	61
Abbildung 7: Symptome von zwei latenten Apfelviren auf <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B.....	61
Abbildung 8: ASPV Nachweis- PCR einiger Proben des Jahreszeitenversuches.....	64
Abbildung 9: Virusnachweis im April in drei aufeinanderfolgenden Jahren im Rahmen des Mischinfektionsversuches.....	67
Abbildung 10: Anzahl der zweifach und dreifach infizierten Bäume innerhalb des Mischinfektionsversuches.....	68
Abbildung 11: Symptome einer Dreifachinfektion mit ASPV, ACLSV und ASGV bei <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B.....	70
Abbildung 12: Alignment der kompletten Hüllproteinsequenz von verschiedenen <i>Apple stem pitting virus</i> Isolaten.....	76
Abbildung 13: Phylogenetischer Stammbaum aufgrund der kompletten Hüllproteinsequenz von verschiedenen <i>Apple stem pitting virus</i> Isolaten.....	77
Abbildung 14: Schematische Darstellung des in drei Fragmente aufgeteilten ASPV Genoms und des verwendeten Vektors p1657.....	78

Abbildung 15: Schematische Darstellung des ersten Klonierungsschrittes zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klons vom ASPV.....	79
Abbildung 16: Schematische Darstellung des zweiten Klonierungsschrittes zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klons vom ASPV.....	80
Abbildung 17: Schematische Darstellung des dritten Klonierungsschrittes zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klons vom ASPV.....	81
Abbildung 18: Restriktionsverdau von ASPV cDNA Vollängenklonen.....	82
Abbildung 19: Schematische Darstellung des binären Vektors pCB301N_ASPV.	84
Abbildung 20: Vollängen PCR Produkte von ASPV und ASGV.....	85
Abbildung 21: Alignments von 5'- und 3'- Enden von drei ASPV Isolaten mit den entwickelten Primern für die Vollängen PCR.....	86
Abbildung 22: Symptome mit ASGV T7 Transkripten infizierter <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B Blätter.....	88
Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ASGV- Viruspartikels aus einer mit dem T7 Transkript inokulierten <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B Pflanze.....	89
Abbildung 24: Symptome mit ASPV T7 Transkripten infizierter <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B Blätter.....	89
Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ASPV- Viruspartikels aus einer mit dem T7 Transkript inokulierten <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B Pflanze.....	90
Abbildung 26: Schematische Darstellung der für die Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode benötigten PCR Produkte...	91
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode.....	92
Abbildung 28: Vollängen PCR Produkte von ASPV und ASGV für die Circular Polymerase Extension Cloning Methode (CPEC).....	93

Abbildung 29: Schematische Darstellung des binären Vektors pCBSp35HDVpA_ASPV.....	94
Abbildung 30: Schematische Darstellung der durch Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) entstandenen Vollängen cDNA Klone des ASGV.....	95
Abbildung 31: Symptome des infektiösen ASPV cDNA Vollängen Klons auf <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B.....	99
Abbildung 32: Symptome des infektiösen ASGV cDNA Vollängen Klons auf <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B.....	100
Abbildung 33: Elektronenmikroskopisches- Bild von Viruspartikeln aus mit CPEC- Produkten infizierten <i>Nicotiana occidentalis</i> 37B.....	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Virusisolate.....	30
Tabelle 2: Antikörper.....	30
Tabelle 3: Plasmide und Klonierungsvektoren.....	30
Tabelle 4: Größenstandards.....	31
Tabelle 5: Allgemeine Primer.....	31
Tabelle 6: Primer zum Virusnachweis.....	31
Tabelle 7: ASPV PA66 spezifische Primer.....	31
Tabelle 8: ASPV PB66 spezifische Primer.....	32
Tabelle 9: ASPV Hannover spezifische Primer.....	33
Tabelle 10: ASGV spezifische Primer.....	34
Tabelle 11: Primer für die Vollängen PCR.....	34
Tabelle 12: Primer für T7 Vollängen Produkte.....	34
Tabelle 13: Primer für das Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC).....	35
Tabelle 14: Reaktionskits.....	35
Tabelle 15: Bakterienstämme.....	35
Tabelle 16: Restriktionsendonukleasen.....	35
Tabelle 17: DNA/RNA- modifizierende Enzyme.....	36
Tabelle 18: Polymerasen.....	37
Tabelle 19: Nukleotide.....	37
Tabelle 20: Geräte.....	38
Tabelle 21: Sonstige Materialien.....	39
Tabelle 22: Software.....	39
Tabelle 23: PCR Programme.....	44
Tabelle 24: Precisor PCR Programme.....	45
Tabelle 25: Verwendete Selektivmedien.....	49
Tabelle 26: Verwendete Nachweisprimerpaare und deren Isolatspezifität.....	63

Tabelle 27: Ermittlung der Virusnachweisbarkeit über den gesamten Jahresverlauf.....	64
Tabelle 28: Nachweisraten von ASPV, ACLSV und ASGV im Mischinfektions- versuch.....	66
Tabelle 29: Infektionsraten von ASPV, ACLSV und ASGV bei Einzel- und Mischinfektionen.....	69
Tabelle 30: Vergleich des Genomaufbaus von drei ASPV Isolaten.....	74
Tabelle 31: Basenaustausche in den Open Reading Frames (ORF) zwischen dem ASPV Isolat PB66 und dem sequenzierten cDNA Klon.....	83
Tabelle 32: Virusnachweis nach Abreibung von <i>in vitro</i> RNA Transkripten.....	87
Tabelle 33: Ergebnisse der Inokulationsversuche mit verschiedenen cDNA Volllängen Viruskonstrukten.....	97

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein infektiöser Vollängen cDNA Klon des *Apple stem pitting virus* (ASPV) hergestellt werden, mit dem die Ätiologie der hervorgerufenen Krankheitsbilder untersucht werden kann. Dazu sollte zum einen die klassische Methode der Ligationsstrategie genutzt werden. Sie basiert auf spezifischen Restriktionsschnittstellen mit deren Hilfe das Genom aus mehreren Fragmenten im Zielvektor zusammengesetzt wird (Prüfer et al. 1995). Für diese Methode ist es unerlässlich die komplette Sequenz des Virus zu kennen, um die Restriktionsschnittstellen auswählen zu können. Zum anderen sollte eine Methode entwickelt werden, die weniger zeit- und kostenintensiv ist und die Probleme, die in der Ligationsstrategie auftreten können, umgeht. Dazu gehört die hohe Sequenzvariabilität, die bei den latenten Apfelviren auftritt, welche dazu führt, dass das verwendete Isolat vorher sequenziert werden muss (Yoshikawa 2009). Des Weiteren können die während der Ligationsstrategie entstandenen Konstrukte in den Bakterien instabil oder toxisch sein (Ülper et al. 2008). Die entwickelte Methode sollte auf das *Apple stem grooving virus* (ASGV) angewendet werden.

Für die Herstellung eines Vollängen cDNA Klons des ASPV wurde das Isolat PB66 verwendet. Die Ligationsstrategie wurde mit Hilfe der Sequenz des Isolates PA66 entwickelt. Bereits während der Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) traten Probleme auf, die dazu führten, dass die komplette Sequenz des Isolates PB66 bestimmt wurde. Dabei stellte sich heraus, dass die beiden Isolate eine Sequenzidentität von 80 % haben. Anhand der neuen Sequenz wurde eine Ligationsstrategie entwickelt, mit der erfolgreich ein Vollängen cDNA Klon des ASPV unter der Kontrolle des 35S Promotors hergestellt werden konnte. Das Konstrukt wurde in einem weiteren Schritt in einen pBin Vektor umligiert. In den anschließenden Infektionsversuchen mittels mechanischer Inokulation und Agroinokulation war dieser nicht infektiös. Die Sequenzierung des entstandenen Vollängen cDNA Klons zeigte ein verändertes 5'- Ende und 19 weitere Basenaustausche innerhalb der Sequenz.

Als weitere Methode sollte die Vollängen PCR genutzt werden, dazu wurden Primer am 5'- und 3'- Ende des ASPV Isolates PB66 abgeleitet. Beim Vergleich von 5'- und 3'- Enden von verschiedenen ASPV Isolaten konnte eine erhöhte Konserviertheit festgestellt werden, welche es ermöglicht, die erstellten Primer zur Herstellung von

Vollängen PCR Produkten von verschiedenen ASPV Isolaten zu nutzen. In der PCR konnte das komplette Genom amplifiziert werden. Die Ligation des 9 kb großen PCR Fragmentes gelang nicht. Als Abänderung in der Vollängen PCR wurde dem 'forward' Primer die Sequenz des T7 Promotors angefügt. Dadurch konnten in der T7 PCR infektiöse RNA Transkripte generiert werden. Die Vollängen PCR wurde auf ASGV angewendet. Es konnte das komplette 6,5 kb große Genom amplifiziert werden. Die Ligation des PCR Produktes war auch hier nicht erfolgreich. Durch Hinzufügen des T7 Promotors an den 'forward' Primer konnten mit den Vollängen PCR Produkten in der T7 PCR infektiöse Transkripte hergestellt werden. Durch mechanische Inokulation mit den T7 PCR Ansätzen konnten in beiden Fällen in dem experimentellen Wirt *Nicotiana occidentalis* 37B Symptome ausgelöst werden. Die Infektion mit ASPV und ASGV wurde durch PCR Nachweise und elektronenmikroskopische Untersuchungen belegt.

Als weitere Methode wurde das Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) verwendet (Quan and Tian 2009). Hierbei wurde an die Primer für die Vollängen PCR ein Stück Vektorsequenz angehängt. Diese überlappenden Bereiche dienen in einer Fusions- PCR als Ausgangspunkt für die Polymerase. Mit Hilfe dieser Methode konnten infektiöse Vollängen cDNA Klone des ASPV und ASGV in einem pBin Vektor hergestellt werden. Nach Agroinokulation zeigten sich auf den Versuchspflanzen Symptome. Die Infektion wurde durch PCR und das Elektronenmikroskop belegt. Die Infektionsrate lag bei dem ASPV Klon bei 3 % und bei dem ASGV Klon bei 22 %.

In dieser Arbeit wurden infektiöse Vollängen cDNA Klone der latenten Apfelviren ASPV und ASGV mit der CPEC Methode hergestellt. Beide Klone könnten in weiteren Versuchen für die Erforschung der Ätiologie der durch die Viren hervorgerufenen Krankheiten genutzt werden. Des Weiteren wurde ein Versuch zur Nachweisbarkeit von ASPV über den gesamten Jahresverlauf in verschiedenen Apfelbaumgeweben durchgeführt, in dem sich Phloem als das zuverlässigste Gewebe zur Detektion von ASPV gezeigt hat. Die Nachweisbarkeit von ASPV, *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) und ASGV in Mischinfektionen wurde ebenfalls über einen längeren Zeitraum überprüft.

Summary

In this work an infectious full-length cDNA clone of *Apple stem pitting virus* (ASPV) was generated to give the possibility to study the aspects of the disease in different host plants. For the generation two strategies were followed. The first strategy was the classical ligation strategy, which is based on specific restriction sites inside the genome (Prüfer et al. 1995). These sites are used to ligate several amplified fragments of the genome into a plasmid containing the 35S promoter to construct the full-length clone. This strategy requires the knowledge of the complete sequence of the virus. Latent apple virus genomes show high sequence variability, which makes it necessary to determine the sequence prior to the development of a ligation strategy. Besides this there could be problems with stability and toxicity of the generated constructs in bacteria (Ülper et al. 2008). The second strategy should be less time and cost intensive than the ligation strategy. In addition it should circumvent the stability and toxicity problems.

The ASPV isolate PB66 was used for the generation of the full-length cDNA clone, but the ligation strategy was based on the sequence of isolate PA66. Due to problems with the amplification of polymerase chain reaction (PCR) fragments the whole sequence of PB66 was determined. ASPV PA66 and PB66 share 80% sequence identity. A new ligation strategy was developed. With this strategy a full-length cDNA clone of PB66 was generated under the control of the 35S promoter. The construct was not infectious. The full-length clone was sequenced and a change at the 5'-end and 19 base exchanges were determined in the sequence.

The second strategy was based on full-length PCR. Therefore primers at the 5'- and 3'-end were designed. The 5'- and 3'-end are highly conserved among different ASPV isolates, which provide the usage of a primer pair to generate full-length PCR products of different ASPV isolates. The whole genome was amplified during PCR, but ligation of the 9kb fragment into a plasmid failed. This full-length PCR protocol was also used for *Apple stem grooving virus* (ASGV). The whole genome 6,5 kb in size was amplified, but ligation also failed. The T7 promoter was fused to 5'-end primer and full-length products were generated. Full-length RNA transcripts were generated *in vitro* of both apple viruses. They were infectious in the experimental host *Nicotiana occidentalis* 37B. The infection was proven by PCR and electron microscopy.

The circular polymerase extension cloning (CPEC) was used to generate full-length cDNA clones of ASPV and ASGV (Quan and Tian 2009). Therefore, vector sequences were fused to the primers of the full length PCR. These overlapping sequences are used as start for the polymerase in a fusion-PCR. After agroinoculation both full-length cDNA clones were infectious. The infection was proven by PCR and electron microscopy. The full-length clone of ASPV showed an infection rate of 3%. The infection rate of the full-length ASGV clone was 50%.

In this work infectious full-length cDNA clones of ASPV and ASGV were generated with the CPEC method. Therefore, the CPEC method is a reliable method to generate full-length cDNA clones of different apple viruses. Both clones can be used to study the aspects of the diseases. In addition virus RNA extractions were made from buds or leaves, phloem, and roots from four different trees at monthly intervals throughout the year followed by RT-PCR tests for evaluation of seasonal detection reliability for ASPV. In tests using published ASPV primers phloem was the most reliable tissue for detecting the virus throughout the year in 20 year old trees. Mixed infections of ASPV, ACLSV and ASGV were established by grafting onto young apple trees. These were examined monthly by RT-PCR for the three viruses, beginning one year after infection. The results showed that April was the preferable month for virus detection in leaves while analyses in the summer months were less reliable.

1. Einleitung

1.1 Der Kulturapfel und seine Bedeutung

Der Kulturapfel gehört zur Familie der Kernobstgewächse (Pyrinae) die den Rosengewächsen (Rosaceae) zugeordnet wird. Nach heutigen Erkenntnissen ist der Kulturapfel (*Malus domestica* Borkh.) vermutlich eine Kreuzung aus dem asiatischen Wildapfel (*Malus sieversii*) und dem Kaukasusapfel (*Malus orientalis*) (Velasco et al. 2010). Außerdem nimmt man frühe Kreuzungen mit *Malus dasyphyllia* und *Malus praecox* an (Velasco et al. 2010). Die wilden Apfelarten des Genus *Malus* werden in 8 verschiedene Gruppen unterteilt (Qian et al. 2006). Die größte Diversität der wilden Apfelarten findet man in China (Qian et al. 2006). Ursprünglich ist der Apfel in der nördlich gemäßigten Zone in Europa, Asien und Amerika zu finden. Der Kulturapfel wird heute weltweit angebaut. Es gibt über 20.000 verschiedene Sorten des Kulturapfels von denen aber nur wenige ökonomisch wichtig sind (Mühl 1999). Im Jahre 2011 wurden weltweit über 4.760.000 ha im Apfelanbau bewirtschaftet (FAOSTAT). Damit gehört der Kulturapfel zu den bedeutendsten Obstarten der Welt. In Deutschland wurden im Jahr 2012 über 972.000 t Äpfel geerntet, was 90 % der gesamten deutschen Baumobsternte ausmachte. Insgesamt wurden 31.600 ha und damit 70 % der Anbaufläche beim Baumobst bewirtschaftet (Bundesamt für Statistik). Der Apfel ist somit in Deutschland die kommerziell wichtigste Obstart.

Im Apfelanbau treten eine Vielzahl von Krankheiten und tierischen Schaderregern auf, die die Ertragsmengen stark beeinflussen können. Zu ihnen gehören zum Beispiel im Bereich der tierischen Schaderreger der Apfelwickler, im Bereich der phytopathogenen Pilze der Apfelschorf, der Feuerbrand im Bereich der Bakterien und zahlreiche Viren und Viroide. Während man bei den drei erstgenannten Schadorganismen eine Bekämpfung mit Pflanzenschutzmitteln durchführen kann, ist dies bei einer Infektion mit Viren und Viroiden nicht möglich. *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) aus der Familie der *Betaflexiviridae* gehören zu den am häufigsten vorkommenden Apfelviren (Birişik et al. 2008; Hassan et al. 2008; Barone et al. 2008; Rana et al. 2011; Wang et al. 2011). ASPV, ASGV und ACLSV rufen nur auf wenigen Apfelsorten sichtbare Symptome hervor. Die Infektion mit diesen latenten RNA Viren kann zu Ertragseinbußen von 30 bis 40 % führen, da die Quantität und die Qualität der Früchte durch die Infektion abnehmen (Campbell 1963; Cembali et al. 2003). Eine

Übertragung erfolgt hauptsächlich durch Veredelung, deswegen ist virusfreies Vermehrungsmaterial in Form von Reisern und Unterlagen zwingend erforderlich. Die Testung auf Infektion mit ASPV, ASGV und ACLSV erfolgt über Bioindikatoren, den Enzym gekoppelten Antikörper gebundenen Nachweis (ELISA; Enzyme linked Immunosorbend Assay) und Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR). Die Überprüfung mit Bioindikatoren durch sensitive Apfelsorten ist sehr zeitaufwändig (Stouffer 1989; Mink 1989; Welsh and van der Meer 1989; Silva et al. 2008) und für den heutigen Markt daher kaum praktikabel. Im molekularbiologischen Bereich besteht die Möglichkeit des Virusnachweises über den ELISA mit spezifischen Antikörpern (Paduch-Cichal and Tomala 2007; Pûpola et al. 2011) und verschiedenen PCR-Methoden (James 1999; Menzel et al. 2002; Komorowska et al. 2010).

Alle drei Viren sind verantwortlich für eine Reihe von Krankheitssymptomen auf verschiedenen Wirtspflanzen, die dazu geführt haben, dass es Synonyme für die mit ASPV, ASGV und ACLSV assoziierten Krankheiten gibt (Stouffer 1989; Welsh and van der Meer 1989; Mink 1989). Dies ist beim ASPV zum Beispiel das Pear vein yellows aus Birne (Jelkmann and Paunović 2011). Bei ASGV das *Citrus tatter leaf* in Zitrone und bei ACLSV das Plum pseudopox in Zwetschge (Yoshikawa 2009). Außerdem gibt es von ASPV, ASGV und ACLSV verschiedene Stämme, die sich in der Symptomausprägung und dem Wirtsspektrum unterscheiden (Nemchinov et al. 1998; Cieślińska et al. 2007; Huang et al. 2011). Die Ätiologie dieser Krankheiten ist bis heute wenig erforscht.

1.2 Die Familie der *Betaflexiviridae*

In der Taxonomie der Pflanzenviren gehört die Familie der *Betaflexiviridae* zusammen mit den Familien der *Alphaflexiviridae*, der *Gammaflexiviridae* und den *Tymoviridae* zur Ordnung der *Tymovirales* (Abb. 1; International Committee on Taxonomy of Viruses; 2012 (ICTV)). Die Familie der *Alphaflexiviridae* besteht aus 6 Gattungen (ICTV 2012). Diese sind *Alexivirus*, *Botrexvirus*, *Lolavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus*, *Sclerodarnavirus* und einem keiner Gattung zugeordneten Virus. Die Familie der *Gammaflexiviridae* beinhaltet die Gattung *Mycoflexivirus* mit dem Virus *Botrytis virus F* (ICTV 2012). Die *Tymoviridae* bestehen aus 3 Gattungen, *Maculavirus*, *Marafivirus*, *Tymovirus* und zwei keiner Gattung zugeordneten Viren (ICTV 2012). Die Familie der *Betaflexiviridae* ist mit sieben Gattungen und sieben keiner Gattung zugeordneten Viren die größte der vier Familien (ICTV 2012). Sie beinhaltet

die Gattungen *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citivirus*, *Foveavirus*, *Tepovirus*, *Trichovirus* und *Vitivirus*. Die Gattung *Carlavirus* ist mit 52 Viren die umfangreichste. Das Typvirus der Gattung *Capillovirus* ist *Apple stem grooving virus*. Neben diesem Virus beinhaltet die Gattung *Capillovirus* noch das *Cherry virus A*. Die Gattung *Foveavirus* setzt sich aus 5 Viren, dem *Apple stem pitting virus*, dem *Apricot latent virus*, dem *Asian prunus virus*, dem *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* und dem

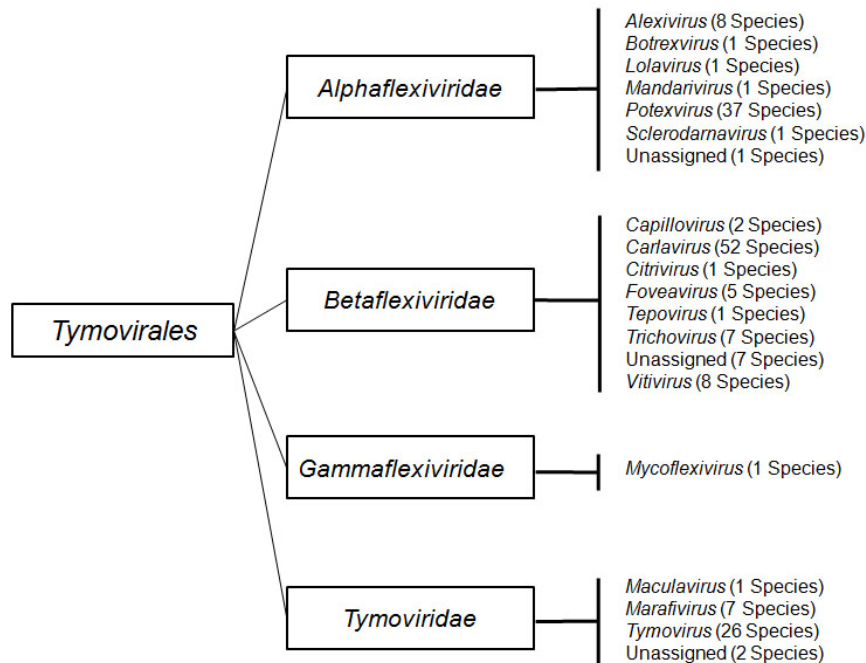


Abbildung 1: Aufbau der Ordnung der Tymovirales Gezeigt wird der Aufbau der *Tymovirales* mit den vier Familien *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Tymoviridae* und ihren jeweiligen Genera laut dem International Committee on Taxonomy of Viruses (2012)

Peach chlorotic mottle virus zusammen. Das *Apple stem pitting virus* ist das Typvirus dieser Gattung. *Apple chlorotic leaf spot virus* ist das Typvirus der Gattung *Trichovirus*. Der Gattung *Trichovirus* werden zusätzlich noch das *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*, das *Cherry mottle leaf virus*, das *Grapevine berry inner necrosis virus*, das *Grapevine Pinot gris virus*, das *Peach mosaic virus* und das *Phlomis mottle virus* zugeordnet. Viren der Familie *Betaflexiviridae* besitzen flexible und filamentöse Viruspartikel mit einem Durchmesser von 12 – 13 nm und einer Länge von 500 – 1000 nm (Adams et al. 2004). Sie haben ein (+)- Einzelstrang RNA Genom (ssRNA) mit einem Cap am 5'- Ende und einem 3' Poly(A)- Schwanz. Das Genom hat eine Größe von 5,5 - 9,5 kbp und es enthält 2 - 6 offene Leseraster (open reading frame, ORF) (Adams 2009). Die Translation der ORFs erfolgt zum Teil über

subgenomische mRNAs. Der erste ORF codiert für ein Polyprotein, das konservierte Bereiche für die in der Replikation benötigten Proteine enthält. Darauf folgend kommen ein oder mehrere Proteine für den Transport zwischen Pflanzenzellen. Die Gattungen *Capillovirus*, *Citivirus*, *Tepovirus*, *Trichovirus* und *Vitivirus* besitzen ein Movement Protein (MP) aus der '30K' Superfamilie (Adams 2009; Rubino et al. 2012). Die beiden Gattungen *Carlavirus* und *Foveavirus* besitzen drei sich zum Teil überlappende MPs, den sogenannten Triple Gene Block (TGB) (Morozov and Solovyev 2003; Adams et al. 2004). Das Hüllprotein der *Betaflexiviridae* ist 22 – 44 kDa groß. Bei einigen Viren gibt es einen zusätzlichen ORF am 3'-Ende von dem man annimmt, dass er für ein Protein zur Bindung von RNA codiert (Adams 2009). Als Wirtsbereich der Viren aus der Familie *Betaflexiviridae* finden sich krautige und holzige ein- und zweikeimblättrige Pflanzen, allerdings ist dieser für die einzelnen Viren normalerweise eingegrenzt (Adams 2009). Viren aus den Gattungen *Capillovirus*, *Citivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus* und *Vitivirus* befallen hauptsächlich holzige Wirte (Martelli et al. 2007). Die Übertragung der Viren ist in den einzelnen Gattungen unterschiedlich und kann nur durch direkten Kontakt zum Beispiel bei der Veredelung erfolgen (*Foveavirus*) oder durch Insekten, die als Vektoren fungieren (*Carlavirus*). Viele Viren der Familie *Betaflexiviridae* lassen sich durch mechanische Inokulation auf experimentelle Wirtspflanzen übertragen (Martelli et al. 2007).

1.2.1 Apple stem pitting virus

Das *Apple stem pitting virus* (ASPV) ist seit den 1940er Jahren aus den USA bekannt (Smith 1954). Die Wirtspflanzen des ASPV sind Apfel, Birne, Weißdorn und Quitte. Aufgrund der unterschiedlichen Symptome auf den verschiedenen Wirtspflanzen, gibt es Synonyme für das ASPV. Dazu gehören das Pear vein yellows, die Pear red mottle disease und die Quince sooty ringspot disease (Jelkmann 1997; Kundu and Yoshikawa 2008). Eine Übertragung erfolgt nur durch Veredelung und Wurzelkontakte, eine Übertragung durch Insekten ist nicht bekannt. Übertragungen durch mechanische Inokulation sind unter Gewächshaus-/ Laborbedingungen auch auf den nicht natürlichen Wirt *Nicotiana occidentalis* möglich (Koganezawa and Yanase 1990). Als Bioindikatoren werden *Malus pumila* cv. Virginia crab und *Malus* sp. Spy 227 verwendet, wobei es bei Virginia crab zur namensgebenden Stammnarbung (Abb. 2) ab der Veredelungsstelle kommt (Yoshikawa 2009). Während es bei *Malus* sp. Spy 227 zu einem starken Verfall des gesamten veredelten Triebes kommt und die Blätter Epinastie zeigen (Yoshikawa 2009).



Abbildung 2: *Apple stem pitting virus* Symptome auf dem Bioindikator *Malus pumila* cv. *Virginia crab*. Gezeigt wird die durch ASPV Infektion hervorgerufene Stammnarbung ab der Veredelungsstelle auf *Malus pumila* cv. *Virginia crab*. Foto: Julius Kühn- Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Dossenheim

ASPV besitzt ein lineares (+)- ssRNA Genom mit etwa 9,3 kb (Abb. 3). Es besteht aus 5 ORF und hat am 5'- Ende eine Capstruktur und am 3'- Ende einen Poly(A)-Schwanz (Jelkmann 1994). Der erste ORF codiert für die in der Replikation benötigten Proteine. Der Triple Gene Block wird von ORF 2 - 4 codiert und ORF 5

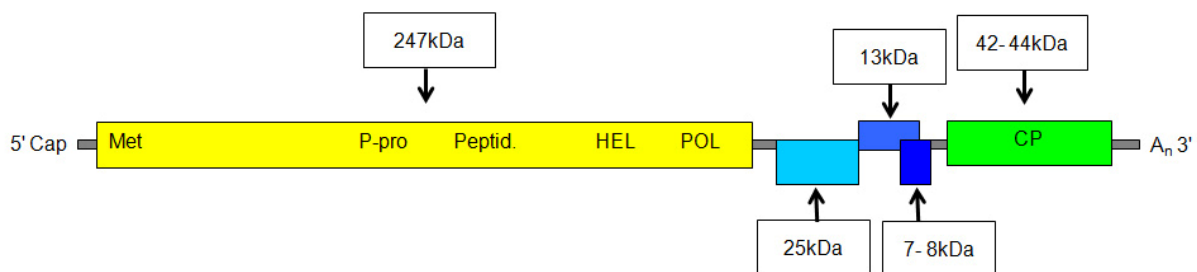


Abbildung 3: Schematischer Genomaufbau des *Apple stem pitting virus* Das lineare ssRNA Genom des ASPV enthält 5 offene Leseraster (ORF). Der erste ORF codiert ein Polyprotein, das alle für die Replikation benötigten Proteine enthält. ORF 2 - 4 codieren den Triple Gene Block. Das Hüllprotein wird vom fünften ORF codiert. Am 5'- Ende besitzt das Genom einen Cap und am 3'- Ende einen Poly(A)- Schwanz. Met: Methyltransferase; P-pro: Papain- like Protease; Peptid.: Endopeptidase; HEL: Helikase; POL: RNA Polymerase; CP: Hüllprotein

codiert das Hüllprotein. Die verschiedenen ASPV Isolate zeigen untereinander große Variabilität in der Sequenz. Diese wurde durch Sequenzierung von Genombereichen von ASPV Isolaten aus verschiedenen Wirten und Herkünften und deren Vergleich belegt (Schwarz and Jelkmann 1998; Nemchinov et al. 1998; Kundu 2008; Rodoni and Constable 2008; Gadiou et al. 2010; Komorowska et al. 2011). Bei einigen

Isolaten treten mehrere Sequenzvarianten innerhalb einer Virusquelle auf (Yoshikawa et al. 2001; Yoshikawa 2009).

1.2.2 Apple stem grooving virus

Das *Apple stem grooving virus* (ASGV) wurde erstmals während der Testung auf *Apple stem pitting virus* mit dem Indikator *Malus pumila* cv. Virginia crab gefunden (de Sequeira 1967). Es löst bei *Malus pumila* cv. Virginia crab Veränderungen an der Veredelungsstelle aus (Welsh and van der Meer 1989; James 2008), die von Stammfurchungen bis zu Verdickungen der Veredelungsstelle reichen können. Die Wirtspflanzen des ASGV sind Apfel, Birne, Aprikose, Kirsche, Zitrone und Lilie (Yoshikawa 2009). Die *Citrus tatter leaf* Krankheit in Zitrone wird durch ein Isolat von ASGV ausgelöst (Magome et al. 1997). ASGV ist durch Veredelung und Wurzelkontakte übertragbar. Übertragungen durch mechanische Inokulation sind unter Laborbedingungen auch auf die nicht natürlichen Wirte *Chenopodium quinoa* und *Nicotiana* möglich (Welsh and van der Meer 1989). Die Übertragung durch Samen tritt bei den beiden krautigen Wirtspflanzen Lilie und *Chenopodium quinoa* auf (Inouye et al. 1979). ASGV besitzt ein lineares (+)- ssRNA Genom mit etwa 6,5 kb (Abb. 4). Es besteht aus 2 übereinander liegenden ORF und hat am 5'- Ende eine Capstruktur und am 3'- Ende einen Poly(A)- Schwanz (Yoshikawa et al. 1992). Der erste ORF codiert ein Polyprotein, das die für die Replikation benötigten Proteine enthält und zusätzlich das Hüllprotein, welches über eine subgenomische RNA durch

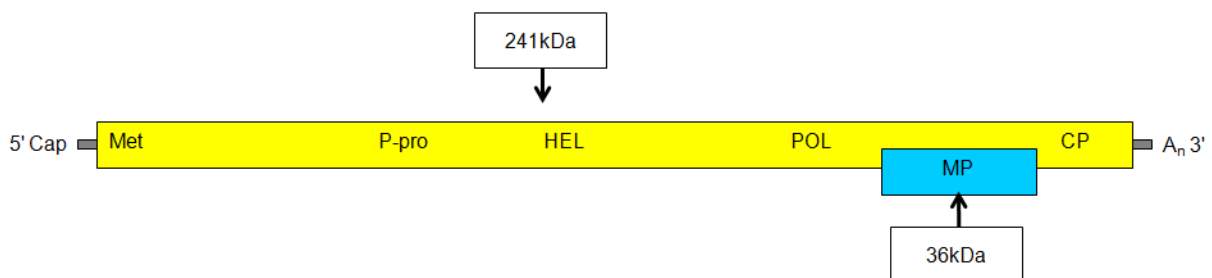


Abbildung 4: Schematischer Genomaufbau des *Apple stem grooving virus* Das lineare ssRNA Genom des ASGV enthält zwei offene Leseraster (ORF). Der erste ORF codiert ein Polyprotein, das alle für die Replikation benötigten Proteine und das Hüllprotein enthält. ORF 2 codiert für ein Movement Protein aus der '30k' Superfamilie. Am 5'- Ende besitzt das Genom einen Cap und am 3'- Ende einen Poly(A)- Schwanz. Met: Methyltransferase; P-pro: Papain- like Protease; HEL: Helikase; POL: RNA Polymerase; MP: Movement Protein; CP: Hüllprotein

das Ribosom translatiert wird (Yoshikawa 2009). Der zweite ORF codiert für ein Movement Protein aus der '30k' Superfamilie. Der Bereich im ersten ORF zwischen dem Ende der Polymerasedomäne und dem Anfang der Hüllproteindomäne liegt eine

sehr variable Region, die sich zwischen den verschiedenen Isolaten und selbst zwischen den Sequenzvarianten innerhalb einer Virusquelle stark unterscheiden kann (Yoshikawa 2009; Liebenberg et al. 2012).

1.2.3 *Apple chlorotic leaf spot virus*

Das *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) ist seit 1959 aus den USA bekannt, weil symptomlose Apfelsorten damals nach Veredelung mit dem Indikator *Malus sylvestris* cv. R12740-7A (Russian apple) chlorotische Blattflecken auf diesem auslösten (Mink and Shay 1959). Als Wirtspflanzen sind Apfel, Birne, Pfirsich, Pflaume, Kirsche, Aprikose und Zwetschge bekannt (Niu et al. 2008). Als Synonyme sind unter anderem Pear ring pattern mosaic, Plum bark split disease und Plum pseudopox bekannt (Yoshikawa 2009). Eine Vielzahl von Symptomen von chlorotischen Flecken bis zu Nekrosen können auf empfindlichen Bioindikatoren wie dem *Malus sylvestris* cv. R12740-7A und *Malus platycarpa* auftreten (Mink 1989). ACLSV wird durch Veredelung und Wurzelkontakte übertragen. Eine Übertragung durch mechanische Inokulation ist unter Gewächshaus-/ Laborbedingungen auch auf die nicht natürlichen Wirte *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana occidentalis* und weitere krautige Pflanzen möglich (Niu et al. 2008). ACLSV hat ein lineares (+)- ssRNA Genom mit etwa 7,5 kb (Abb. 5). Es besteht aus drei sich überlappenden ORF und hat am 5'- Ende eine Capstruktur und am 3'- Ende einen Poly(A)- Schwanz (German et al. 1990; Yoshikawa 2009). Der erste ORF codiert ein Polyprotein, das die für

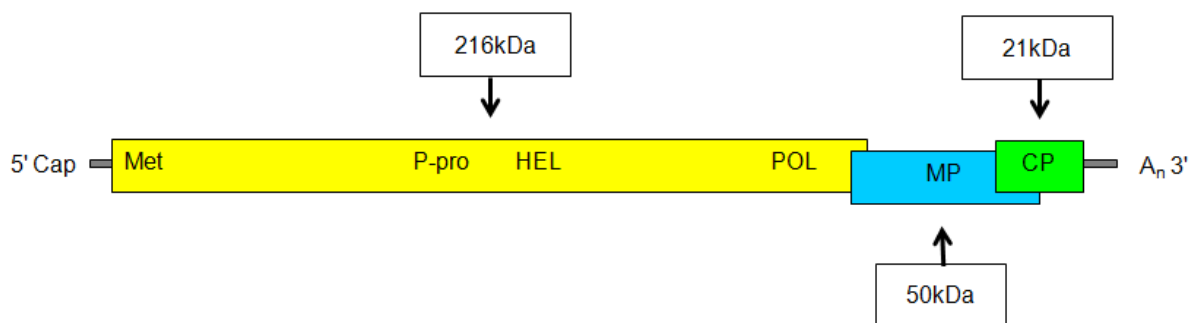


Abbildung 5: Schematischer Genomaufbau des *Apple chlorotic leaf spot virus* Das lineare ssRNA Genom des ASPV enthält drei offene Leseraster (ORF). Der erste ORF codiert ein Polyprotein, das alle für die Replikation benötigten Proteine enthält. ORF 2 codiert das Movement Protein. Das Hüllprotein wird vom dritten ORF codiert. Am 5'- Ende besitzt das Genom einen Cap und am 3'- Ende einen Poly(A)- Schwanz. Met: Methyltransferase; P-pro: Papain- like Protease; HEL: Helikase; POL: RNA Polymerase; MP: Movement Protein; CP: Hüllprotein

die Replikation benötigten Proteine enthält. Das Movement Protein wird vom zweiten ORF codiert und der dritte ORF codiert für ein 21 kDa großes Hüllprotein. Die verschiedenen ACLSV Isolate zeigen untereinander große Variabilität in der

Sequenz (German-Retana et al. 1997; Krizbai et al. 2001; Mathioudakis et al. 2010). Bei einigen Isolaten aus Apfel treten auch innerhalb der Virusquelle zwei bis drei verschiedene Sequenzvarianten auf (Candresse et al. 1995).

1.3 Infektiöse Vollängen cDNA Klone

In der Erforschung von durch Viren hervorgerufenen Pflanzenkrankheiten treten oftmals Schwierigkeiten bei der Erfüllung der Koch'schen Postulate auf (Youssef et al. 2011), da es technische Probleme bei der Aufreinigung der Viruspartikel und der experimentellen Übertragung auf die Versuchspflanzen geben kann. Außerdem treten ökonomisch wichtige Pflanzenviren oftmals in Mischinfektionen auf, was eine genaue Erforschung und Zuordnung der Symptome und Pathogenität zu einem einzelnen Virus erschwert (Untiveros et al. 2007). Dies hat dazu geführt, dass bei vielen Pflanzenviren die Zuordnung zu einem Krankheitsbild und Symptomen nur mit dem Vorkommen des Virus in der symptomatischen Pflanze verbunden wurde (Gentit et al. 2001; Youssef et al. 2011). Zur genauen Erforschung von Pflanzenviren verwendet man infektiöse Vollängen cDNA Klone ihres Genoms, von denen *in vitro* oder *in vivo* RNA Transkripte hergestellt werden, um damit gezielt Versuchspflanzen zu infizieren (Lee et al. 2011; Chen et al. 2012).

Die Herstellung von infektiösen cDNA Klonen kann über verschiedene Methoden erfolgen. Die klassische Methode ist die Ligationsstrategie. Dabei wird die bekannte Virussequenz in Fragmente aufgeteilt, die in mehreren Schritten über spezifische Restriktionsschnittstellen verbunden werden. Diese Methode wurde zum Beispiel bereits für Klone von ASGV und ACLSV genutzt (Terauchi et al. 1997; Satoh et al. 1999). Eine weitere häufig benutzte Methode ist die Vollängen-PCR, die es ermöglicht das komplette Virusgenom in einer PCR zu amplifizieren. Der Vollängen Klon wird dann in einem weiteren Schritt in das Plasmid ligiert (Spetz et al. 2008). Dazu werden an die verwendeten Primer meistens Schnittstellen angehängt, die eine gerichtete Ligation ermöglichen (Yoon et al. 2002; Rasmussen et al. 2009), da eine blunt- end Ligation von Vollängen-PCR Fragmenten, aufgrund ihrer Größe, zu Schwierigkeiten führen kann (Naylor et al. 2005). Für Viren, die ein zirkuläres Genom wie die Geminiviren besitzen, wurden Strategien, die die Rolling circle amplification (Wu et al. 2008) und die 'in planta' Klonierung (Jeske et al. 2010) verwenden, entwickelt.

Für die Infektionsstrategie gibt es zwei Wege: die *in vitro*- und die *in vivo*-Transkription der cDNA Klone. Bei der *in vitro* Transkription wird der Virussequenz

ein T7 oder SP6 Promotor, die ursprünglich Bakteriophagenpromotoren sind, an das 5'- Ende angehängt. Das Vollängen- Konstrukt wird dann über eine T7 oder SP6 Polymerase *in vitro* in RNA umgeschrieben. Dazu wird in den meisten Fällen das entstandene Plasmid vor der T7 oder SP6 PCR linearisiert (Prüfer et al. 1995; Stevens and Viganó 2007; Spetz et al. 2008). Bei vielen Viren muss der Reaktion ein Cap- Analog zugegeben werden, weil diese am endständigen Guanin eine Methylierung haben, die 5'- Cap genannt wird (Yoon et al. 2002; Edwards and Weiland 2010; Lee et al. 2011). Die meisten *in vitro* Transkripte sind ohne Cap nicht infektiös, da dieser die RNA vor Degradierung schützt (Yoon et al. 2002). Bei der zweiten Strategie wird das Vollängen cDNA Konstrukt zwischen 35S Promotor aus dem *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) und eine Terminationssequenz ligiert, dadurch kann das entstandene Plasmid direkt zur Infektion der Versuchspflanzen benutzt werden. Der 35S Promotor ermöglicht die direkte Herstellung von RNA Transkripten des Vollängen Klons innerhalb der pflanzlichen Zellen. Vollängen Klone mit 35S Promotor wurden in der Vergangenheit von vielen Pflanzenviren hergestellt, da mit ihnen die Wirtspflanzen direkt inokuliert werden können, keine zusätzlichen PCR-Schritte verbunden und keine Degradierung der RNA zu befürchten sind (Terauchi et al. 1997; Takahashi et al. 1997; Yang et al. 1998; Satoh et al. 1999; Meng et al. 2013).

Bei der Konstruktion eines Vollängen cDNA Klons können einige Faktoren eine kritische Rolle spielen. Die entstandenen Konstrukte der Ligationstrategie oder der fertige Klon können eine toxische Wirkung auf die Bakterien, in denen sie vermehrt werden, haben (Yang et al. 1998; López-Moya and Garcia 2000). Außerdem kann es in Bakterien ein Problem mit der Stabilität der Vollängen cDNA Klone geben (Yang et al. 1998; Ülper et al. 2008). Aus diesem Grund werden Introns in die Konstrukte eingebaut, die die Stabilität erhöhen und die Toxizität herabsenken (Johansen 1996; Lopez-Moya and Garcia 2000). Durch Introns wird das Herstellen von funktionstüchtigem Protein des Virus innerhalb der Bakterienzelle unterbunden und somit können keine toxischen Produkte entstehen, die die Bakterien schädigen. In Pflanzenzellen werden sie *in vivo* aus der Sequenz eliminiert und stören somit nicht die Expression der Proteine oder die Virusinfektion (Johansen 1996).

Zur Infektion von Versuchspflanzen stehen drei Methoden zur Verfügung. Einmal die mechanische Inokulation bei der das Pflanzenblatt durch Carborund und leichte mechanische Einwirkung verletzt und somit ein Eindringen des Vollängen Klons in

die Pflanzenzellen ermöglicht wird. Diese Methode ist die einfachste und wurde bereits bei vielen Klonen verwendet (Maiss et al. 1992; Terauchi et al. 1997; Lin et al. 2002; Hasiów-Jaroszewska et al. 2009). Der biologische Beschuss von Pflanzen oder Pflanzenteilen mit dem an Gold oder Wolfram gebundenen Vollängen Klon stellt eine andere Methode zur Infektion von Versuchspflanzen dar, die es ermöglicht tiefere Pflanzenzellschichten ohne größere Schäden zu erreichen (Lamprecht and Jelkmann 1997; Satoh et al. 1999; Lapidot et al. 2007). Somit lassen sich auch mit Vollängen Klonen, die bei mechanischer Inokulation nur schlechte oder gar keine Infektion zeigen erfolgreich Pflanzen infizieren (Dagless et al. 1997). Außerdem gewährleistet die Methode eine hohe Zuverlässigkeit, da sie immer unter identischen Bedingungen wiederholt werden kann (López-Moya and Garcia 2000). Als dritte Methode wird häufig die Agroinfektion genutzt (Prüfer et al. 1995; Lamprecht and Jelkmann 1997; Stephan and Maiss 2006; Wu et al. 2008). Dafür wird der Vollängen Klon in einen pBin Vektor unter der Kontrolle des 35S Promotors ligiert. Dieser pBin Vektor besitzt Tandemwiederholungen von 25 Basen, die als left und right border bezeichnet werden. Diese flankieren die T- DNA, die während der Infektion ins Pflanzengenom integriert wird (Komori et al. 2007). Dazu wird das entstandene Konstrukt über Transformation in Laborstämme des *Agrobacterium tumefaciens* gebracht und mit diesen werden die Versuchspflanzen mechanisch infiziert.

Infektiöse Vollängen cDNA Klone von Viren stellen in der Forschung ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung von vielen Aspekten der von den Viren ausgelösten Krankheiten dar (Prüfer et al. 1995; Huang et al. 2005). Dazu gehören zum einen die Erforschung der Symptomatologie und Pathogenität. Für Viren, die häufig in Mischinfektionen vorkommen, ermöglichen infektiöse cDNA Klone die gezielte Untersuchung von Einzelinfektionen und deren Auswirkungen. Außerdem kann man bei Viren, die wie ASPV und ASGV in mehreren Sequenzvarianten innerhalb einer Virusquelle vorkommen, singuläre Infektionen einer bestimmten Variante setzen (Yoshikawa 2009; Hajeri et al. 2011). Dabei ist ein wichtiger Aspekt der Vergleich von verschiedenen Isolaten in Hinblick auf Symptomausprägung und Wirtsbereich (Stephan and Maiss 2006; Lapidot et al. 2007). So konnte anhand von verschiedenen Klonen des *Potato virus X* (PVX) gezeigt werden, dass ein einzelner Austausch im C- terminalen Bereich der RNA- Polymerase zu unterschiedlichen Symptomen im experimentellen Wirt *Nicotiana benthamiana* führt (Kagiwada et al. 2005). Ähnliches wurde auch mit Hilfe eines cDNA Klons von ASGV gezeigt, bei dem

ein Basenaustausch zu schwächeren Symptomen gegenüber dem Wildtyp ASGV führte (Hirata et al. 2003). Am Beispiel des *Plum pox virus* (PPV) konnte durch Austauschen von Genomfragmenten zweier Klone, die auf zwei Isolaten mit unterschiedlichem Wirtsbereich beruhen, der Wirtsbereich geändert werden (Salvador et al. 2008). Des Weiteren finden infektiöse Klone Verwendung bei der Untersuchung der einzelnen Genfunktionen innerhalb des Virusgenoms. So wurde zum Beispiel die Funktion des Triple Gene Blocks, der in den Virusgattungen *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Allexivirus*, *Foveavirus*, *Hordeivirus*, *Benyvirus*, *Pomovirus* und *Pecluvirus* vorkommt und für die intra- und interzelluläre Bewegung innerhalb des Wirtes verantwortlich ist, durch Mutationen in infektiösen cDNA Klonen untersucht (Beck et al. 1991; Herzog et al. 1998; Morozov and Solovyev 2003). Außerdem kann man mit infektiösen Klonen die Übertragung durch Vektoren untersuchen. Dazu wurden zum Beispiel durch Mutation verschiedene Klone des *Cucumber mosaic virus* (CMV) hergestellt, die sich in der Symptomausprägung gegenüber dem Wildtyp Isolat unterscheiden und im Weiteren auch die Übertragung durch den Vektor *Myzus persicae* negativ beeinflussten (Liu et al. 2002).

In der praktischen Anwendung werden infektiöse cDNA Klone als Vektor für die Expression von Fremdproteinen verwendet. Dabei kommen Viren aus vielen verschiedenen Virusgattungen, wie zum Beispiel der *Bromo-*, *Tobamo-*, *Poty-* und *Potexvirus* zum Einsatz (Pogue et al. 2002). Als Fremdprotein werden verschiedene Proteine eingesetzt, die von medizinischem oder diagnostischem Interesse sind (Scholthof et al. 1996; Pogue et al. 2002; Lico et al. 2008). So wurde zum Beispiel bei einem infektiösen cDNA Klon des *Ribgrass mosaic virus* (RMV) aus der Gattung *Tobamovirus* ein Epitop der Tuberkulose eingebaut, welches erfolgreich gebildet wird und für die Antikörper Herstellung verwendet werden kann (Zhu et al. 2006). Infektiöse cDNA Klone von Pflanzenviren finden außerdem Anwendung in der Abwehr von Pflanzenkrankheiten durch Gene Silencing Systeme (Angell and Baulcombe 1997; Ratcliff et al. 2001; Holzberg et al. 2002).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es einen infektiösen Vollängen cDNA Klon des ASPV herzustellen, um die Erforschung der Symptomatologie und Pathogenität der unterschiedlichen Isolate erforschen zu können. Dazu wurden verschiedene Methoden genutzt, wie die Ligationsstrategie und die Vollängen PCR. Es sollte ein Protokoll entwickelt werden, welches die Herstellung von Vollängen cDNA Klonen vereinfacht und weniger kosten- und zeitintensiv ist. Für die Entwicklung einer Ligationsstrategie benötigt man die komplette Sequenz des Virus, da diese auf spezifischen Restriktionsschnittstellen für die Ligation der Genomfragmente beruht. Bei hochvariablen Viren wie dem ASPV ist dieses oftmals problematisch und zeitaufwändig, da zuerst die komplette Sequenz des Isolates bestimmt werden muss. Zusätzlich kann es bei der Ligationsstrategie zu weiteren Problemen mit den Zwischen- und Endkonstrukten durch fehlende Stabilität und Toxizität innerhalb des Bakteriums kommen. Das Ziel war es ein Protokoll zu entwickeln, das diese Probleme umgeht. Dieses sollte dann auf ein weiteres latentes Apfelmavirus, in diesem Fall das ASGV, angewendet werden.

Des Weiteren sollten Versuche zur Nachweisbarkeit in verschiedenen Apfelbaumgeweben und in Mischinfektionen mit ASGV und ACLSV über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, um Hinweise auf zuverlässige Nachweiszeitpunkte und Gewebe zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei ASPV Isolate sequenziert und daran anschließend Genomanalysen und Verwandtschaftsuntersuchungen durchgeführt, um die Variabilität von ASPV zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Für Infektionsversuche mit verschiedenen Virusisolaten und den Volllängen Konstrukten wurden verschiedene, am Julius Kühn- Institut Dossenheim vorhandene Pflanzen verwendet. Hierzu zählen *Nicotiana occidentalis* 37B, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* var. Samsun und *Chenopodium quinoa*. Des Weiteren wurden *Malus x domestica* 'Golden Delicious' und *Pyrus communis* als holzige Versuchspflanzen verwendet. Außerdem kamen verschiedene *in vitro* angezogene *Pyrus communis* und *Malus x domestica* Linien zur Anwendung.

2.1.2 Viren

Tabelle 1: Virusisolate

Virus	Infektionsnummer	Herkunft
ASPV PB66	40/85	Großbritannien
ASPV Hannover	39/85	Deutschland
ASPV Bologna	69/97	Italien
ASPV China	(13)/07	China
ASGV Gambach	41/85	Deutschland
ASGV China	(14)/07	China
ACSLV Uhl	44/87	Deutschland
ACLSV P203	(12)/06	Japan

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Antigen	Herkunft, Referenz
Anti Rabbit IgG (aus Ziege)	Kaninchenantikörper	Sigma (Bestellnummer A8025)
AS 647 (aus Kaninchen, Rohserum)	ASPV CP	Prof. Dr. W. Jelkmann

2.1.4 Plasmide, Klonierungsvektoren und Größenstandards

Tabelle 3: Plasmide und Klonierungsvektoren

Klonierungsvektor	Herkunft, Referenz
pGEMTeasy [®]	Promega
pGEMT [®]	Promega
pJET1/blunt	Thermo Scientific Fischer
pJET1.2/blunt	Thermo Scientific Fischer
p1657	Prof. Dr. E. Maiss
pCBSp35HDVpA	Prof. Dr. E. Maiss
pCB301N	Prof. Dr. E. Maiss

Tabelle 4: Größenstandards

Bezeichnung	Herkunft
Gene Ruler 50bp DNA ladder	Thermo Scientific Fischer
Gene Ruler 1kb DNA ladder	Thermo Scientific Fischer
Page Ruler Prestained Protein ladder	Thermo Scientific Fischer
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs

2.1.5 Oligonukleotide

Die Ableitung von sequenzspezifischen Primern wurde mit Hilfe des Programms Lasergene 7.1 (DNASar Inc. Madison, USA) vorgenommen. Sämtliche Oligonukleotide wurden über MWG Biotech bezogen.

Tabelle 5: Allgemeine Primer

Name	Sequenz [5'- 3']	Verwendung
Random Primer	(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)	Reverse Transkriptase PCR
Oligo(dT)18	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Reverse Transkriptase PCR
PolyT	CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	RACE PCR
M13for	CCCAGTCACGACGTTGTAACACG	Colony PCR
M13rev	AGCGGATAACAATTTACACAGG	Colony PCR
pJet1.2for	C GACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Colony PCR
pJet1.2rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Colony PCR
Olli	TTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAG	Colony PCR
Fusion35SF	GAAGACCAAAGGGCTATTGAGAC	Colony PCR
dN6- RP	GCCGGAGCTCTGCAGAATTC(AGCT) ₆	Random PCR
dN6- UP	GCCGGAGCTCTGCAGAATTC	Random PCR

Tabelle 6: Primer zum Virusnachweis Die Primer in der nachstehenden Tabelle wurden von Menzel *et al* (2002) für ASPV, ASGV und ACLSV (GenBank accession no. D21828, AB004063, D14996) entwickelt und zum Virusnachweis verwendet.

Name	Sequenz [5'- 3']	Tm [°C]	Position
ASPV-F-8869	ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA	60	8869–8895
ASPV-R-9211	TTGGGATCAACTTTACTAAAAGCATAA	60	9211–9238
ASGV-F-6039	GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA	60	6039–6064
ASGV-R-6286	AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA	60	6286–6311
ACLSV-F-6860	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	60	6860–6880
ACLSV-R-7507	AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	60	7507–7536

Tabelle 7: ASPV PA66 spezifische Primer Die Primer in der nachstehenden Tabelle wurden anhand der Sequenz des Isolates PA66 (GenBank accession no. NC_003462) abgeleitet. Bei einigen Reverse Primern wurde eine *Apal* Schnittstelle angehängt (unterstrichener Bereich).

Name	Sequenz [5'- 3']	Tm [°C]	Position
ASPV-F-1	AATACGCAAACAACTCTGAAC	55	1-22
ASPV-F-1aP	AATACGCAAACAACTCTGAACAAG	58	1-25
ASPV-F-1P	AATACGCAAACAACTCTGAA	50	1-21
ASPV-F-76	GAACAGCTGCAGAGGAAGTAATCG	63	76-99
ASPV-F-191	CTATGCGTTGCCAGAGTTG	57	191-209
ASPV-F-236	GATCTACCTCAGCCCCATTCTAC	66	236-260

ASPV-F-251	CCATTCCTACAGACCTCATTCCCAC	65	251-275
ASPV-F-257	CTACAGACCTCATTCCCACCCAG	65	257-279
ASPV-F-358	TTAAGAAAAATAAGGTGCGACT	50	358-378
ASPV-F-366	AATAAGGTGCGACTTTTTGAAGAGAAG	59	366-391
ASPV-F-381	TTGAAGAGAAGACATCCAGATTTGC	60	381-405
ASPV-F-2170	CCCTTCATGGTAATCTGGTGTTCC	63	2170-2193
ASPV-F-2172	CTTCATGGTAATCTGGTGTTCC	58	2172-2193
ASPV-F-2174	TCATGGTAATCTGGTGTTCCCTTG	59	2174-2196
ASPV-F-2234	TTACTCGAGGGATCTAAAGGGG	60	2234-2255
ASPV-F-2235	TACTCGAGGGATCTAAAGGGGTA	61	2235-2257
ASPV-F-2236	ACTCGAGGGATCTAAAGGGGTACA	63	2236-2259
ASPV-F-3531	TATGGGATAAGACTGAATGTG	54	3531-3551
ASPV-F-3941	ATTCAGCCCAATCGTCTCAGATC	61	3941-3963
ASPV-F-4657	TGCCTTGCAACCTCAATAAG	55	4657-4676
ASPV-F-4564	GTGAAAGTGATATCATGAGAATT	54	4564-4586
ASPV-F-5571	GTGCCTCTGAATAGCAGTCATG	60	5571-5592
ASPV-F-6219	GATGACATGTGCGCTAACTCTA	58	6219-6240
ASPV-F-6878	TGAGAAGGCCAACATCCACG	59	6878-6897
ASPV-F-7317	GTTGGCCCTGACCTATTTGTTG	60	7317-7338
ASPV-F-7992alt	CCAATGGTTTCAGCAGAGGAGCC	64	7992-8014
ASPV-F-8597P	GAGACGTCTTGACTCTGTGGG	66	8597-8617
ASPV-R-387P	TCTTCAAAAAGTCGACCTTAT	52	367-387
ASPV-R-391P	CTTCTCTTCAAAAAGTCGACCTTAT	58	367-391
ASPV-R-483	AAGGGCTAACATGGAAGAAACC	58	462-483
ASPV-R-523	CCTGTTCTCCGGTCACACTTG	62	503-523
ASPV-R-539	AGCATCATCCTCAAAACCTG	55	520-539
ASPV-R-2230	<u>AAGGGCCCTTAGATCCCTCGAGTAAAAAC</u>	68	2230-2250
ASPV-R-2249	<u>AAGGGCCCTAGATCCCTCGAGTAAAAACT</u>	68	2229-2249
ASPV-R-2386	<u>AAGGGCCCGTGACCAGTGCTATACTCCTGAAC</u>	72	2361-2391
ASPV-R-2493	<u>CTGACCCCAGGCACTCTATACAG</u>	64	2471-2493
ASPV-R-2535	GCATGAGAAGCATTGAGGTC	58	2515-2535
ASPV-R-2569	ATCCCATGTCTATGCTCCTTTTG	59	2547-2569
ASPV-R-2677	<u>AAGGGCCCGAGTCACCATGATCACAATG</u>	68	2657-2685
ASPV-R-3969	TATTCAGATCTGAGACGATTG	54	3949-3969
ASPV-R-4336	CTCTTCCAGTCTTCTTTCCACC	62	4314-4336
ASPV-R-4578	<u>AAGGGCCCTGATATCACTTTCACTACCAG</u>	68	4558-4578
ASPV-R-4578	<u>AAGGGCCCTGATATCACTTTCACTACCA</u>	65	4559-4578
ASPV-R-4586	<u>AAGGGCCCTGATATCACTTTCACTACCAGC</u>	68	4557-4578
ASPV-R-4638	GATTCCGGAACCTCTGACTCAAG	62	4616-4638
ASPV-R-4638	<u>AAGGGCCCGATTCCGGAACCTCTGACTC</u>	71	4619-4638
ASPV-R-5100	GGAATCCTTCAATGAGTTCTG	56	5080-5100
ASPV-R-6031	CCCAAGAATTTGATGACTTCAAG	57	6009-6031
ASPV-R-6234	<u>AAGGGCCCTAGCGCACATGTCATCACCCG</u>	72	6214-6234
ASPV-R-7236	CAACACTGTGCCACTTCAGAAAG	61	7214-7236
ASPV-R-7773	GTGATAACTATAGTACATTGGCTCG	58	7749-7773
ASPV-R-8606	<u>AAGGGCCCAAGACGTCTCCTCATTCCCCCA</u>	68	8589-8606
ASPV-R-8796alt	CCAACAGTGCAGACTTGTCTGAGGCG	68	8771-8796

Tabelle 8: ASPV PB66 spezifische Primer Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Primer wurden an der Sequenz des ASPV Isolates PB66 (GenBank accession no. KF321966) abgeleitet.

Name	Sequenz [5'- 3']	Tm [°C]	Position
ASPV-F-1kurz	GGATACGCAAACAACTCTGAACAAG	62	1-26
ASPV-F-191a	CTATGCGTTACCAGAGTTGGC	60	192-212
ASPV-F-215	GATGAAGTTGTTTAAATCTG	49	216-235
ASPV-F-791	CTGAGGCTTACATTCAGCCTG	60	791-811
ASPV-F-1609	CCATGTGTGGTTGGAGCTTTC	60	1609-1629
ASPV-F-2005	CACATGGTTGAAATTGGGAAAGC	59	2005-2027
ASPV-F-2976	GTTCAACCCTACTGATCG	57	2975-2993

ASPV-F-3857	GGTCAACGAGAATGGAAAG	55	3858-3876
ASPV-F-4504	GCCGGAGATCCATGCCAGAG	64	4504-4523
ASPV-F-5586	AGGCACAATGAAGCAATGATGAGT	59	5587-5610
ASPV-F-5788	GCTTGCTTTCAACATTGATCCTATG	62	5788-5813
ASPV-F-6397P	GCCAGAGAAACACGGAACCTTG	62	6397-6418
ASPV-F-6494	CTTGAGCCTGTATCTCACTCC	60	6477-6497
ASPV-F-6710neu	CAGGTTGAGTTAGATCTTTCATTGTG	60	6711-6736
ASPV-F-6970	CTGGTGAGTATTCCACAGGG	59	7047-7066
ASPV-F-7947	GCCTTAAGCCTTATTACCACC	58	7916-7936
ASPV-F-8191RT	CTTTAGCTCCGATTGTTGGTGG	60	8192-8213
ASPV-F-8862RT	GGAACGATGATCAAGCAAACC	58	8863-8883
ASPV-R-63	CATTTTCGAGTAAATTATGAGGTTGCC	60	38-63
ASPV-R-67	GAGCCATTTTCGAGTAAATTATGAGG	60	43-67
ASPV-R-410	GTACCTATTGATGGTCTCAACC	58	411-432
ASPV-R-941	GGCCTATAGCTTCTCCCTTGG	62	920-940
ASPV-R-1644	GACCCTGCACTCACTGAAAGC	62	1624-1644
ASPV-R-2159	GCTGAATGAAACAGTTCAGG	55	2136-2155
ASPV-R-2571	GATTCCATGCCTGTGCTCTC	59	2552-2571
ASPV-R-2634	CTGATGATCATCTTCTTAG	53	2615-2634
ASPV-R-3193	CAATCAGATCCGTGGAGCAAC	60	3173-3193
ASPV-R-3758	GATCTTCATGAGCAGGTTTACC	58	3727-3748
ASPV-R-4193	CATCCAAATGTTCCCAGAATC	60	4173-4193
ASPV-R-5362	CAGTGAATTGCTCAGTAGTC	55	5343-5362
ASPV-R-5970	GGCTTCGTAATCAGACTCAGTGC	62	5948-5970
ASPV-R-6924	TTGCCTGGCTTTCTTGATGTATGT	59	6967-7000
ASPV-R-8040neu	CCATGACTAAAACTTAGAAATGCG	58	8017-8041
ASPV-R-8182	CAACAATCGGAGCTAAAGATTG	57	8188-8209
ASPV-R-8247	GATTGGACTTGAGAAATCACTG	57	8171-8192
ASPV-R-8288RT	GCCCTTTCTTGACGCCTCATCC	64	8268-8289
ASPV-R-9023	CAGCATGAGGTTCCAGACATG	60	8926-8946
ASPV-R-9023RT	GAAGAAGTCAAAGCCGCATACCTG	63	9000-9024

Tabelle 9: ASPV Hannover spezifische Primer Die Primer in der nachfolgenden Tabelle wurden anhand der Sequenz des ASPV Isolates Hannover (GenBank accession no. KF321967) abgeleitet.

Name	Sequenz [5'- 3']	Tm [°C]	Position
ASPVHaF110	CGACTCAAGCTGTGTTAACTCTGAC	63	134-158
ASPVHaF-372	GTTGATTTTCTCAAGAGGAG	56	372-392
ASPVHaF622	CACGTTCCAGCCTGAGATAATGC	60	649-670
ASPVHaF677	CCGGTGCCAAAGAGAGTCTGAATC	64	704-727
ASPVHa-F-1474	GTGACAGTTGTGAATCACACC	58	1474-1494
ASPVHa-F-1516	GAGGCTTATGAATATCAATTCC	55	1516-1537
ASPVHa-F-3596	CACATGAGGTCCTCAAAGCTG	60	3590-3610
ASPVHa-F-3620	CCCTTGTTTGCCAAGATAATC	56	3614-3634
ASPVHannF26	GGAAAGAGAACCGGAAAGAGTAAG	61	4318-4341
ASPVHa-F-5316	GTCTCGAAGCTGTACGGGCG	64	5267-5286
ASPVHa-F-6075	CAAGACGCATCTTGGCTCGAAG	62	6069-6090
ASPVHa-F-6220	GCAGGTGATGACATGTGCGC	61	6214-6233
ASPVHa-F-6921	CAAGAAAGCCAGGCAAGGTC	59	6926-6945
ASPVHa-F-7681	GTGGTCTGGGTCAGGCAATCGCC	68	7686-7708
ASPVHa-F-8684	GCTTACAGAGGTTGGGGTCTATC	62	8715-8737
ASPVHaR258	GCAGACAGGGTGAGAATGAGGG	64	264-285
ASPVHaR411	GGATATGTATCTGTTGATGGTC	57	417-438
ASPVHaR655	CGATTGAGGCAAGCATTATCTC	58	661-682
ASPVHaR713	GTGTAACACCAAGGATTCAAGAC	58	719-740
ASPVHa-R-1223	CAGGCAACATGTTGGTGTTC	57	1194-1213
ASPVHa-R-1855	CGTCTCTTCCAGAAGGTAGG	59	1836-1855
ASPVHa-R-2830	CAATCTGAATCAGAAAGTCC	53	2805-2824

ASPVHa-R-3701	CCCAAGTGCAGATGATATGGC	60	3676-3896
ASPVHa-R-3871	CATTGACCATTATGAGCTCC	55	3846-3865
ASPVHannR123	GTGTGACCTTCTTTAATGCTATCAAG	60	4390-4415
ASPVHannR217	CCCAGCAATTATCAAGTTCACG	58	4488-4509
ASPVHannR526	CAAACCTAGATGGGCAGCAAC	61	4798-4818
ASPVHa-R-6004	GGATGAAGTGATCCTGTGACG	60	5978-5998
ASPVHa-R-6570	GTAGTGAGCATCCACCTTTG	60	6499-6519
ASPVHa-R-6751	CGTTTAACAACTGAGCACAG	56	6736-6756
ASPVHa-R-7605	CCTCCGTGGGGTAAACTATG	59	7525-7544
ASPVHa-R-8215	GACTGATGACAGGCTCACCC	61	8130-8149
ASPVHa-R-8727	CATCAGCGCAATGCCTTGCAAG	62	8737-8758
ASPVHa-R-9081	CCATAGAGCGGATCCGGTAC	61	9093-9112
ASPVHa-R-9241	GGCCGTCCCAATTAAGTCGGG	64	9251-9271

Tabelle 10: ASGV spezifische Primer Die verwendeten Primer für ASGV wurden an de Sequenz des Isolates mit der GenBank accession no. NC_001749 abgeleitet.

Name	Sequenz [5'- 3']	Tm [°C]	Position
ASGV-F-1P	GGAAATTTAACAGGCTTAATTTCCGCGC	64	1-28
ASGV-F-1868	CTCTGCACACTTGGGGATTGAC	62	1868-1889
ASGV-F-5873*	CCCCTGTTGGATTTGATACACCTC	70	5871-5895
ASGV-F-6214	CCACTGGTCTGAAAATGAATCGTC	65	6214-6237
ASGV-R-197	CAATTCTTGATCTTCTGGTGTG	57	176-196
ASGV-R-266	CATTTTGGATATTGGATGGGAGTG	59	243-266
ASGV-R-1527	GGCTCTTACCAATCTTGAATAGTC	59	1527-1550
ASGV-R-2856	CTTGAAACCACTGACCGAACCTGTA	63	2832-2856

*Primer wurde nicht selbst designet.

Tabelle 11: Primer für die Vollängen PCR Die nachfolgenden Primerpaare wurden für die Amplifikation von Vollängen cDNA Produkten von ASPV und ASGV verwendet.

Name	Sequenz [5'- 3']
ASPV-F-1lang	GGATACGCAAACAACTCTGAACAAGTAAATTATAAAG
ASPV-R-9332P	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAAATCTAGTTAAAACAAAA
ASGV-F-1	GGAAATTTAACAGGCTTAATTTCCGCGC
ASGV-R-6475	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGATGGGACAACTCTAGAC

Tabelle 12: Primer für T7 Vollängen Produkte Die nachfolgenden Primer wurden für die Amplifikation von T7 cDNA Vollängen Produkte eingesetzt. Den beiden Forward Primern wurde der T7- Promotor vorgeschaltet (unterstrichener Bereich).

Name	Sequenz [5'- 3']
ASPV-F-1langT7	<u>taatac</u> gactcactataGGATACGCAAACAACTCTGAACAAGTAAATTATAAAG
ASPV-R-9332P	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAAATCTAGTTAAAACAAAA
ASGV-F-1T7	<u>taatac</u> gactcactataGGAAATTTAACAGGCTTAATTTCCGCGC
ASGV-R-6475	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGATGGGACAACTCTAGAC

Tabelle 13: Primer für das Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Für das CPEC wurden an die Virussequenz Bereiche aus der Vektorsequenz der Vektoren p1657 und pCBSp35HDVpA (Tab. 3) angehängt (unterstrichener Bereich) um überlappende Bereiche für die Fusionierung von Vektor und Virussequenz zu erhalten.

Name	Sequenz [5'- 3']
ASPVfusionF	<u>aggaagttcatttcatttggagagg</u> GGATACGCAAACAACTCTGAAC
ASPVfusionR	gagatgccatgccgacc <u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> GAAAATCTAG
ASGVfusionF	<u>aggaagttcatttcatttggagagg</u> GGAATTTAACAGGCTTAATTTCC
ASGVfusionR	gagatgccatgccgacc <u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> TAGATGGGAC
2088 [†]	GGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTC
2087 [†]	CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAG

[†] von Prof. Dr. Maiss (persönliche Mitteilung)

2.1.6 Reaktionskits

Tabelle 14: Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick [®] PCR Purification Kit	QIAGEN
RNeasy [®] Plant Mini Kit	QIAGEN
CloneJET [™] PCR Cloning Kit	Thermo Scientific Fischer

Keine Angabe vom Hersteller über die Zusammensetzung der enthaltenen Puffer.

2.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 15: Bakterienstämme

Art/Gattung	Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	NM 522	<i>supE thr⁻¹ Δ (lac- proAB) Δ</i> (<i>mcrB- hsdSM</i>) 5 (r _K . m _K .) [F' <i>proAB lac^g Z Δ M15</i>]	Pharmacia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATHV	rif ^{rx}	Hood et al. 1986

2.1.8 Enzyme und Reaktionspuffer

Tabelle 16: Restriktionsendonucleasen

Enzym	Konzentration	Reaktionspuffer	Hersteller
AatII	10 U/μl	Puffer Tango	Thermo Scientific Fischer
Apal	10 U/μl	Puffer B	Thermo Scientific Fischer
ApaLI	10 U/μl	Puffer R	Thermo Scientific Fischer
BstBI	20000 U/ml	NEB Puffer 4	New England Biolabs
EcoRV	10 U/μl	Puffer R	Thermo Scientific Fischer
NotI	10 U/μl	Puffer O	Thermo Scientific Fischer
Pacl	10000 U/ml	NEB Puffer 1	New England Biolabs
PmeI	10000 U/ml	NEB Puffer 4	New England Biolabs
PstI	10 U/μl	Puffer O	Thermo Scientific Fischer
SbfI	10000 U/ml	NEB Puffer 4	New England Biolabs
SmaI	10 U/μl	Puffer Tango	Thermo Scientific Fischer
StuI	10 U/μl	Puffer B	Thermo Scientific Fischer
RsrII	5000 U/ml	NEB Puffer 4	New England Biolabs

Zusammensetzung der Puffer

Puffer B

10 mM Tris- HCl (pH 7,5 bei 37°C)
10 mM MgCl₂
0,1 mg/ml BSA

Puffer Tango®

33 mM Tris acetate (pH 7,9 bei 37°C)
10 mM Mg- acetate
66 mM K- acetate
0,1 mg/ml BSA

Puffer O

50 mM Tris- HCl (pH 7,5 bei 37°C)
10 mM MgCl₂
100 mM NaCl
0,1 mg/ml BSA

Puffer R

10 mM Tris- HCl (pH 7,5 bei 37°C)
10 mM MgCl₂
100 mM KCl
0,1 mg/ml BSA

NEB Puffer 1

10 mM Bis- Tris- Propane- HCl (pH 7,0)
10 mM MgCl₂
1 mM DTT

NEB Puffer 4

20 mM Tris Acetate (pH 7,9)
50 mM Potassium Acetate
10 mM Magnesium Acetate
1 mM DTT

Tabelle 17: DNA/RNA- modifizierende Enzyme

Enzym	Konzentration	Reaktionspuffer	Hersteller
RQ1 DNase	1 u/µl	10x RQ1 Puffer	Promega
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	1 u/µl	10x SAP Reaktionspuffer	Thermo Scientific Fischer
T4 DNA Ligase	30 u/µl	10x Ligationspuffer	Thermo Scientific Fischer
Ribolock™ RNase Inhibitor	40 u/µl		Thermo Scientific Fischer
Terminale Transferase	20 u/µl	5x TdT Reaktionspuffer	Thermo Scientific Fischer
Poly(A) Polymerase	2,3 u/µl	5x Poly(A) Polymerase Reaktionspuffer	Gibco BRL
Klenow Fragment exo- RNaseA*	5 u/µl 100 ng/µl	10x Reaktionspuffer	Thermo Scientific Fischer usb Corporation
DNaseI*	10 µg/µl		Applichem

* Es wurden keine speziellen Puffer verwendet

Zusammensetzung der Puffer

10x RQ1 DNase Puffer

400 mM Tris- HCl pH 8,0
100 mM MgSO₄
10 mM CaCl₂

RQ1 DNase Stop Puffer

20 mM EGTA pH 8,0

10x SAP Reaktionspuffer

0,1 M Tris- HCl pH 7,5
0,1 M MgCl₂
1 mg/ml BSA

10x Klenow Reaktionspuffer

500 mM Tris- HCl pH 8,0
50 mM MgCl₂
10 mM DTT

10x T4 Ligase Puffer

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

5x TdT Reaktionspuffer

1 M Potassium cacodylate
125 mM Tris- HCl
0,05 % (v/v) Triton X- 100
5 mM CoCl₂

5x Poly(A) Polymerase Reaktionspuffer

100 mM Tris- HCl, pH 7,0
 250 mM KCl
 3,5 mM MnCl₂
 1 mM EDTA
 500 µg/ml acetylated BSA
 50 % Glycerol

Tabelle 18: Polymerasen

Enzym	Konzentration	Reaktionspuffer	Hersteller
Ampliqon Taq DNA Polymerase	5 u/µl	10x PCR Puffer	Biomol GmbH
Precisor High-Fidelity DNA Polymerase	2 u/µl	5x HIFI Puffer*	BioCat
RevertAid TM Reverse Transkriptase	200 u/µl	5x Reaktionspuffer	Thermo Scientific Fischer
RevertAid TM Premium Reverse Transkriptase	200 u/µl	5x RT Puffer	Thermo Scientific Fischer
AMV Reverse Transkriptase	10 u/µl	5x AMV Puffer	Promega
T7 RNA Polymerase	20 u/µl	5x Transkriptionspuffer	Thermo Scientific Fischer

*Keine Angabe vom Hersteller über die Zusammensetzung des Puffers

Zusammensetzung der Puffer

10x PCR Puffer

200 mM Tris- HCl, pH 8,7
 200 mM KCl
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 25 mM MgCl₂

5x RT Puffer

250 mM Tris- HCl, pH 8,3
 375 mM KCl
 15 mM MgCl₂
 50 mM DTT

5x AMV Puffer

250 mM Tris- HCl, pH 8,3
 250 mM KCl
 50 mM MgCl₂
 2,5 mM Spermidine
 50 mM DTT

5x Reaktionspuffer

250 mM Tris- HCl, pH 8,3
 250 mM KCl
 20 mM MgCl₂
 50 mM DTT

5x Transkriptionspuffer

200 mM Tris-HCl, pH 7,9
 30 mM MgCl₂
 50 mM DTT
 50 mM NaCl
 10 mM Spermidine

Tabelle 19: Nukleotide

Nukleotide	Konzentration	Hersteller
dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	100 mM	Thermo Scientific Fischer
NTPs (ATP, UTP, CTP, GTP)	100 mM	Thermo Scientific Fischer
Ribo m ⁷ G Cap Analog	40 mM	Promega

2.1.9 Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Serva, Merck, Applichem, Roth, Sigma-Aldrich, Riedel- de Haen und Gibco BRL bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad 'zur Analyse'. Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Milli-Q-Water- Systems, Millipore) angesetzt und bei Bedarf sterilisiert durch Autoklavieren (121°C, 20 min) oder Filtration (0,22 µm Porenweite).

2.1.10 Geräte

Tabelle 20: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Blotting- Kammer	Mini Trans- Blot [®] Cell	BIORAD
Brutschrank	3033 Innova [™] 4430 incubator shaker	GFL New Brunswick Scientific Co., Inc.
Digitalkamera	Certomat [®] IS	B. Braun Biotech international
Elektrophoresekammer	Lumix DMC- FZ 50	Panasonic
Elektroporation	Mighty Small II SE 250 Pulse Controller Gene Pulser [™]	Amersham BIORAD BIORAD
Kühlzentrifuge mit Kühlung	J2- 21	Beckmann
und Festwinkelrotoren	Avanti J- 26 XP	Beckmann Coulter
Magnetrührer mit Heizplatte	JA- 14; JA- 20	Beckmann
Mörser	IKAMAG [®] RCT	Janke & Kunkel
PCR- Cycler	Homogenizer Hand Model Robocycler 96 Robocycler 96 Gradient Robocycler 40 Gradient Mastercycler personal	Bioreba Stratagene Stratagene Stratagene Eppendorf
pH- Meter	pH- Meter 765 Calimatic	Knick
Photometer	Specord 200	Analytik Jena
Pipetten	2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl 3 µl, 50 µl 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson Biohit Abimed HT
Sterilbank	SterilGard Hood Class II Type A/B 3	The Baker Company, Inc.
Schüttler	GFL 3015	GFL
Spannungsquelle	Power Supply PS 9009 Power Pac 300	Gibco BRL BIORAD
Thermoblock	Thermomixer comfort ThermoStat plus	Eppendorf Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge fresco Centrifuge 5804	Heraeus Eppendorf
UV- Tisch und Geldokumentation	Reprostar 3 E.A.S.Y 429K	CAMAG Herolab
Vakuumkonzentrator	Vacuum Controller B721 Speedvac Concentrator	Büchi Savant
Vortexer	Vortex Genie 2 [™]	Bender & Hobein AG
Waage	SI- 603	Denver Instrument
Wasserbad	P14	Haake

2.1.11 Sonstige Materialien

Tabelle 21: Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Carborund	Schleifmittelwerke, Düsseldorf
Extractions Bags "Universal"	Bioreba
Rotilabo® Spritzenfilter steril 0,22 µm	Roth
Membran Type VSWP 0,025 µm	Millipore
CF 11 Cellulose	Whatman
Nitrocellulose- Membran Hybond	Amersham
Silica Partikel	Sigma (S5631)

2.1.12 Software

Tabelle 22: Software

Software	Version	Referenz/Herkunft/Vertreiber
ClustalX	1.81, 2002	Chenna et al. 2003
Gel-Dokumentation	Easy Win 32	Herolab
BioEdit	7.0.5, 2005	Hall (2005)
Lasergene	7.1.0, 2006	DNASStar Inc. Madison, USA
Mega	4, 2007	Tamura et al. 2007

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht des Pflanzenmaterials

Die krautigen Versuchspflanzen wurden aus Samen angezogen und nach einer Woche in Anzuchttöpfe pikiert. Die Infektionsversuche wurden drei bis vier Wochen nach Aussaat durchgeführt. Für die 'Golden Delicious' Apfelsämlinge wurden die Samen eine Woche in Eiswasser und danach im feuchten Sand bei 4°C bis zur Keimung gelagert. Alle Gewächshauspflanzen wurden bei 20 – 27°C, 40 – 60 % Luftfeuchte und 14 Stunden Licht kultiviert.

2.2.2 Nukleinsäureextraktion aus Pflanzenmaterial

Es wurden drei verschiedene Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial angewendet.

2.2.2.1 Silica capture

Als Standardextraktionsmethode wurde die Silica capture Extraktion von Rott und Jelkmann (Rott and Jelkmann 2001) durchgeführt. Dafür wurden 0,3 g Pflanzenmaterial und 3 ml Extraktionspuffer in eine Bioreba Extraktionstüte gegeben und homogenisiert. Es wurden 0,5 ml des entstandenen Pflanzensaftes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl 10 % (w/v) N-lauryl-sarkosyl (NLS) und 5 µl β- Mercapto-

ethanol überführt und 10 min unter gelegentlichem Schütteln bei 70°C inkubiert. Danach wurde die Probe 5 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 300 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 300 µl 6 M Natriumjodid Lösung, 150 µl 99 % Ethanol und 25 µl Silica-Suspension gegeben und 10 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Probe für 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde unter Zugabe von 500 µl Waschpuffer resuspendiert und abermals für 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgegossen und das Pellet in 500 µl Waschpuffer resuspendiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation von 1 min bei 6000 rpm wurde das Pellet nach dem Abgießen des Überstandes für einige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 150 µl sterilem destilliertem Wasser resuspendiert und 5 min bei 70°C inkubiert. Die Probe wurde für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und 130 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Für die Reverse Transkriptase PCR wurden 2 µl des Nukleinsäureextraktes eingesetzt.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer

4 M Guanidin Thiocyanat
0,2 M Natriumacetat (pH 5,2)
25 mM EDTA
1 M Kaliumacetat
2,5 % (w/v) PVP 40

Waschpuffer

10 mM Tris HCl (pH 7,5)
0,5 mM EDTA
50 mM NaCl
50 % (v/v) Ethanol_{unvergällt}

Natriumjodid- Lösung

0,75 g NaSO₃ in 40 ml bidest. Wasser lösen, danach Zugabe von 36 g NaI. Die fertige Lösung wird bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Silica- Suspension

60 g Silica Partikel (S5631) + 500 ml bidest. Wasser mischen, 24 h stehen lassen, 470 ml abgießen, erneut 500 ml bidest. Wasser zugeben und mischen, 5 h stehen lassen, 440 ml abnehmen, Rest mit HCl auf pH 2,0 einstellen, 20 min 121°C autoklavieren, à 1,5 ml aliquotiert und bei 4°C im Kühlschrank lagern.

2.2.2.2 RNeasy Extraktion

Die RNeasy Extraktion wurde für die full-length PCR und die Sequenzbestimmung verwendet. Sie wurde gemäß dem Protokoll von QIAGEN durchgeführt. Abweichend zum Herstellerprotokoll wurde vier Mal mit 30 µl 70°C warmen Wasser eluiert. Die vier entstandenen Eluate wurden bei -20°C gelagert. Für die Reverse Transkriptase PCR wurden 2 µl der Eluate eingesetzt.

2.2.2.3 DsRNA Extraktion

Das dsRNA Protokoll wurde in Anlehnung an Morris und Dodds (Morris and Dodds 1979) durchgeführt. 10 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu Pulver gemörsert und dieses Pulver in ein 250 ml Zentrifugationsgefäß mit 20 ml dsExtraktionspuffer, 15 ml wassergesättigtem Phenol und 15 ml Chloroform überführt. Die Probe wurde unter Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 20 min bei 9000 rpm (Beckmann JA- 14 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, in einen 100 ml Messzylinder überführt und auf 84 ml mit 1x STE aufgefüllt. Danach wurde der Probe unter Rühren tropfenweise 16 ml Ethanol_{absolut} zugegeben. 2,5 g CF- 11 Cellulose wurden in ein Zentrifugationsgefäß eingewogen und die Probe in dieses überführt. Danach wurde das Gemisch für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Im nächsten Schritt wurde die Probe für 5 min bei 9000 rpm (Beckmann JA- 14 Rotor) und 4°C zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und die Cellulose mit 100 ml STE 16,5 resuspendiert. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt, allerdings wurde das Pellet nach der letzten Zentrifugation nur noch in 50 ml STE 16,5 resuspendiert. Die Probe wurde in eine Säule gegossen und die Cellulose nach dem Durchlaufen der Flüssigkeit mit Druckluft kurz getrocknet. Es wurde mit 3x 5 ml 1x STE eluiert und zwischendurch die Säule mit Druckluft kurz getrocknet. Dem Eluat wurden 500 µl 1 M MgCl₂ und 100 µl DNaseI [10 µg/µl] zugegeben und dann 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Danach wurde der Probe tropfenweise 4 ml Ethanol_{absolut} zugegeben und diese nach Zugabe von 0,5 g CF- 11 Cellulose 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Cellulose-Gemisch wurde in eine Säule gegossen und mit 20 ml STE 16,5 gewaschen. Die Säule wurde vor der Elution mit 3x 1,5 ml 1x STE kurz mit Druckluft getrocknet. Dem Eluat wurden 450 µl 3 M Natriumacetat zugegeben und es wurden danach je 500 µl aliquotiert. Zu jedem Aliquot wurden 1,25 ml Ethanol_{absolut} gegeben und zur Fällung bei -20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 – 6 Aliquots je Pflanzen-

probe bei 13000 rpm und 4°C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 10 min wurde der Überstand erneut abgegossen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl sterilem deionisiertem Wasser resuspendiert.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

dsRNA Extraktionspuffer

2x STE
1 % Bentonit [50 mg/ml]
1 % SDS
1 % (w/v) PVP- 40
0,1 % β- Mercaptoethanol

1x STE

50 mM Tris, pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM EDTA, pH 7,0

STE 16,5

1x STE
16,5 % (v/v) Ethanol_{99% vergällt}

2.2.3 DNase Verdau von Silicaproben

Nach der Silica Capture (2.2.2.1) wurden Proben, die mit Plasmidlösungen oder Bakteriensuspension mittels mechanischer Inokulation (2.2.19.1) infiziert wurden nach folgendem Protokoll vor der weiteren Verwendung verdaut, um Kontamination mit DNA ausschließen zu können:

10 µl Silicaprobe
2 µl 10x RQ1 Puffer
2 µl RQ1 DNase (1 u/µl)
6 µl DEPC Wasser

25°C 15 min

+ 2 µl RQ1 DNase Stop Puffer

65°C 10 min

2.2.4 Reverse Transkription (RT- PCR)

2.2.4.1 Reverse Transkription mit Random Primer

Für den Virusnachweis wurde in der Erststrangsynthese der Random Primer (Tab. 5), der aus einem Hexanukleotidgemisch besteht, eingesetzt. Sie wurde wie im folgenden Protokoll beschrieben durchgeführt:

2 µl Silica capture Eluat
2 µl Random Primer 100 ng/µl
9,5 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

10 min bei 70°C denaturieren

2 min auf Eis abkühlen lassen

4 µl 5x Reaction Buffer
2 µl 10mM dNTP Mix
0,5 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase (200 u/µl)

Gesamtvolumen 20 µl

25°C 10 min
42°C 60 min
70°C 10 min

2.2.4.2 Reverse Transkription mit spezifischem Primer

Die Erststrangsynthese zur Vermehrung spezifischer Bereiche des Virusgenoms wurde mit spezifischen Primern (Tab. 7 - 10) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

2 µl Silica capture Eluat/ RNeasy Eluat
1 µl spezifischer Primer
10,5 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

10 min bei 70°C denaturieren
2 min auf Eis abkühlen lassen

4 µl 5x Reaction Buffer
2 µl 10 mM dNTP Mix
0,5 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase (200 u/µl)

Gesamtvolumen 20 µl

42°C 60 min
70°C 10 min

2.2.4.3 Reverse Transkription mit RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase

Die Premium Reverse Transkriptase wurde für die Erststrangsynthese von Voll-längen cDNA des Virusgenoms eingesetzt. Die Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

2 µl RNeasy Eluat
1 µl OligodT₁₈
1 µl 10mM dNTP Mix
10,5 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

65°C 5 min, danach auf Eis abkühlen lassen

4 µl 5x RT Puffer
0,5 µl Ribolock™ RNase Inhibitor (40 u/µl)
0,5 µl RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase (200 u/µl)
0,5 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

Gesamtvolumen 20 µl

50°C 60 min; danach die Reaktion für 5 min bei 85°C stoppen

2.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.2.5.1 Standard PCR Ansatz

Für die Standard PCR Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet

2 µl Erststrang cDNA
2,5 µl 10x PCR Puffer
2 µl 2 mM dNTP Mix
1,25 µl 'forward' Primer (10 µM)
1,25 µl 'reverse' Primer (10 µM)
0,1 µl Ampliqon Taq- Polymerase (5 u/µl)
ad 25 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

2.2.5.1.1 PCR Programme

In nachstehender Tabelle sind die verschiedenen PCR Programme aufgeführt. Alle Programme starten mit einem Denaturierungsschritt von 2 min bei 95°C.

Tabelle 23: PCR Programme

Programm	Denaturation	Annealing	Elongation	Zyklen	Final Elongation
Apfelviren	95°C, 45 s	60°C, 45 s	72°C, 45 s	35	5 min
ASPV PB66	95°C, 45 s	60°C, 45 s	72°C, 1:30 min	35	5 min
ASPV Hann.	95°C, 45 s	50- 60°C, 45 s	72°C, 45s- 3 min	35	5 min
Colony	95°C, 45 s	52- 55°C, 45 s	72°C, 45s- 2 min	35	5 min
Seq 1	95°C, 45 s	52- 60°C, 45 s	72°C, 45s- 3 min	35	5 min
RACE	95°C, 1 min	48°C, 1 min	72°C, 1:30 min	40	10 min
Random PCR	95°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 3 min	40	10 min

2.2.5.2 PCR mit der Precisor High- Fidelity DNA Polymerase

Bei der Precisor High- Fidelity DNA Polymerase handelt es sich um eine Korrektur lesende Polymerase, die zudem die Amplifikation von langen Sequenzbereichen bis zu 30 kb ermöglicht. Die Precisor High- Fidelity DNA Polymerase wurde zur Amplifikation von Sequenzbereichen für die Sequenzierung und zur Generierung von Vollängen Produkten verwendet. Für die Precisor PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

2 µl Erststrang cDNA
5 µl 5x HIFI Puffer
2,5 µl 2 mM dNTP Mix
1,25 µl 'forward' Primer (10 µM)
1,25 µl 'reverse' Primer (10 µM)
0,25 µl Recisor High- Fidelity DNA Polymerase (2 u/µl)
ad 25 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

2.2.5.2.1 Precisor PCR Programme

In nachstehender Tabelle sind die verschiedenen Precisor PCR Programme aufgeführt. Alle Programme starten mit einem Denaturationsschritt von 30 s bei 98°C und wurden im Mastercycler personal von Eppendorf ausgeführt.

Tabelle 24: Precisor PCR Programme

Programm	Denaturation	Annealing	Elongation	Zyklen	Final Elongation
Seq 2	98°C, 30 s	55- 65°C, 30 s	72°C, 45s- 3 min	40	72°C, 5 min
Full-length	98°C, 30 s	65°C, 30 s	72°C, 5 min	40	72°C, 5 min
Fusion	98°C, 30 s	65°C, 30 s	72°C, 5 min	25	72°C, 5 min

2.2.6 Reinigung von PCR- und RT- PCR Produkten

Die Reinigung von PCR- und RT- PCR Produkten wurde mit Hilfe des QIAquick® PCR Purifikation Kit (QIAGEN) und gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.7 Restriktionsverdau

In dieser Arbeit wurden analytische und präparative Verdau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen (Tab. 16) durchgeführt.

Der analytische Verdau dient der Überprüfung der rekombinanten Plasmide hinsichtlich der erfolgreichen Insertion und der Orientierung des inserierten Fragmentes. Er wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1 µl 10x Puffer
0,2 µl Restriktionsendonuklease
3- 6 µl Plasmid- DNA
ad 10 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

Der Ansatz wurde bei der für das verwendete Enzym spezifischen Temperatur für 2 - 3 h inkubiert.

Der präparative Verdau dient der gezielten Herstellung eines Fragmentes mit kohäsiven oder glatten Enden und eines linearisierten Vektors. Das Fragment wurde für weitere Klonierungsschritte verwendet. Der präparative Verdau wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

2,5 µl 10x Puffer
0,4 µl Restriktionsendonuklease
8- 20 µl Plasmid-DNA
ad 25 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

Der Ansatz wurde bei der für das verwendete Enzym spezifischen Temperatur für 1,5 bis 2 h inkubiert.

Die Verdauungen wurden zur weiteren Analyse und zur Gelextraktion auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.8 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA und RNA wurden native 1 %ige Agarosegele verwendet. Für ein großes Gel (10 x 15 cm) wurden 100 - 120 ml und für ein kleines Gel (10 x 9 cm) wurden 60 - 70 ml 1 %ige Agarosegellösung in den Gelträger gegossen und der Probenkamm eingehängt. Nach dem Festwerden des Gels wurden die Proben, gemischt mit Ladepuffer im Verhältnis 10:1, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 30 - 50 min. Bei der Auftrennung von großen DNA Fragmenten wurde 2 %ige Agarosegellösung verwendet und die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 60 bis 80 min. Das Gel wurde unter UV- Durchlicht bei 366 nm analysiert und mit der Geldokumentation (Tab. 21) ein digitales Bild erstellt.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

1 %ige Agarose

10 g Agarose
ad 1 l 1x TAE
20 µl Ethidiumbromid [10 ng/ml]

1x TAE

40 mM Tris- acetate
1 mM EDTA

Ladepuffer

6 g Ficoll
100 mg Orange G Pulver
ad 40 ml sterilem deionisierten Wasser

2.2.9 Gelextraktion

Die Bande in der gewünschten Größe wurde mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit gemäß dem Protokoll extrahiert. Die Probe wurde mit 30 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser eluiert, welches bei Vollängenfragmenten auf 70°C erwärmt wurde.

2.2.10 Ligation

Die Ligation von A- Überhang PCR- Produkten, die mit der Amplicon Taq DNA Polymerase generiert wurden und Fragmenten aus Restriktionsverdauen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1 µl 10x T4 Ligase Puffer
0,2 µl T4 DNA Ligase (30 u/µl)
0,5 µl Vektor
8,3 µl Insert

Für die Ligation von glatten Enden, die durch die Precisor High- Fidelity DNA Polymerase oder Restriktionsverdauung generiert wurden, in die pJET- Vektoren oder p1657 wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl 2x pJet Reaktionspuffer
0,2 µl T4 DNA Ligase (30 u/µl)
0,5 µl Vektor
4,3 µl Insert

Der Ligationsansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend für 1 h auf einer VSWP Membran (Millipore, 0,025 µm) auf sterilem deionisiertem Wasser entsalzt.

2.2.11 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

Elektrokompente Zellen wurden in Anlehnung an Sambrook and Russell (Sambrook and Russell 2006) hergestellt. Es wurden *Escherichia coli* NM 522 und *Agrobacterium tumefaciens* ATHV verwendet. Bei *E. coli* NM 522 wurde LB- Medium verwendet und die Inkubation erfolgte bei 37°C. Für *A. tumefaciens* ATHV wurde YEB + MgSO₄ + Rif verwendet und die Kulturen wurden bei 28°C inkubiert. Die Bakterien wurden aus einer Dauerkultur auf eine Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei optimaler Temperatur inkubiert. Eine 20 ml Flüssigkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei optimaler Temperatur und 220 rpm über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde mit der Vorkultur 1500 ml Flüssigmedium angeimpft und bei optimaler Temperatur und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte_{600nm} von 0,5 - 0,7 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde die Bakterienkultur für 15 – 20 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Bakterienkultur in 6 gekühlten 250 ml Zentrifugationsgefäßen für 15 min bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zuerst mit 50 ml eiskaltem sterilem Wasser auf Eis resuspendiert und dann auf 250 ml aufgefüllt. Die Bakterienlösung wurde erneut bei 2500 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem Resuspendieren der Pellets in 50 ml eiskaltem sterilem Wasser wurde wieder auf 250 ml aufgefüllt und 10 min bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde ein weiteres Mal resuspendiert und dann wurde die Suspension aus zwei Zentrifugationsgefäßen in

einem vereinigt und auf 250 ml aufgefüllt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 2500 x g und 4°C wurden die Pellets in 50 ml eiskalten 10 % Glycerin resuspendiert und danach auf 250 ml aufgefüllt. Der Überstand wurde nach einer weiteren Zentrifugation bei 2500 x g und 4°C verworfen. Die Pellets wurden mit eiskalten 10 % Glycerin in einem Gesamtvolumen von 2 - 3 ml resuspendiert und auf 50 µl Aliquots verteilt. Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Alle Schritte nach der ersten Abkühlung der Bakterienkultur wurden auf Eis und unter der Sterilbank durchgeführt.

Zusammensetzung der Medien und Lösungen

LB- Medium (pH 7,0)

10 g Bacto Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 l deionisierten Wasser

YEB- Medium (pH 7,4)

5 g Nutrient Broth
5 g Bacto Trypton
1 g Hefeextrakt
5 g Sucrose
ad 1 l deionisierten Wasser

LB- Agar (pH 7,0)

1 l LB- Medium
15 g Agar

YEB- Agar (pH 7,4)

1 l YEB- Medium
15 g Agar

10 % Glycerin

100 ml Glycerin
ad 1 l deionisierten Wasser

YEB + MgSO₄ + Rif (pH 7,4)

1 l YEB- Medium
1:500 1 M MgSO₄
1:4000 Rifampicin (100 mg/ml)

2.2.12 Elektroporation

Die Elektroporation von kompetenten Zellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Ein 50 µl Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 10 µl entsalzter Ligationsansatz oder 12,5 µl Circular Polymerase Extension Cloning-Ansatz dazugegeben. Die Mischung wurde in eisgekühlte Elektroküvetten (0,2 cm) gegeben und durch leichtes Klopfen die Luftblasen entfernt. Nach der Elektroporation (R = 200 Ω; 25 µF, 2,5 kV) wurde sofort 1 ml SOC- Medium dazugegeben. *E. coli* NM 522 Zellen wurden bei 37°C und 220 rpm für 45 min inkubiert und danach auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. *A. tumefaciens* ATHV wurde nach der Transformation für 2 h bei 28°C inkubiert und danach auf YEB + MgSO₄ + Rif + Kan-Platten ausplattiert und für 48 h bei 28°C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 25: Verwendete Selektivmedien

Bakterium	Plasmid	Selektivmedium
<i>E. coli</i>	pGEMTeasy [®] , pGEMT [®]	LB- AMP- XGal- IPTG
<i>E. coli</i>	p1657, pJET1/blunt, pJET1.2/blunt	LB- AMP
<i>E. coli</i>	pCBSp35HDVpA , pCB301N	LB- Kan
<i>A. tumefaciens</i> ATHV	pCBSp35HDVpA , pCB301N	YEB + MgSO ₄ + Rif + Kan

LB- AMP- XGal- IPTG

1 l LB- Medium (pH 7,0)
1:1000 Ampicillin (100 mg/ml)
1:500 X- Gal (20 mg/ml)
1:1000 IPTG (1 M)

YEB + MgSO₄ + Rif + Kan

1l YEB- Medium (pH 7,4)
1:500 1 M MgSO₄
1:4000 Rifampicin (100 mg/ml)
1:2000 Kanamycin (100 mg/ml)

LB- Kan

1 l LB- Medium (pH 7,0)
1:2000 Kanamycin (100 mg/ml)

LB- AMP

1 l LB- Medium (pH 7,0)
1:1000 Ampicillin (100 mg/ml)

SOC (pH 7,0)

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
10 ml 250 mM KCl
5 ml 2 M MgCl₂
20 ml 1 M Glucose
ad 1 l deionisierten Wasser

2.2.13 Colony PCR

Zur Überprüfung der Insertgröße oder der Orientierung der klonierten Sequenzfragmente wurde eine Colony PCR durchgeführt. Dazu wurde die Bakterienkolonie mit einer sterilen 10 µl Pipettenspitze teilweise gepickt und in folgenden Ansatz gegeben:

1 µl 10x PCR Puffer
0,8 µl 2 mM dNTP Mix
0,5 µl 'forward' Primer (10 µM)
0,5 µl 'reverse' Primer (10 µM)
0,05 µl Ampliqon Taq- Polymerase (5 u/µl)
ad 10 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

Es wurde das PCR Program Colony (Tab. 23) verwendet.

2.2.14 Plasmid- DNA Präparation aus E. coli NM 522

Zur Isolierung von Plasmid- DNA wurden 5 – 10 ml Übernachtskultur der Klone hergestellt. Dazu wurde der Klon mit einer sterilen 10 µl Spitze, die mit einer sterilisierten Pinzette festgehalten wurde, gepickt und diese in Flüssigmedium geworfen. Die Kultur wurde bei 37°C und 220 rpm über Nacht inkubiert. Die Plasmid-DNA Präparation wurde mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) und gemäß dem Protokoll durchgeführt. Für die Vollängen- cDNA Klone wurden 6 – 8 ml

eingesetzt und die Plasmid DNA mit 50 µl 70°C warmen HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser eluiert.

2.2.14.1 Herstellung von Bakterien für die Langzeitlagerung

Für die Herstellung von Bakterien für die Langzeitlagerung wurden 1 ml Übernachtskultur 2 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet bei *E. coli* NM 522 mit 500 µl LB- 50 % Glycerin resuspendiert. Bei *A. tumefaciens* ATHV wurden 250 µl Übernachtskultur mit 250 µl GSM gemischt. Die Dauerkulturen wurden bei -20°C gelagert.

Zusammensetzung der Medien

LB- 50 % Glycerin

10 g Bacto Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
50 % Glycerin
ad 1 l deionisierten Wasser

GSM

25 mM Tris- HCl pH 7,4
100 mM MgSO₄
50 % Glycerin
ad 1 l deionisierten Wasser

2.2.15 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die Plasmidlösung und der spezifische Primer nach folgendem Ansatz zusammen pipettiert:

6 – 9 µl Plasmidlösung
1 µl Primerlösung (10 µM)
ad 10 µl mit HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

Die Proben wurden als Auftragssequenzierung zu SeqLab (Göttingen) geschickt. Die Computerauswertungen wurden mit Lasergene, Bioedit, ClustalX und Mega 4 (Tab. 22) durchgeführt. Für Datenbankrecherchen wurde die Datenbank BLAST von NCBI verwendet.

2.2.16 Spezielle PCR- Methoden

2.2.16.1 Rapid Amplifikation of cDNA ends (RACE) Methode

Die RACE Methode wurde zur Bestimmung von 5'- und 3'- Enden vom *Apple stem pitting virus* (ASPV) und *Apple stem grooving virus* (ASGV) Genom verwendet und in Anlehnung an Sambrook und Russell (2006) durchgeführt. Dazu wurde zuerst eine RNeasy Extraktion (2.2.2.2) von mit Virus infiziertem *Nicotiana occidentalis* 37B Blättern durchgeführt. Für die Bestimmung vom 5'- und 3'- Enden wurde danach eine RT- PCR mit spezifischen Primern (2.2.3.2) durchgeführt. Für das 5'- Ende wurde bei ASPV PB66 der Primer ASPV-R-1644 (Tab. 8), bei ASPV Hannover der Primer

ASPVHa-R-713 (Tab. 9) und für ASGV der Primer ASGV-R-2856 (Tab. 10) verwendet. In der RT-PCR wurde bei beiden Viren für das 3'-Ende OligodT (Tab. 5) als Primer eingesetzt. Die entstandene cDNA wurde danach direkt in der PCR zur Bestimmung des 3'-Endes eingesetzt (2.2.16.1.3).

2.2.16.1.1 Poly(A)- oder Poly(G)- tailing der cDNA zur Bestimmung des 5'-Endes

Für das Anhängen eines Poly(A)- oder Poly(G)- Schwanzes an die cDNA wurde diese zuerst mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 30 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser eluiert, danach wurde das Tailing nach folgendem Protokoll durchgeführt:

10 µl aufgereinigte cDNA
0,5 µl dATP oder dGTP (100 mM)
4 µl 5x TdT Reaktionspuffer
1 µl Terminale Transferase (20 u/µl)
ad 20 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

37°C 1 h
70°C 15 min

Die getailte cDNA wurde in der PCR zur Bestimmung des 5'-Endes (2.2.16.1.3) eingesetzt.

2.2.16.1.2 PCR Ansatz zur Bestimmung der 5'- und 3'- Enden der Virussequenz

Für die PCR Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl Erststrang cDNA
5 µl 10x PCR Puffer
3 µl 2 mM dNTP Mix
2,5 µl 'forward' Primer (10 µM)
2,5 µl 'reverse' Primer (10 µM)
0,5 µl Ampliqon Taq- Polymerase (5 u/µl)
ad 50 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

Es wurde das PCR Programm RACE (Tab. 23) verwendet. Für die Bestimmung des 3'-Endes des ASPV PB66 Genoms wurden die Primer ASPV-F-8592P und PolyT und für die Bestimmung des 5'-Endes die Primerpaare PolyT/ ASPV-R-224 und PolyT/ ASPV-R-410 (Tab. 5; Tab. 8) verwendet. Bei ASPV Hannover wurde für das 3'-Ende ASPVHa-F-8684/ PolyT und für das 5'-Ende die Primerpaare PolyC/ ASPV-R-410 und PolyC/ ASPVHa-R-411 (Tab. 5; Tab. 9) verwendet. Zur Bestimmung des 3'-Endes des ASGV Genoms wurde das Primerpaar ASGV-F-6039/ PolyT und für

die Bestimmung des 5'- Endes die Primerpaare PolyT/ ASGV-R-197 und PolyT/ ASGV-R-266 (Tab. 5; Tab. 10) verwendet. Zur Analyse und für die Gelextraktion wurden 25 µl PCR Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die cDNA wurde mittels Gelextraktion (2.2.8) aus dem Gel extrahiert, danach in den pGEMTeasy Vektor ligiert (2.2.9) und nach erfolgreicher Transformation (2.2.11) sequenziert.

2.2.16.2 Random Primer PCR Methode

Mit Hilfe der Random Primer PCR Methode wurden Nukleinsäuren von unbekanntem Viren amplifiziert. Die Methode wurde in Anlehnung an Froussard (Froussard 1992) nach folgendem Protokoll durchgeführt. Zuerst wurde eine dsRNA Extraktion (2.2.2.3) der zu untersuchenden Probe durchgeführt. Es wurden 4 - 6 Aliquots abzentrifugiert und die Pellets in 30 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser gelöst. Danach wurde eine Reverse Transkription mit folgendem Protokoll durchgeführt:

28 µl dsRNA
2 µl dN6- RP

3 min bei 99°C in Wasser inkubieren
Abkühlen in flüssigem Stickstoff

10 µl 5x AMV Puffer
2 µl 25 mM dNTP Mix
1 µl AMV Reverse Transkriptase (10 u/µl)
ad 50 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

42°C 60 min

Als nächstes wurde eine Klenow Auffüllreaktion durchgeführt, dazu wurden die Proben 2 min bei 99°C in Wasser inkubiert und danach in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Zu der Probe wurden

10 µl 10x Klenow Reaktionspuffer
4 µl 10 mM dNTP Mix
2 µl Klenow Fragment exo- (5 u/µl)
34 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

gegeben und sie wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Der Ansatz wurde mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 30 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser eluiert. Mit dem Eluat wurde eine Random PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

2 µl aufgereinigte cDNA
2,5 µl 10x PCR Puffer
2 µl 2 mM dNTP Mix
2,5 µl dN6- UP (10 µM)
0,2 µl Ampliqon Taq- Polymerase (5u/µl)
ad 25 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

Die PCR wurde mit dem Random PCR Programm (Tab. 23) durchgeführt und der Ansatz wurde zur Analyse komplett auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die cDNA wurde mittels Gelextraktion (2.2.8) aus dem Gel extrahiert und danach in den pGEMTeasy Vektor ligiert (2.2.9) und nach erfolgreicher Transformation (2.2.11) sequenziert.

2.2.16.3 Vollängen PCR

Das Vollängen PCR Protokoll wurde zur Amplifikation von Vollängen cDNA der Virusgenome vom ASPV und ASGV benutzt. Dazu wurden zuerst mit Hilfe der RACE (2.2.14.1) das 5'- und 3'- Ende des Virusgenoms bestimmt und anhand der Sequenz wurden Primer entworfen, die das vollständige 5'- und 3'- Ende beinhalten. An den Primer für das 3'- Ende wurde ein Poly(A)- Schwanz angehängt. Zur Extraktion der Virus- RNA wurde eine RNeasy- Extraktion (2.2.2.2) durchgeführt. Das RNeasy Eluat wurde in einer Premium Reverse Transkriptase (2.2.4.3) eingesetzt und anschließend eine Precisor High- Fidelity DNA Polymerase (2.2.5.2) mit dem Programm Full- length (Tab. 24) durchgeführt. Die Vollängen- Produkte wurden zur Analyse auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.17 T7- Transkription

Bei der T7- Transkription wird mit Hilfe einer DNA- abhängigen RNA Polymerase, der T7- Polymerase, RNA *in vitro* synthetisiert. Als Matrize wurde eine cDNA verwendet, die mit der Vollängen PCR (2.2.14.3) und den Primerpaaren ASPV-F-1langT7/ ASPV-R-9332P für ASPV und ASGV-F-1T7/ ASGV-R-6475 für ASGV (Tab. 12) generiert wurden. Den verwendeten Forward Primern wurde die Sequenz des T7 Promoters vorgelagert. Danach wurde der PCR Ansatz bei ASGV aufgereinigt (2.2.9), während die cDNA Matrize für ASPV ohne Aufreinigung verwendet wurde. Die T7- Transkription wurde nach folgenden Ansätzen einmal ohne Zugabe von Capping- Reagenz und einmal mit Zugabe von Capping Reagenz durchgeführt:

Ansatz 1 ohne Capping Reagenz:

- 2- 4 µl aufgereinigte cDNA Matrize
- 10 µl 5x Transkriptionspuffer
- 10 µl 10 mM NTP Mix
- 1,25 µl Ribolock™ RNase Inhibitor (40 u/µl)
- 1,5 µl T7 RNA Polymerase (20 u/µl)

ad 50 µl mit DEPC deionisiertem Wasser

Ansatz 2 mit Capping Reagenz:

- 2- 4 µl aufgereinigte ASGV oder 15 µl ungereinigte ASPV cDNA Matrize
- 10 µl 5x Transkriptionspuffer
- 10 µl NTP Mix (5 mM ATP, TTP, CTP; 0,5 mM GTP)
- 4 µl Ribo m⁷ G Cap Analog (5 mM)
- 1,25 µl Ribolock™ RNase Inhibitor (40 u/µl)
- 1,5 µl T7 RNA Polymerase (20 u/µl)

ad 50 µl mit DEPC deionisiertem Wasser

Beide Ansätze wurden bei 37°C für 2 h inkubiert und die Reaktion durch Einfrieren bei -20°C beendet. Der T7- Ansatz wurde entweder unverdünnt oder mit Abreibepuffer verdünnt mit mechanischer Inokulation (2.2.19.1) auf Versuchspflanzen aufgebracht.

2.2.18 Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode

Die Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode wurde in Anlehnung an Quan und Tian (Quan and Tian 2009) durchgeführt. Dazu wurde eine RNeasy-Extraktion (2.2.2.2) mit anschließender Premium Reverse Transkriptase (2.2.3.3) durchgeführt. Die Precisor High- Fidelity DNA Polymerase (2.2.4.3) wurde mit den in Tabelle 13 aufgeführten Primerpaaren und dem PCR Programm full- length (Tab. 24) zur Synthetisierung der Virus cDNA und des Vektorfragmentes durchgeführt. Die PCR Ansätze wurden aufgereinigt (2.2.9) und erneut eine Precisor High- Fidelity DNA Polymerase mit folgendem Ansatz durchgeführt:

- 1 µl aufgereinigtes Vektor PCR Fragment
- 14 µl aufgereinigte Virus cDNA
- 5 µl 5x HIFI Puffer
- 2,5 µl 2 mM dNTP Mix
- 0,25 µl Recisor High- Fidelity DNA Polymerase (2 u/µl)

ad 25 µl HiPerSolv Chromanorm HPLC Wasser

Die PCR wurde mit Programm Fusion (Tab. 24) durchgeführt. Zur Elektroporation (2.2.12) wurden 12,5 µl PCR Ansatz verwendet, die vorher für 1 h auf einer VSWP Membran (Millipore, 0,025 µm) auf sterilem deionisierten Wasser entsalzt wurden.

2.2.19 Infektion von Versuchspflanzen

Zur Infektion von Versuchspflanzen mit infiziertem Pflanzenmaterial, T7-Transkriptionsansätzen, Plasmid DNA Präparationen oder Agrobakterien mit rekombinanten pBin- Vektoren wurden drei verschiedene Methoden angewandt.

2.2.19.1 Mechanische Inokulation

2.2.19.1.1 Mechanische Inokulation mit infiziertem Pflanzenmaterial

Für die mechanische Inokulation mit infiziertem Pflanzenmaterial wurden zwei bis drei Blätter der infizierten Pflanze in einem Bioreba Extraktionsbeutel mit 3 ml Abreibepuffer gemörsert. Zwei Blätter der Versuchspflanze wurden mit Carborund bestäubt und der Pflanzensaft mit diesem leicht verrieben, dadurch entstehen kleine Verletzungen an der Blattoberfläche über die die Viren die Versuchspflanze infizieren können. Die behandelten Blätter wurden bei einer Übertragung von holzigen auf krautige Versuchspflanzen nicht abgespült und bei einer Übertragung von krautig auf krautig nach 15 min mit Wasser abgespült. Die Pflanzen wurden nach 2 - 4 Wochen auf Symptome bonitiert oder mit der Silica Capture Methode (2.2.2.1) extrahiert und mittels PCR (2.2.4.1) getestet. Diese Methode wurde zum Erhalt von Virusisolaten auf Tabak oder zur Übertragung von Virusisolaten aus holzigen Wirtspflanzen auf krautige Wirtspflanzen verwendet.

Zusammensetzung Abreibepuffer

holzige → krautig

14,43 ml 0,2M Na₂HPO₄
10,57 ml 0,2M NaH₂PO₄
ad 100 ml deionisierten H₂O pH 7,0
0,01 M DIECA
0,02 M Na- Thioglycolat
1 % Nikotin

krautig → krautig

61 ml 1/15 M Na₂HPO₄
39 ml 1/15 M KH₂PO₄
pH 7,0
0,225 g DIECA
0,23 g Na- Thioglycolat

2.2.19.1.2 Mechanische Inokulation mit T7- Transkriptionsansätzen oder Plasmid DNA Präparation

Für die mechanische Inokulation mit T7- Transkriptionsansätzen oder Plasmid DNA Präparation wurde wie in 2.2.19.1.1 beschrieben eine Abreibung durchgeführt. Die Ansätze wurden unverdünnt oder 1:2 mit Abreibepuffer (krautig → krautig) verdünnt abgerieben und danach nicht von den Blättern abgespült. Die Auswertung erfolgte nach 2 - 4 Wochen durch Silica Capture (2.2.2.1) von jungen nachgewachsenen Blättern.

2.2.19.2 Agroinokulation

Mit Hilfe der Agroinokulation wurden durch *Agrobacterium tumefaciens* rekombinante pBin Vektoren in Pflanzen übertragen. Dazu wurde eine Flüssigkultur von *Agrobacterium tumefaciens* ATHV mit rekombinantem pBin- Vektor angezogen und 1 - 2 Tage bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 6000 rpm für 3 min abzentrifugiert und das entstandene Pellet in 10 mM MgSO₄ (pH 6,0) resuspendiert wobei 100 µl pro 2 ml Kultur verwendet wurden. Mit 10 - 100 µl der Bakteriensuspension wurde danach eine mechanische Inokulation (2.2.19.1.1) durchgeführt und die Blätter im Anschluss nicht abgespült. Die Auswertung der Agroinokulation erfolgte nach 2 - 4 Wochen über Bonitierung und PCR Nachweis des jeweiligen Virus (2.2.4.1).

2.2.19.3 Infiltration mit Agrobakterien

Als eine weitere Methode zur Infektion von Pflanzenmaterial wurde die Infiltration von Blättern mit Agrobakterien, die mit einem rekombinanten Plasmid transformiert wurden, benutzt. Für die Infiltration wurde eine Flüssigkultur mit dem transformierten *Agrobacterium* angeimpft und bei 28°C und 200 rpm für 1 - 2 Tage inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden mittels Colony PCR (2.2.11) mit dem Programm Colony (Tab. 23) auf den pBin- Vektor überprüft. Danach wurden 250 ml YEB (pH 7,4) + MgSO₄ + Rif mit ATHV und 250 ml YEB (pH 7,4) + MgSO₄ + Rif + Kan für ATHV mit rekombinanten pBin Vektoren angeimpft und bis zu OD_{600nm} von 0,5 - 0,6 bei 28°C und 250 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden erneut mittels Colony PCR (2.2.11) überprüft. Die Bakterienkultur wurde bei 2500 x g 20 min zentrifugiert und das Pellet in 250 ml YEB (pH 5,6) + MgSO₄ + Rif + Acetosyringon für ATHV und 250 ml YEB (pH 5,6) + MgSO₄ + Rif + Kan + Acetosyringon für ATHV mit rekombinanten pBin Vektoren resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 28°C über Nacht wurden die Kulturen mittels Colony PCR (2.2.11) erneut überprüft. Die OD_{600nm} der Kulturen wurde gemessen und nach einer Zentrifugation bei 2500 x g für 20 min auf 1 mit MS-Medium eingestellt. Die Agrobakterien wurden für 2 h inkubiert. Das Blattmaterial wurde für 15 min in ein feuchtes Tuch gewickelt und danach in Plastikschaalen gelegt und mit der Agrobakteriensuspension übergossen. Das Blattmaterial wurde mit Reagenzgefäßständern beschwert und die Plastikschaale mit einem Deckel mit Löchern verschlossen. Die Infiltration wurde für 20 min bei 30 mbar durchgeführt. Die infiltrierten Blätter wurden auf feuchten Tüchern in eine Plastikschaale gelegt und mit Frischhaltefolie verschlossen. Die Blätter wurden 3 Tage bei 25°C und 16 h Licht

inkubiert. Danach wurde eine Silica Capture (2.2.2.1) durchgeführt und die Proben wurden mit RQ1 DNase (2.2.3) verdaut. Es wurde eine Reverse Transkription mit Random Primer (2.2.3.1) von der verdauten Silicaprobe durchgeführt und diese im Anschluss mittels Standard PCR (2.2.4.1) mit dem PCR Programm Apfelviren (Tab. 23) auf eine Infektion überprüft.

Zusammensetzung der Medien

YEB + MgSO₄ + Rif + Kan + Acetosyringon	MS- Medium
1 l YEB, pH 5,6	100 ml 10x Murashige + Skoog Macronutrients
1:500 1M MgSO ₄	100 ml 10x Murashige + Skoog Micronutrients
1:4000 Rifampicin (100 mg/ml)	30 g Sucrose
1:2000 Kanamycin (100 mg/ml)	10 mM MES
1:10000 Acetosyringon (200 mM)	1:1000 Acetosyringon (200 mM)
	ad 1 l deionisierten Wasser

2.2.20 Western Blot

Bei der Western Blot Analyse werden mit Hilfe eines Antikörpers virusspezifische Proteine nachgewiesen. Der Western Blot wurde wie in den nachfolgenden Punkten durchgeführt.

2.2.20.1 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden 0,5 g Blattmaterial mit 0,5 ml Proteinextraktionspuffer im vorgekühltem Mörser zerkleinert. Die Probe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Es wurden 40 µl des Überstandes mit 10 µl Ladepuffer versetzt und 3 min bei 99°C inkubiert. Die Probe wurde kurz bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Zusammensetzung der Puffer

Proteinextraktionspuffer, pH 8,0	SDS- PAA- Probenpuffer
100 mM NaCl	62,5 mM Tris- HCl (pH 6,8)
100 mM Tris (pH 8,0)	10 % (v/v) Glycerin
5 mM EDTA pH 8,0	2 % (w/v) SDS
20 mM DTT	5 % (v/v) β- Mercaptoethanol
0,05 % Tween	0,05 % (w/v) Bromphenolblau
ad 1 l deionisiertem Wasser	ad 1 l deionisiertem Wasser

2.2.20.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die extrahierten Proteine wurden in einem 12 % SDS- Polyacrylamid (PAA)- Gel aufgetrennt. Dazu wurde ein 12 % Trenngel nach folgendem Protokoll gegossen:

2,2 ml H₂O
1,25 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) + 1 % SDS
1,5 ml Polyacrylamid (40 %)
5 µl Temed
25 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS)

Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet und dieses nach dem Polymerisation des Gel wieder abgenommen. Im Anschluss wurde ein 4 % Sammelgel gemäß dem nachfolgenden Protokoll gegossen:

3,2 ml H₂O
1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) + 1 % SDS
0,5 ml Polyacrylamid (40 %)
5 µl Temed
25 µl 10 % APS
+30 µl 0,25 % (w/v) Bromphenolblaulösung

Das Gel wurde nach Polymerisation in eine mit SDS Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und nach dem Entfernen des Kammes die Gel-taschen gespült. Nach dem Auftragen der Proben, wurde das Gel bei 120 V für 60 – 90 min aufgetrennt.

Zusammensetzung der Puffer

SDS- Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glyzin
1 % (w/v) SDS
ad 1 l deionisiertem Wasser

2.2.20.3 Transfer der aufgetrennten Proteine

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektrolot auf die Nitrocellulose transferiert, dazu wurde eine Nitrocellulosemembran beschriftet und danach für 15 s in Methanol und 2 min in H₂O gelegt. Die Membran, das Whatmanpapier und die Blottingschwämme wurden in Western Blot Puffer gelegt. Das PAA- Gel wurde vorsichtig in Western Blot Puffer überführt. Auf die Plastikhalterung für den Western Blot wurde zuerst der Blottingschwamm, dann das Whatmanpapier gelegt. Darauf wurden das Gel und die Membran platziert. Danach wurde wieder eine Schicht Whatmanpapier und Blottingschwamm gelegt. Die so präparierte Plastikhalterung wurde in die mit Western Blot Puffer gefüllte Kammer gestellt und der Elektrolot wurde bei 250 mA für 60 min durchgeführt.

Zusammensetzung des Puffers

Western Blot Puffer

25 mM Tris
192 mM Glyzin
ad 1 l deionisiertem Wasser

2.2.20.4 Entwicklung des Western Blots

Zur Entwicklung des Western Blots wurde die Nitrocellulosemembran in PBS + 2 % Milchpulver gelegt um unspezifische Bindestelle zu blocken. Danach wurde die Membran in 2,5 ml PBS + 1 % Milchpulver + Antikörper Rohserum 647 (1:250) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für 10 min in PBST gewaschen. Danach wurde sie in 5 ml PBS + 1 % Milchpulver + dem sekundärem Antikörper Anti Rabbit IgG (1:5000) 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut 3x für 10 min in PBST gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation mit AP Puffer für 2 min. Das Entwickeln mit Nitroblautetrazolium (NBT)/ 5- Bromo-4-chlor-3-Indolyl- Phosphat (BCIP) wurde im Dunkeln durchgeführt bis die Banden ausreichend zu erkennen waren.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

PBS

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
ad 1 l deionisiertem Wasser

AP Puffer

50 mM MgCl₂
100 mM NaCl
100 mM Tris (pH 9,6)

PBST

1 l PBS
0,05 % Tween

2.2.21 Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung durch Immunosorbent- Elektronenmikroskopie (ISEM) wurden 3 bis 4 Wochen nach der Inokulation (2.2.19) nachgewachsene nicht inokulierte Blätter der Versuchspflanze als Probe genommen. Diese wurden zur Bearbeitung zum Julius Kühn- Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik in Braunschweig geschickt.

3 Ergebnisse

3.1. Virusübertragung auf Tabak

Die vier verwendeten Virusisolate (vgl. Tab. 1) von ASPV wurden mittels mechanischer Inokulation (2.2.19.1.1) von Apfel oder Birne als natürlicher Wirtspflanze auf den experimentellen Wirt *Nicotiana occidentalis* 37B übertragen. Die Übertragung auf den Tabak ermöglicht eine ganzjährige Erhaltung im Gewächshaus, da sich die Viren ebenfalls von Tabak zu Tabak durch mechanische Inokulation übertragen lassen. Diese konnte am erfolgreichsten während der Monate April und September durchgeführt werden. In den Monaten Juni bis August konnte keine Übertragung vom holzigen Wirt auf Tabak erzielt werden. Die ASPV Isolate zeigten unterschiedlich stark ausgeprägte Symptome von leichter Vergilbung bis Nekrosen auf den Tabakpflanzen. Die Symptome blieben bei Folgeabreibungen auf Tabak in einem Zeitraum über 3 Jahre in ihrer Ausprägung erhalten, allerdings veränderte sich die Inkubationsdauer zwischen Infektion und erstem Auftreten der Symptome. Sie traten bei der Übertragung von Apfel auf Tabak zwischen 2 bis 4 Wochen nach der mechanischen Infektion auf. Bei mechanischen Inokulationen (2.2.19.1.1) von Tabak auf Tabak traten die Symptome bereits 10 - 14 Tage nach der Infektion auf. Die vier verwendeten ASPV Isolate zeigten stark unterschiedliche Symptomausprägung im Bezug auf deren Stärke und Art.

Das ASPV Isolat PB66 rief Chlorosen auf dem gesamten Blatt hervor (Abb. 6A). Das ASPV Isolat Bologna wurde von Birne auf Tabak übertragen und rief Adernvergilbungen auf dem gesamten Blatt hervor (Abb. 6B). Nach einer Infektion mit dem Isolat ASPV China traten starke Nekrosen auf (Abb. 6C). Die Kontrollpflanzen zeigten keine Symptome (Abb. 6D). Nach Infektion mit ASPV Hannover traten leichte Chlorosen auf den Blättern auf (Abb. 7A).

Das ASGV Isolat Gambach wurde mittels mechanischer Inokulation im April von Apfel auf *Nicotiana occidentalis* 37B übertragen. Die Symptome traten ebenfalls 2 - 4 Wochen nach der mechanischen Inokulation auf. Wieder verkürzte sich die Inkubationszeit bei Folgeabreibungen von Tabak zu Tabak auf 10 - 14 Tage. Bei den ersten Abreibungen waren zwischen dem 10. und 14. Tag leichte Chlorosen auf den Blättern sichtbar, diese bildeten sich aber nach einigen Tagen zurück. ASGV Gambach rief verschmälerte Blattspreiten und ein gestauchtes Wachstum des gesamten Tabaks hervor. Diese Symptome wurden im Laufe der Erhaltung durch 6

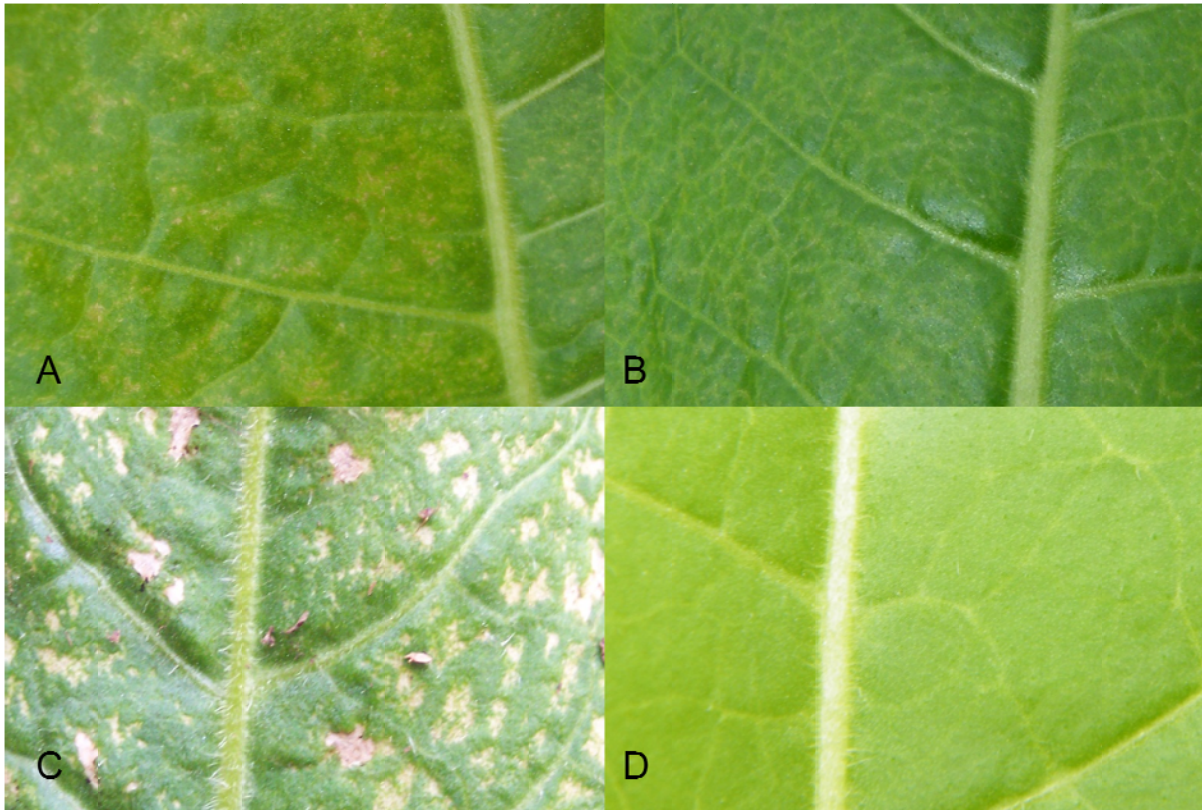


Abbildung 6: Symptome von drei verwendeten ASPV Isolaten auf *Nicotiana occidentalis* 37B Gezeigt sind die Symptome der ASPV Isolate 14 Tage nach mechanischer Inokulation von Tabakpflanzen mit in Abreibepuffer zerriebenen infizierten Tabakblättern. (A) ASPV PB66 ruft Chlorosen auf dem gesamten Blatt hervor, (B) ASPV Bologna führt zur Adernvergilbung auf den Tabakblättern, (C) ASPV China zeigt als Symptom Nekrosen auf dem gesamten Blatt (D) *Nicotiana occidentalis* 37B zeigt nach Abreibung mit Abreibepuffer keine Symptome.



Abbildung 7: Symptome von zwei latenten Apfelviren auf *Nicotiana occidentalis* 37B Gezeigt sind die Symptome von ASPV Hannover (A) und ASGV Gambach (B) 3 Wochen nach mechanischer Inokulation von Tabakpflanzen mit in Abreibepuffer zerriebenen infizierten Tabakblättern. ASPV Hannover ruft leichte Chlorosen (durch Pfeile markiert) auf den Blättern hervor. Das ASGV Isolat Gambach führt zu verschmälerten Blattspreiten und gestauchtem Wachstum gegenüber gesundem Tabak (C).

Folgeinokulationen im Zeitraum der ersten 1,5 Jahre immer stärker in ihrer Ausprägung und blieben dann über den weiteren Erhaltungszeitraum von 2 Jahren konstant in der Stärke der Ausprägung (Abb. 7B).

3.2. Virusnachweis

Für den Standardvirusnachweis in verschiedenen Pflanzen wurden die Proben mittels Silica Extraktion (2.2.2.1) extrahiert und anschließend eine RT-PCR mit Random Primer (2.2.4.1) durchgeführt. Die Primerpaare ASPV-F-8869/-R-9211, ACLSV-F-6860/-R-7507 und ASGV-F-6039/-R-6286 (Tab. 6) wurden von Menzel (Menzel *et al* 2002) übernommen und in der PCR wurde das Programm Apfelviren (Tab. 23) verwendet. Diese drei Primerpaare binden im ORF, der für das Hüllprotein des jeweiligen Virus codiert. Mit den beiden Primerpaaren ASGV-F-6039/-R-6286 und ASGV-F-5783/-R-6286 wurden in der PCR nur ASGV Isolate nachgewiesen. Mit Hilfe des Primerpaares ACLSV-F-6860/-R-7507 wurden mittels PCR die beiden verwendeten ACLSV Isolate Uhl und P203 detektiert. In der PCR konnten mit dem Primerpaar ASPV-F-8869/-R-9211 die Isolate PB66, Bologna und China nachgewiesen werden. Das Isolat ASPV Hannover wurde mit dem Primerpaar ASPV-F-8869/-R-9211 in PCR- Reaktionen weder im natürlichen Wirt Apfel noch im experimentellen Wirt *N. occidentalis* 37B detektiert.

Für das Isolat PB66 wurde in dieser Arbeit das Primerpaar ASPV-F-6710/-R-8040 entwickelt, das im Triple Gene Block und im Sequenzbereich, der für das Hüllprotein codiert, bindet. Mit Hilfe dieses Primerpaares konnten in der PCR (Programm ASPV PB66, Tab. 23) die Isolate PB66 und Hannover nachgewiesen werden, während bei den Isolaten Bologna und China kein Nachweis möglich war. Für das ASPV Isolat Hannover wurde ein spezifisches Primerpaar ASPVHa-F-26/-R-217 abgeleitet welches im ersten ORF bindet. In der PCR (Programm ASPV Hann., Tab. 23) wurde mit diesem Primerpaar nur das Isolat Hannover detektiert, bei den anderen Isolaten traten keine PCR- Banden im Gel auf. Die Primerpaare ASPV-F-5788/-R-5970 und ASPV-F-8862/-R-9023 wurden für eine Realtime PCR (qPCR) entwickelt, wobei das erste Primerpaar im ersten ORF und das zweite Primerpaar im fünften ORF bindet. Für die qPCR sollte das Primerpaar viele verschiedene ASPV Isolate detektieren können, deshalb wurden beide Primerpaare in der PCR (Programm Apfelviren, Tab. 23) auf ihre Isolatspezifität getestet. Mit dem Primerpaar ASPV-F-5788/-R-5970 wurden in der PCR die Isolate PB66, Bologna und Hannover nachgewiesen. Das

Isolat Hannover wurde nur schwach und das Isolat China wurde nicht detektiert. Mit Hilfe des Primerpaares ASPV-F-8862/-R-9023 wurden mittels PCR alle vier ASPV Isolate nachgewiesen. Das Isolat Bologna wurde nur schwach detektiert. Alle verwendeten Nachweisprimerpaare generierten in der PCR keine falsch-positiven Banden mit den anderen Viren bzw. pflanzlichen Nukleinsäuren (Tab. 26).

Tabelle 26: Verwendete Nachweisprimerpaare und deren Isolatspezifität Die verwendeten Primerpaare zum Virusnachweis sind mit den gezeigten Isolaten auf ihre Spezifität getestet worden.

Virusisolate	ASPV-F- 8869/-R- 9211 ¹	ASPV-F- 6710/-R- 8040	ASPV-F- 5788/-R- 5970	ASPV- F-8862/- R-9023	ASPVHa- F-26/-R- 217	ACLSV- F-6860/- R-7507 ¹	ASGV- F-6039/- R-6286 ¹	ASGV- F-5873/- R-6286 ¹
ASPV PB66	+	+	+	+	-	-	-	-
ASPV Bologna	+	-	+	(+)	-	-	-	-
ASPV Hannover	-	+	(+)	+	+	-	-	-
ASPV China	+	-	-	+	-	-	-	-
ACLSV Uhl	-	-	-	-	-	+	-	-
ACLSV P203	-	-	-	-	-	+	-	-
ASGV Gambach	-	-	-	-	-	-	+	+
ASGV China	-	-	-	-	-	-	+	+

¹Primerpaare entwickelt von Menzel *et al*, 2002; + positiver Nachweis; - negativer Nachweis; (+) schwach positiver Nachweis

3.3 Ermittlung der Virusnachweisbarkeit über den gesamten Jahresverlauf

In diesem Versuch wurde die Nachweisbarkeit von ASPV während einer Vegetationsperiode in verschiedenen Gewebetypen von vier langjährig mit ASPV infizierten Apfelbäumen untersucht. Dazu wurden von Januar 2008 bis Februar 2009 monatlich und in der Hauptwachstumsphase März April zweiwöchentlich von Blatt oder Knospe, Phloem und Wurzelphloem der vier verschiedenen Apfelsorten Proben genommen und mittels Silica Extraktion (2.2.2.1) und Virusnachweis PCR mit dem Primerpaar ASPV-F-8869/-R-9211 (Programm Apfelviren, Tab. 23) auf ASPV getestet (Beispiel in Abb. 8). Es ergaben sich bei Blatt/ Knospe und Phloem 16 Probenahmen, während beim Wurzelphloem aufgrund von gefrorenem Boden 13 Proben genommen wurden. ASPV konnte über den gesamten Zeitraum im Baum nachgewiesen werden, allerdings mit schwankender Intensität der Produktstärke der PCR (Tab. 27) je nach Gewebetyp und Jahreszeit. In 27 % der Proben aus Knospe/ Blatt, 19 % der Proben aus Phloem und 17 % der Proben aus Wurzelphloem wurden schwach positive PCR Nachweise erzielt. In den Proben von Januar bis Mai wurde aus allen Gewebetypen und Apfelsorten ASPV in normaler Produktstärke in der PCR

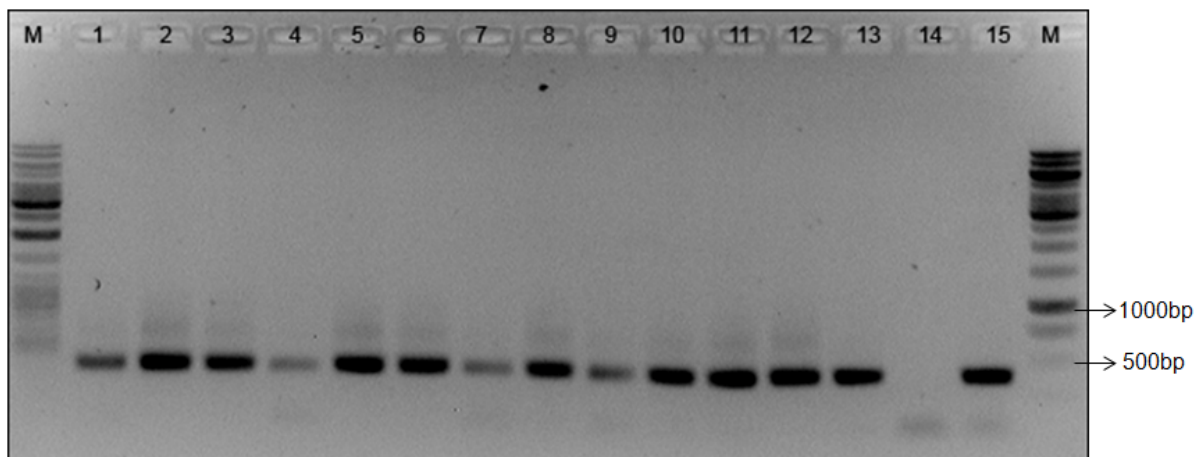


Abbildung 8: ASPV Nachweis- PCR einiger Proben des Jahreszeitenversuches Gezeigt wird beispielhaft eine gelelektrophoretische Auswertung auf einem 1 % Agarosegel einer ASPV Nachweis-PCR mit dem Primerpaar ASPV-F-8869/ ASPV-R-9211 mit der erwarteten Produktgröße von 370 bp. Aufgetrennt wurden Proben aus verschiedenen Apfelbaumgeweben des Extraktionszeitpunktes April 2008. M = DNA Längenstandard; Spur 1 - 3 Egremont Russet; Spur 4 - 6 Golden Delicious; Spur 7 - 9 Gloster; Spur 10 - 12 Cox; Spur 13 + 15 positive Tabakkontrolle; Spur 14 negative Tabakkontrolle

nachgewiesen. In den Monaten Juni bis Dezember waren schwach positive PCR Nachweise zu verzeichnen. Bei der Sorte Egremont Russet wurde ASPV im Blatt während der Monate Juni bis Oktober nur schwach nachgewiesen, dies galt auch für das Phloem im August bis Oktober und das Wurzelphloem im August, September und Dezember. Im Blatt der Sorte Golden Delicious wurde ASPV während der

Tabelle 27: Ermittlung der Virusnachweisbarkeit über den gesamten Jahresverlauf Mit Hilfe des Nachweisprimerpaares ASPV-F-8869/ ASPV-R-9211 wurde in Blatt oder Knospe (a), im Phloem (b) und im Wurzelphloem (c) über ein Jahr die Nachweisbarkeit von ASPV in sicher mit dem Isolat ASPV PB66 infizierten Apfelbäumen mittels PCR getestet.

Baum	Gewebe	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jan	Feb
Egremont Russet	a	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+
	b	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+
	c	n.b.	n.b.	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	(+)	n.b.	+
Golden Delicious	a	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
	b	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	(+)	+	+
	c	n.b.	n.b.	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	n.b.	+
Gloster	a	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+
	b	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+
	c	n.b.	n.b.	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	n.b.	+
Cox	a	+	+	+	+	+	(+)	+	-	(+)	+	+	+	+	+
	b	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	+
	c	n.b.	n.b.	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	n.b.	+

n.b. nicht bestimmt; + positiver PCR Nachweis; (+) schwach positiver PCR Nachweis; - negativer PCR Nachweis

Monate Juni bis Dezember nur schwach detektiert. Aus dem Phloem dieser Sorte wurden in den Monaten August, September und Dezember schwach positive Nachweise erzielt. Im Wurzelphloem von Golden Delicious wurde ASPV nur in den Monaten August und September mit schwachem Produkt nachgewiesen. Aus den Gewebetypen der Sorte Gloster wurden während der Monate August und September schwach positive PCR Nachweise erzielt, zusätzlich war dieses für das Blatt im Juni der Fall. Bei der Sorte Cox konnte im September aus allen Geweben ein schwach positiver PCR Nachweis erzielt werden. Im August konnte im Blatt dieser Sorte kein ASPV nachgewiesen werden. Während der gesamten Vegetationsperiode wurde nur in einer der 180 getesteten Proben kein Nachweis für ASPV erzielt. In den Monaten August und September wurde ASPV in allen Geweben nur schwach positiv nachgewiesen.

3.4 Mischinfektionsversuch mit ASPV, ACLSV und ASGV

Für den Mischinfektionsversuch wurden 68 Apfelbäume im Freiland mit Einzel-, Zweifach- und Dreifachinfektionen mit den Isolaten ASPV PB66, ASPV Bologna, ACLSV Uhl, ACLSV P203 und ASGV Gambach infiziert und in den drei darauffolgenden Jahren mittels PCR auf die gesetzten Infektionen getestet. Alle gesetzten Veredelungen wuchsen an und wurden im darauffolgendem Jahr von April bis Oktober monatlich und in den nächsten beiden Jahren jeweils im April beprobt, daraus ergaben sich insgesamt 9 Probenahmen. Die Proben wurden mittels Silica Extraktion (2.2.2.1) extrahiert und anschließend eine RT-PCR mit Random Primer (2.2.4.1) und eine Virusnachweis PCR (2.2.5.1; Primer Tab. 6; Programm Apfelviren Tab. 23) durchgeführt. Bei ASPV PB66, ACLSV Uhl und ACLSV P 203 konnten alle 24 Bäume infiziert werden (Tab. 28A). Bei ASPV Bologna konnten 20 von 24 Bäumen infiziert werden und bei ASGV Gambach wurden von den 36 inokulierten Bäumen 28 infiziert. Im gesamten Beprobungszeitraum wurden nur für das ACLSV Isolat P203 alle gesetzten Infektionen mehrfach positiv getestet. Bei ASPV PB66 und ACLSV Uhl wurden 96 % der 24 infizierten Bäume mehrfach positiv getestet. Bei ASPV Bologna konnten 40 % der 20 infizierten Bäume während des Probezeitraumes mehrfach positiv getestet werden. Von den 28 mit ASGV infizierten Bäumen wurden 54 % mehrmals positiv getestet. Über den gesamten Probezeitraum konnte keine Infektion durchgängig nachgewiesen werden.

Tabelle 28: Nachweisraten von ASPV, ACLSV und ASGV im Mischinfektionsversuch Es wurden 68 Apfelbäume in Einfach-, Zweifach- und Dreifachinokulationen mit den Isolaten ASPV PB66, ASPV Bologna, ACLSV Uhl, ACLSV P203 und ASGV Gambach infiziert und in den drei darauffolgenden Jahren mittels PCR auf diese Apfelviren getestet. (A) Gezeigt ist die Anzahl der inokulierten Bäume und die Anzahl der davon positiv getesteten Bäume. In der zweiten Spalte ist die Häufigkeit der positiven Testung der infizierten Apfelbäume aufgeführt. (B) Die infizierten Apfelbäume wurden an neun Extraktionszeitpunkten durch spezifische PCR auf die gesetzten Virusinfektionen getestet. Gezeigt ist für jede Probenahme der Anteil positiv getesteter Proben.

(A)

Isolat	gesetzte Infektionen		in der Testung positiv	
	Bäume	infiziert	einfach (%)	mehrfach (%)
ASPV PB66	24	24	4	96
ASPV Bologna	24	20	60	40
ACLSV Uhl	24	24	4	96
ACLSV P203	24	24	0	100
ASGV Gambach	36	28	46	54

(B)

Isolat	Virusnachweis in %								
	2009							2010	2011
	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Apr	Apr
ASPV PB66	21	17	42	38	0	75	67	88	67
ASPV Bologna	0	0	6	6	0	50	0	83	25
ACLSV Uhl	54	54	83	0	0	13	21	75	92
ACLSV P203	67	4	29	0	0	0	0	75	92
ASGV Gambach	29	7	7	54	7	14	21	29	39

An den 9 Extraktionszeitpunkten wurde die Anzahl der positiv getesteten Proben in Bezug zur Gesamtzahl der infizierten Apfelbäume in Prozent für die fünf verwendeten Virusisolate bestimmt (Tab. 28B). Keines der fünf verwendeten Virusisolate konnte zu einem Probenahmezeitpunkt in allem damit infizierten Proben nachgewiesen werden. Im August 2009 konnte in den Bäumen kein Nachweis für ASPV PB66, ASPV Bologna, ACLSV Uhl und ACLSV P203 erzielt werden. Die beiden ASPV Isolate konnten am besten in den Monaten September 2009 und April 2010 nachgewiesen werden. ASPV Bologna wurde in den Monaten April, Mai, August und Oktober 2009 nicht nachgewiesen. Für die beiden ACLSV Isolate zeigte sich ebenfalls der April als guter Nachweismonat, wobei der April 2011 mit 92 % die höchste Nachweisrate hatte. ACLSV Uhl ließ sich nicht im Juli 2009 nachweisen, während das Isolat P203 von Juli bis Oktober 2009 nicht nachweisbar war. ASGV Gambach wies eine sehr niedrige Nachweisrate über den gesamten Zeitraum auf, ließ sich aber an jedem Probenahmezeitpunkt in einigen Bäumen nachweisen. Die höchste Nachweisrate hatte dieses Virusisolat im Juni 2009 mit 54 %. Der Vergleich

des Probenahmezeitpunktes April der drei aufeinanderfolgenden Jahre zeigte, dass sich die Nachweisbarkeit für drei der fünf Virusisolate über den Zeitraum erhöhte (Abb. 9). Im April 2009 ließ sich ASPV Bologna nicht nachweisen und auch das andere ASPV Isolat PB66 konnte nur in 21 % der Bäume nachgewiesen werden. Die beiden ACLSV Isolate ließen sich in 54 bzw. 67 % der Bäume nachweisen und ASGV Gambach in 29 %. Im April 2010 konnten die ASPV und ACLSV Isolate in mindestens 75 % der Bäume nachgewiesen werden. Am letzten Probenahmezeitpunkt im April 2011 wurden die ASPV Isolate in weniger Bäumen als im April 2010 nachgewiesen, die ACLSV Isolate und ASGV Gambach zeigten eine höhere Nachweisrate. Besonders stark war der Abfall bei ASPV Bologna bei dem nur noch in 25 % der Bäume der Virus nachgewiesen werden konnte gegenüber 83 % aus dem Vorjahr.

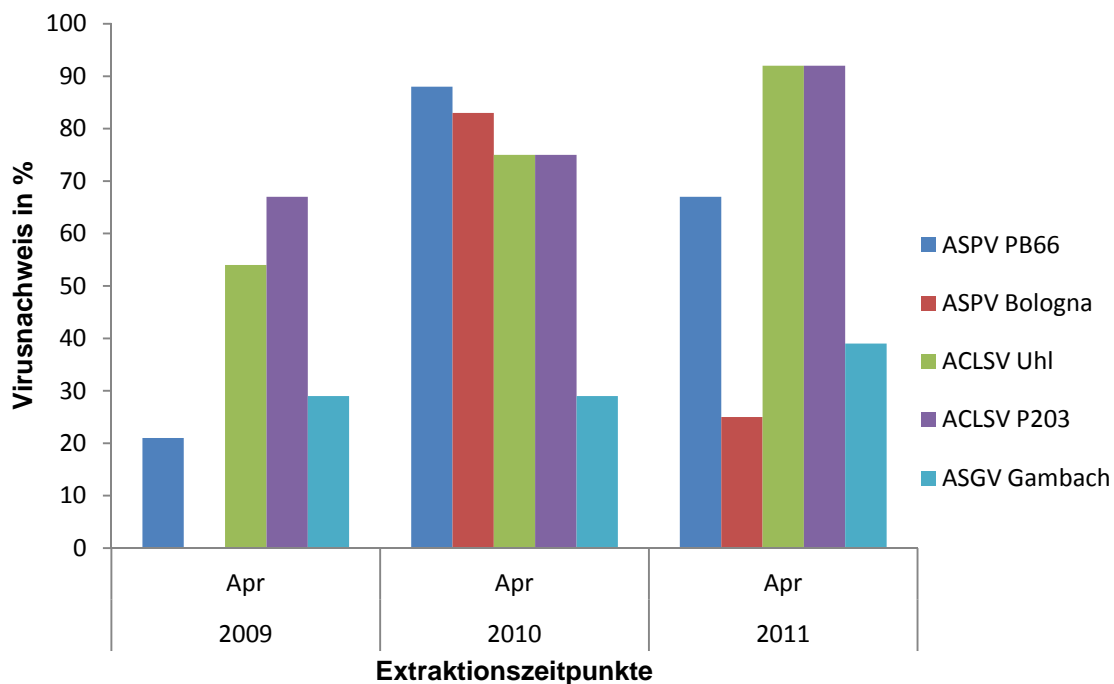
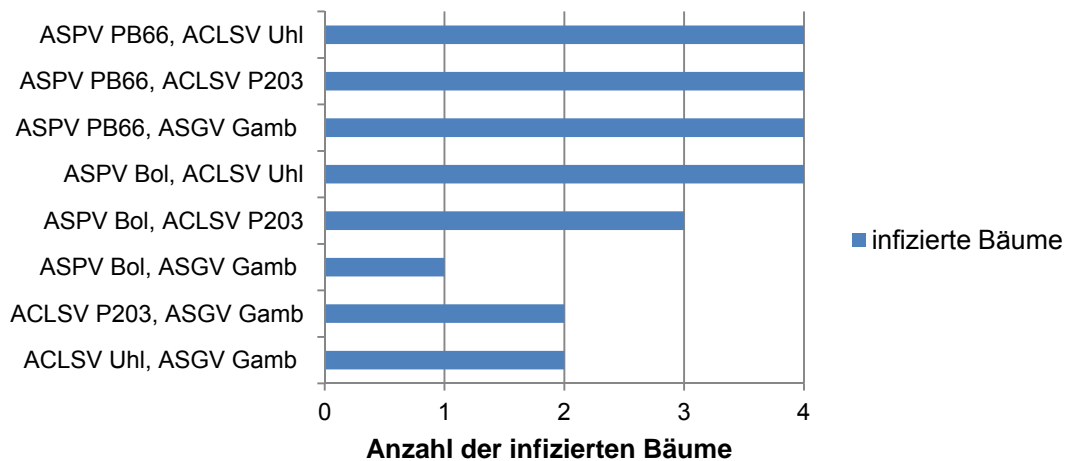


Abbildung 9: Virusnachweis im April in drei aufeinanderfolgenden Jahren im Rahmen des Mischinfektionsversuches Die 68 infizierten Apfelbäume wurden in drei aufeinanderfolgenden Jahren jeweils im April durch spezifische PCR auf die gesetzten Virusinfektionen getestet. Gezeigt ist für jeden Probenahmezeitpunkt der Anteil positiv getesteter sicher infizierter Proben.

Die Infektionsraten der Einzel-, Zweifach- und Dreifachinfektionen sind in Tabelle 29 aufgeführt. Es wurden für jede Infektion jeweils 4 Bäume inokuliert. Die Anzahl der tatsächlich zweifach oder dreifach infizierten Bäume ist in Abbildung 10 dargestellt. Bei den Einzelinfektionen wurde bei allen Isolaten eine Infektionsrate von 100 % erreicht. Bei den Zweifachinfektionen wurden bei den Kombinationen von ASPV

PB66 mit den beiden ACLSV Isolaten und dem ASGV Isolat Gambach jeweils alle vier Bäume doppelt infiziert. Dies gelang ebenfalls bei der Kombination von ASPV Bologna und ACLSV Uhl. Bei der Kombination von ASPV Bologna und ACLSV P203 wurden drei Bäume mit dem ASPV Isolat infiziert. Bei der Kombination ASPV Bologna und ASGV Gambach wurden 3 Bäume mit dem ASPV Isolat und nur ein Baum mit dem ASGV Isolat infiziert. Nur einer der vier Bäume dieser Kombination

(A) Zweifachinokulationen



(B) Dreifachinokulationen

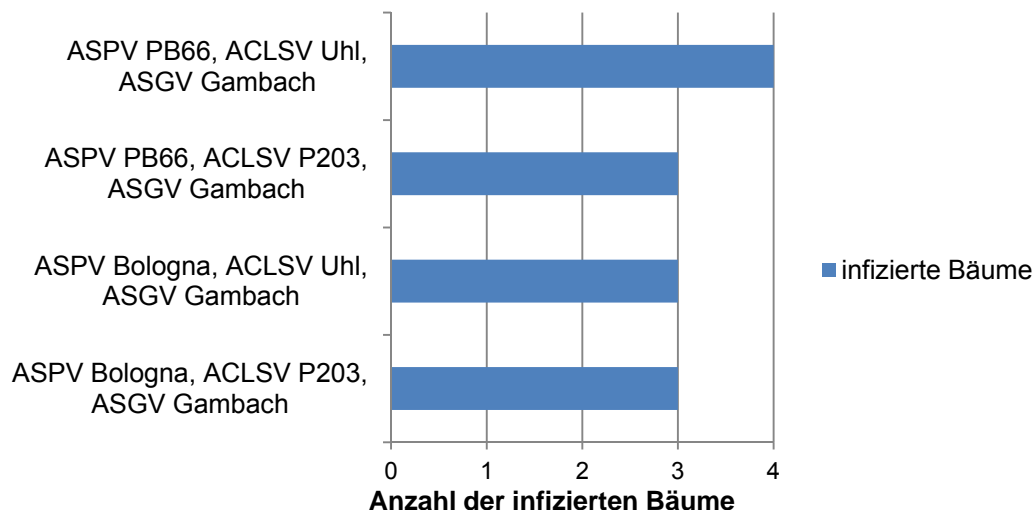


Abbildung 10: Anzahl der zweifach und dreifach infizierten Bäume innerhalb des Mischinfektionsversuches Gezeigt wird die Anzahl der infizierten Bäume für die gesetzten Zweifachinokulationen (A) und Dreifachinokulationen (B)

konnte doppelt infiziert werden. Die Kombination von ASGV Gambach mit den ACLSV Isolaten ergab eine Infektionsrate von 50 % und jeweils zwei doppelt

infizierten Bäumen. Bei den Dreifachinfektionen mit ASPV PB66 wurde ein Baum bei der Kombination mit ACLSV P203 und ASGV Gambach nicht mit dem ASGV Isolat infiziert. Die Dreifachinfektionen mit ASPV Bologna wiesen eine Infektionsrate von 75 % bei der Kombination mit ACLSV Uhl und ASGV Gambach und mit ACLSV P203 und ASGV Gambach für dieses Isolat auf. Es zeigte sich, dass die beiden Virusisolate ASPV Bologna und ASGV Gambach nicht zu einer Infektionsrate von 100 % bei den inokulierten Bäumen führten, während dies bei beiden ACLSV Isolaten und dem ASPV Isolat PB66 der Fall war. Zusätzlich zu den gesetzten Infektionen wurde auf die Bäume ein Indikator veredelt, der bei jeweils 2 Bäumen der

Tabelle 29: Infektionsraten von ASPV, ACLSV und ASGV bei Einzel- und Mischinfektionen Es wurden für jede Einzel- oder Mischinfektion 4 Apfelbäume mit den entsprechenden Viren inokuliert und diese an neun Extraktionszeitpunkten durch spezifische PCR auf die gesetzten Virusinfektionen getestet. Gezeigt werden die Infektionsraten der Viren in den Einzel-, Zweifach- und Dreifachinfektionen als Anzahl der Inokulationen mit mindestens einem positiven Nachweis im Versuchszeitraum gegenüber den dauerhaft negativ getesteten Apfelbäumen.

Isolat	Einzelinfektion (in %)	Zweifachinfektionen in %				
		ASPV PB66	ASPV Bologna	ACLSV Uhl	ACLSV P203	ASGV Gambach
ASPV PB66	100	–	–	100	100	100
ASPV Bologna	100	–	–	100	75	75
ACLSV Uhl	100	100	100	–	–	100
ACLSV P203	100	100	100	–	–	100
ASGV Gambach	100	100	25	50	50	–

Isolat	Dreifachinfektion in %				
	ASPV PB66 ACLSV Uhl	ASPV PB66 ACLSV P203	ASPV PB66 ASGV Gamb	ACLSV Uhl ASGV Gamb	ASCLV P203 ASGV Gamb
ASPV PB66	–	–	–	100	100
ACLSV Uhl	–	–	100	–	–
ACLSV P203	–	–	100	–	–
ASGV Gambach	100	75	–	–	–

Isolat	Dreifachinfektion in %				
	ASPV Bol ACLSV Uhl	ASPV Bol ACLSV P203	ASPV Bol ASGV Gamb	ACLSV Uhl ASGV Gamb	ASCLV P203 ASGV Gamb
ASPV Bologna	–	–	–	75	75
ACLSV Uhl	–	–	100	–	–
ACLSV P203	–	–	100	–	–
ASGV Gambach	100	100	–	–	–

– nicht bestimmt

Infektion *Malus pumila* cv. Virginia crab und bei den anderen beiden *Malus* sp. Spy 227 war. Die Indikatoren wuchsen nicht in allen Fällen an und konnten aufgrund von unspezifischen Symptomen, die nicht exakt einem Virus zu geordnet werden konnten, nicht in der Auswertung berücksichtigt werden.

Die Dreifachinfektionen der verwendeten Virusisolate wurden ebenfalls auf *Nicotiana occidentalis* 37B durchgeführt. Dazu wurden die Tabake mit den verschiedenen Viren mechanisch inokuliert (2.2.19.1.1), wobei für jedes Virus ein eigenes Tabakblatt verwendet wurde. Die Mischinfektion mit ASPV, ACLSV und ASGV führte beim Tabak zu einer sehr starken Stauchung der gesamten Pflanze und einem verlangsamten Wachstum, des Weiteren wurde die Blattspreite sehr stark verschmälert und die Blätter zum Teil eingerollt (Abb. 11). Die Blätter zeigten leichte Chlorosen. In den Mischinfektionen traten alle Symptome der Einzelinfektionen auf. Die beiden in diesem Versuch verwendeten ACLSV Isolate Uhl und P203 riefen in der Einzelinfektion auf Tabak Chlorosen, verschmälerte Blattspreiten und eingerollte Blätter hervor. Die beiden ASPV Isolate führten in der Einzelinfektion zu Chlorosen



Abbildung 11: Symptome einer Dreifachinfektion mit ASPV, ACLSV und ASGV bei *Nicotiana occidentalis* 37B Gezeigt werden eine mit ASPV, ACLSV und ASGV infizierte Tabakpflanze (links) 4 Wochen nach Infektion und eine gesunde Tabakpflanze (rechts) als Kontrolle. Der infizierte Tabak zeigt starke Stauchung und verschmälerte Blattspreiten mit leichten Chlorosen.

auf den Blättern und ASGV Gambach rief verschmälerte Blattspreiten und gestauchtes Wachstum hervor. Allerdings waren die Symptome in den Mischinfektionen deutlich stärker ausgeprägt im Vergleich zu den Einzelinfektionen.

3.5 Bestimmung der Sequenz von zwei ASPV Isolaten

3.5.1 ASPV PB66

Das Isolat PB66 sollte zur Generierung eines Vollängen cDNA Klonen mittels Ligationstrategie verwendet werden. Die Primer und Restriktionsschnittstellen für die Strategie wurden an der Sequenz des Isolates PA66 abgeleitet. Die Amplifikation der Fragmente mittels PCR war nur teilweise erfolgreich, deshalb wurden die generierten PCR-Produkte in pGEMT[®] und pJET 1/blunt ligiert. Auch die anschließend durchgeführten Restriktionsverdauungen zeigten von den zu erwarteten Fragmentgrößen abweichende Ergebnisse. Aufgrund dessen wurde die gesamte Sequenz des Isolates PB66 bestimmt (GenBank accession no. KF321966). Hierzu wurden verschiedene Sequenzbereiche über Primer (Tab. 7; Tab. 8) amplifiziert und nach Ligation in pGEMT[®], pGEMTeasy[®] oder pJET1/blunt sequenziert. Jeder Teilbereich des Genoms wurde für die Sequenzierung mindestens durch zwei unterschiedliche klonierte Fragmente abgedeckt. Zur Bestimmung des 5'- und 3'-Endes wurde eine RACE-PCR (2.2.16.1) durchgeführt.

ASPV PB66 hat eine Genomlänge von 9363 nt und einen zusätzlichen Poly(A)-Schwanz. Der GC-Gehalt der Sequenz liegt bei 43,46 %. Das Genom besteht aus 5 offenen Leserastern (ORF). ORF 1 codiert ein Polyprotein, das die Proteine, die für die Replikation benötigt werden enthält. ORF 2 - 4 codieren die Proteine des Triple Gene Blocks und ORF 5 codiert das Hüllprotein. Das 5'-Ende der Sequenz beginnt mit den Nukleotiden 'GGATACGCAA'. Der nicht translatierte Bereich am 5'-Ende ist 60 nt lang. ORF 1 beginnt ab Nukleotid 61 mit dem Startcodon ATG und endet mit dem TAA Stoppcodon an Position 6610 - 12. Er besteht aus 6549 nt, die 2183 Aminosäuren (aa) codieren. Das Molekulargewicht des Polyproteins beträgt 246.810 Dalton. Beim Vergleich durch tblastx der ermittelten Sequenz mit Sequenzen in der NCBI Nukleotiddatenbank konnten für die Methyltransferase, die Helikase, die Endopeptidase, die Protease und die Polymerase, die im Polyprotein des ersten ORF vorhanden sein sollten, konservierte Bereiche nachgewiesen werden. Der nicht

translatierte Bereich zwischen ORF 1 und ORF 2 ist 175 nt lang. Der zweite ORF beginnt bei Nukleotid 6788 und endet mit dem Stoppcodon TAG an Position 7457 - 59. ORF 2 codiert 223 aa und das Protein hat ein Molekulargewicht von 25.243 Dalton. Zwischen ORF 2 und ORF 3 befindet sich ein nicht translatiertes Nukleotid. Der dritte ORF ist 363 nt lang und codiert 121 aa. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt 12.917 Dalton. Er beginnt an Position 7461 und endet mit dem Stoppcodon TAA an Position 7824 - 26. ORF 3 und ORF 4 haben einen überlappenden Sequenzbereich von 95 nt. Der vierte ORF beginnt an Position 7732 und endet mit dem Stoppcodon TAA an Position 7960 - 62. Er codiert 76 aa und das Protein hat ein Molekulargewicht von 8058 Dalton. Der nicht translatierte Bereich zwischen ORF 4 und ORF 5 ist 75 nt lang. Der fünfte ORF beginnt an Position 8038 und endet mit dem Stoppcodon TAA an Position 9226 - 28. Der fünfte ORF ist 1188 nt groß und diese codieren für 396 aa. Das Molekulargewicht des Hüllproteins beträgt 42.144 Dalton. Der nicht translatierte Bereich am 3'- Ende ist 135 nt lang und endet mit der Sequenz 'CTAGATTTTC'.

3.5.2 ASPV Hannover

Das ASPV Isolat Hannover sollte zur Infektion von Bäumen im Mischinfektionsversuch (3.4) verwendet werden. Allerdings konnte dieses Isolat in der PCR zum Virusnachweis mit dem Primerpaar ASPV-F-8869/ ASPV-R-9211 (Tab. 6) weder in infizierten Tabakpflanzen mit Symptomen noch in seit über 20 Jahren infizierten Apfelbäumen nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Sequenz wurde eine dsRNA- Extraktion (2.2.2.3) von infiziertem Tabak durchgeführt. Im Anschluss wurde mit dieser Probe eine Random Primer PCR (2.2.16.2) durchgeführt und die amplifizierten PCR- Fragmente in pGEMT[®] ligiert. Die Sequenzierung des erhaltenen PCR- Fragmentes ergab eine Teilsequenz im ersten ORF des ASPV. Zur weiteren Sequenzierung wurden Primer (Tab. 9) von diesem Bereich abgeleitet und mit Primern kombiniert die von den Sequenzen der Isolate PA66 und PB66 (Tab. 7; Tab. 8) abgeleitet wurden. Im Verlauf der Sequenzierung wurden für das Isolat Hannover spezifische Primer (Tab. 9) entworfen, die die Primer der beiden anderen Isolate ersetzen. Jeder Teilbereich des Genoms wurde für die Sequenzierung mindestens durch zwei unterschiedliche klonierte Fragmente abgedeckt (GenBank accession no. KF321967). Zur Bestimmung des 5'- und 3'- Endes wurde eine RACE- PCR (2.2.16.1) durchgeführt.

Das ASPV Isolat Hannover hat eine Genomlänge von 9324 nt und einen Poly(A)-Schwanz. Der GC- Gehalt der Sequenz liegt bei 43,99 %. Das Genom besteht aus 5 ORF die für ein Polyprotein mit Replikationsproteinen (ORF 1), dem Triple Gene Block (ORF 2 - 4) und dem Hüllprotein (ORF 5) codieren. Das 5'- Ende der Sequenz beginnt mit den Nukleotiden 'GGATACGCAA' und wird bis Position 60 nicht translatiert. Der erste ORF beginnt an Position 61 und endet mit dem Stoppcodon TAA an Position 6619 - 21. Er codiert 2186 aa und das Polyprotein hat ein Molekulargewicht von 247.526 Dalton. Bei Vergleichen durch tblastx mit Sequenzen aus der NCBI Nukleotiddatenbank konnten im ORF 1 die konservierten Bereiche für die an der Replikation beteiligten Proteine gefunden werden. Der nicht translatierte Bereich zwischen ORF 1 und ORF 2 ist 107 nt lang. ORF 2 beginnt an Position 6724 und endet mit dem Stoppcodon TAG an Position 7398 - 7400. Die 669 nt des zweiten ORF codieren 223 aa. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 25.132 Dalton. Zwischen ORF 2 und ORF 3 befindet sich ein nicht translatiertes Nukleotid. Der dritte ORF ist 360 nt lang und codiert 120 aa. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 12.776 Dalton. Er beginnt an Position 7402 und endet mit dem Stoppcodon TAA an Position 7762 - 64. ORF 3 und ORF 4 haben einen überlappenden Sequenzbereich von 92 nt. Der vierte ORF beginnt an Position 7673 und endet mit dem Stoppcodon TAG an Position 7883 - 85. Er ist 210 nt lang und codiert 70 aa. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 7496 Dalton. Der nicht translatierte Bereich zwischen ORF 4 und ORF 5 ist 86 nt lang. Der fünfte ORF beginnt an Position 7972 und endet mit dem Stoppcodon TAG an Position 9190 - 92. ORF 5 ist 1218 nt groß und codiert für 406 aa. Das Molekulargewicht des Hüllproteins beträgt 43.536 Dalton. Der nicht translatierte Bereich am 3'- Ende ist 132 nt lang und endet mit der Sequenz 'CTAGATTTTC'.

3.5.3 Vergleich der ASPV Isolate ASPV PB66, ASPV Hannover und ASPV PA66

Die Sequenzen der drei ASPV Isolate PA66 (GenBank accession no. NC_003462), PB66 (GenBank accession no. KF321966) und Hannover (GenBank accession no. KF321967) wurden in Bezug auf Nukleotid- und Aminosäuresequenz (Tab. 30) verglichen. Die drei Isolate unterscheiden sich nur geringfügig in der Genomgröße. Das Genom vom Isolat Hannover ist mit 9324 nt das kleinste. Das Isolat PA66 ist 9332 nt lang und das Genom des Isolates PB66 ist mit 9363 nt das größte. Die Sequenzidentität zwischen den Isolaten PA66 und PB66 liegt bei 80,3 %. Das ASPV Isolat Hannover zeigt mit den beiden anderen Isolaten niedrigere Sequenz-

identitäten. Zwischen Hannover und PA66 liegt sie bei 73,9 % und zwischen Hannover und PB66 bei 74,1 %. Der nicht translatierte Bereich am 5'- Ende der Isolate unterscheidet sich um 1 nt in der Länge. Bei PA66 umfasst er 59 nt und bei den beiden anderen Isolaten 60 nt. Am 3'- Ende ist der nicht translatierte Bereich zwischen 132 bis 135 nt lang. Der erste ORF ist bei PA66 und PB66 2183 aa groß. Bei Hannover ist die Aminosäuresequenz mit 2186 aa drei Aminosäuren länger. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz zeigen sich Übereinstimmungen von 90,5 % bei PB66 und PA66, 86,2 % bei Hannover und PB66 und 85,4 % bei Hannover und PA66. Der Aufbau des Polyproteins der beiden sequenzierten Isolate PB66 und Hannover entspricht dem des Typstammes PA66 mit den konservierten Domänen für die bei der Replikation benötigten Proteine. Zwischen dem ersten und dem zweiten ORF befindet sich ein nicht translaterter Bereich, der bei den Isolaten PA66 und Hannover mit 99 nt bzw. 107 nt ungefähr gleich groß ist, während beim Isolat PB66 dieser Bereich mit 175 nt fast doppelt so groß ist. ORF 2 - 4 codieren für den Triple Gene Block. Der zweite ORF ist in allen drei Isolaten mit 669 nt gleich groß. Beim

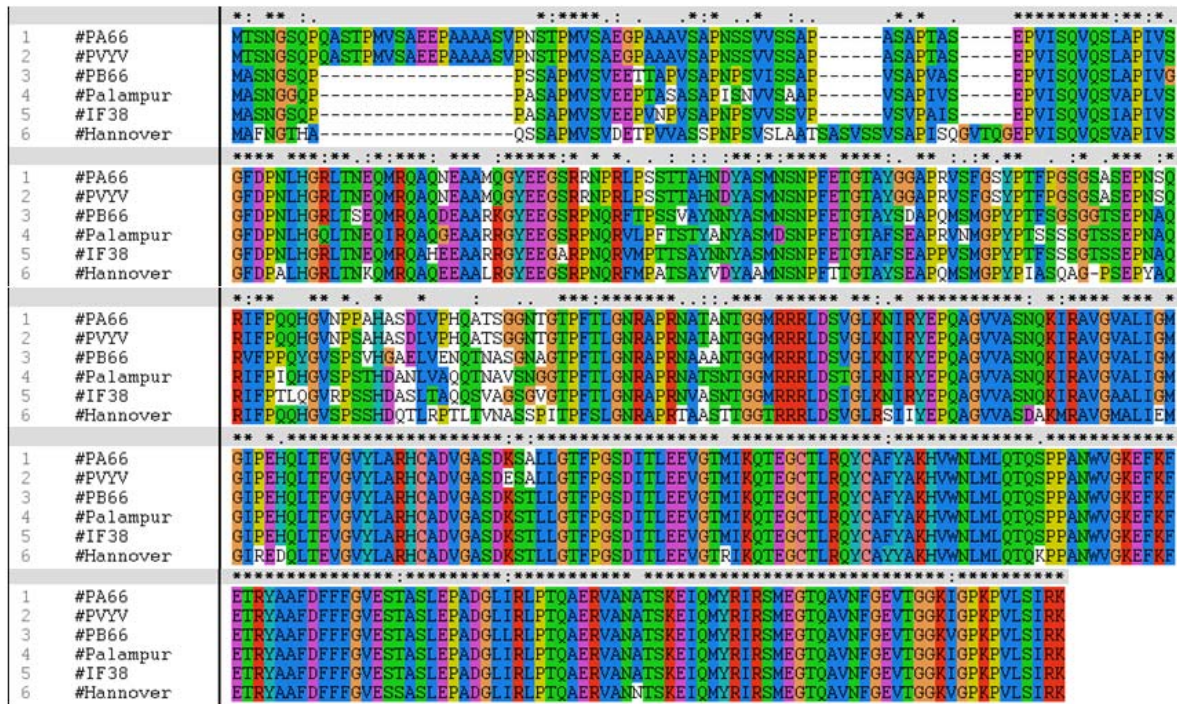
Tabelle 30: Vergleich des Genomaufbaus von drei ASPV Isolaten Die Genome von ASPV PB66 (GenBank accession no. KF321966) und ASPV Hannover (GenBank accession no. KF321967) wurden sequenziert, ausgewertet und mit dem bereits vorhandenen Isolat PA66 (GenBank accession no. NC_003462) verglichen. Der Genomaufbau ist bei den drei Isolaten identisch. Aufgeführt sind die Größen der verschiedenen translatierten und nicht translatierten Bereiche des ASPV Genoms auf DNA- und Protein-Ebene. ORF 1 codiert die für die Replikation benötigten Proteine. ORF 2 - 4 codieren den Triple Gene Block. Das Hüllprotein (ORF 5) weist eine Differenz in der Größe zwischen den drei Isolaten auf.

	PA66		PB66		Hannover	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa
Genomgröße	9332	-	9363	-	9324	-
5'- Ende UTR	59	-	60	-	60	-
ORF 1	6549	2183	6549	2183	6558	2186
UTR ORF 1/ ORF 2	99	-	175	-	107	-
ORF 2	669	223	669	223	669	223
UTR ORF 2/ ORF 3	1	-	1	-	1	-
ORF 3	360	120	363	121	360	120
Genüberlappung ORF 3/ ORF 4	91	-	95	-	92	-
ORF 4	210	70	228	76	210	70
UTR ORF 4/ ORF 5	88	-	75	-	86	-
ORF 5	1242	414	1188	396	1218	406
3'- Ende UTR	132	-	135	-	132	-

nt = Nukleotide; aa = Aminosäuren; UTR = nicht translaterter Bereich; ORF = offenes Leseraster

Vergleich der Aminosäuresequenz zeigen sich hohe Übereinstimmungen von 96,0 % bei PB66 und PA66, 94,2 % bei Hannover und PB66 und 92,9 % bei Hannover und PA66. Nach dem ORF folgt bei jedem Isolat ein nicht translatiertes Nukleotid bevor der dritte ORF beginnt. Dieser ist bei den Isolaten PA66 und Hannover 120 aa groß, während PB66 eine zusätzliche Aminosäure besitzt. Die Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz liegen beim dritten ORF zwischen PB66 und PA66 bei 90,9 %, zwischen PB66 und Hannover bei 85,1 % und zwischen PA66 und Hannover bei 86 %. Der überlappende Bereich zwischen ORF 3 und ORF 4 beträgt 91 bis 95 nt. Der vierte ORF ist beim Isolat PB66 mit 76 aa sechs Aminosäuren größer als der vierte ORF bei den beiden anderen Isolaten. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz liegt beim vierten ORF zwischen PB66 und PA66 bei 90,1 %, zwischen PB66 und Hannover bei 83,1 % und zwischen PA66 und Hannover bei 85,9 %. Zwischen dem vierten und dem fünften ORF gibt es einen nicht translatierten Bereich, der bei PB66 75 nt, bei PA66 88 nt und bei Hannover 86 nt groß ist. Das Hüllprotein wird vom fünften ORF codiert und zeigt bei den drei Isolaten die größten Unterschiede, sowohl in der Länge der Sequenz wie auch in der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz. Das Hüllprotein des Isolates PA66 weist 18 aa mehr auf wie das Hüllprotein von PB66 und 8 aa mehr wie das Isolat Hannover. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz zeigen sich Übereinstimmungen von 85,6 % bei PB66 und PA66, 79,8 % bei Hannover und PB66 und 75,5 % bei Hannover und PA66. Ein ClustalX Alignment der kompletten Hüllproteinsequenz von 6 verschiedenen ASPV Isolaten (Abb. 12) zeigt eine Insertion von 18 aa der beiden Isolate PA66 und PVYV am Anfang der Aminosäuresequenz. Das Isolat Hannover hat im ersten Teil des Hüllproteins eine Insertion von 11 aa. Anhand des Alignments läßt sich erkennen, dass der erste Teil des Hüllproteins eine höhere Diversität aufzeigt wie der zweite Teil, der hoch konserviert erscheint. Es wurde ein phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage der kompletten Hüllprotein-aminosäuresequenz von 30 ASPV Isolaten mit dem ClustalW Alignment im Lasergene MegAlign Programm erstellt (Abb. 13). Als Outgroup wurde die Hüllproteinaminosäuresequenz des *Foveavirus Apricot latent virus* (ApLV) verwendet. Der Typstamm des ASPV PA66 gruppiert mit dem Isolat PVYV, welches Adernvergilbung auf Birne hervorruft. Des Weiteren befinden sich die zwei Isolate GNKVII/34 und GNKIII/45 in näherer Verwandtschaft zu PA66. Die Isolate ST132, ST113, VY1, ST54, GNKVII/34 und GNKIII/45 wurden aus Birne isoliert. Das Isolat

PB66 befindet sich in einer Gruppe mit den aus Apfel stammenden Isolaten MT24, ST181 und pv5. Diese Gruppe steht dem Cluster mit den Isolaten aus Birne am nächsten. In einer weiteren Gruppe befinden sich verschiedene Apfelsolate aus der ganzen Welt. Das Isolat Hannover steht diesen drei Gruppen gegenüber und zeigt damit eine geringere Verwandtschaft zu den bereits erwähnten Isolaten. Einzig die



* identische Aminosäuren; : konserviert in einer ‚starken‘ Gruppe; . konserviert in einer ‚schwachen‘ Gruppe (: und . vom Programmhersteller festgelegt); - fehlende Aminosäure

Abbildung 12: Alignment der kompletten Hüllproteinsequenz von verschiedenen *Apple stem pitting virus* Isolaten Gezeigt ist ein ClustalX Alignment der kompletten Aminosäuresequenz des Hüllproteins von 6 verschiedenen ASPV Isolaten (GenBank Accession no.: PA66 NC_003462; PB66 KF321966; Hannover KF321967; PVYV D21828; Palampur FR694186; IF 38 AB045371)

Isolate KL1, KL2, KL9 und Y2 treten in einer noch entfernteren Verwandtschaftsgruppe auf und sind den anderen 26 Isolaten gegenübergestellt. Der Vergleich der zwei sequenzierten Isolate PB66 und Hannover mit dem Typstamm PA66 und weiteren Isolaten aus der NCBI Datenbank zeigte eine nähere Verwandtschaft von PB66 mit PA66 und eine hohe Divergenz des Isolates Hannover gegenüber den beiden anderen Isolaten. Das Isolat Hannover zeigt bei allen ORFs im Genom niedrigere Identitäten in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz. Im phylogenetischen Stammbaum zeigt sich dieses in der größeren Distanz zwischen dem Hüllprotein des Isolates Hannover und den anderen verwendeten Isolaten des ASPV. Innerhalb des Genoms der drei Isolate zeigt das erste Protein des Triple Gene

Blocks (ORF 3) die höchste Konserviertheit mit über 92% Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz. Die nicht translatierten Bereiche zwischen den einzelnen ORF zeigen niedrige Sequenzidentitäten, während das 5'- und 3'- Ende stärker konserviert sind.

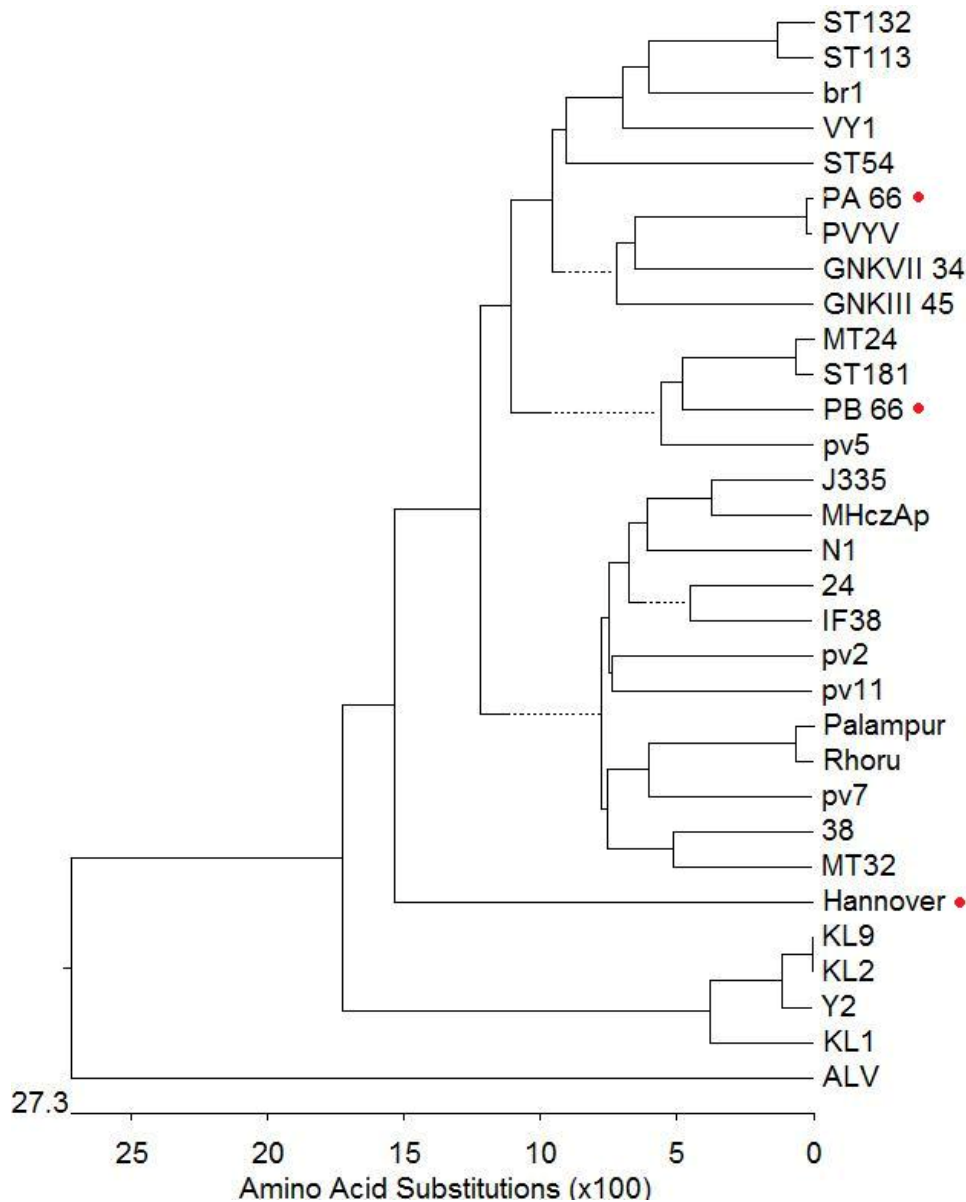


Abbildung 13: Phylogenetischer Stammbaum aufgrund der kompletten Hüllproteinsequenz von verschiedenen *Apple stem pitting virus* Isolaten Gezeigt wird ein phylogenetischer Stammbaum aufgrund von Hüllproteinamino-säuresequenzen von 30 ASPV Isolaten, der mit einem ClustalW Alignment im Lasergene MegAlign Programm hergestellt wurde. Als Outgroup wurde die Aminosäuresequenz des Hüllproteins des *Apricot latent virus* (ApLV) Isolat ALV verwendet. (GenBank Accession no.: ALV AF057035; 24 FJ619188; 38 FJ619187;br1 AY572458; GNKVII/34 AF345893; GNKIII/45 AF491929; Hannover KF321967; IF 38 AB045371; J335 AF491930; KL1 JF946775; KL2 JF946773; KL9 JF946772; MHczAp DQ003336; MT24 AF438522; MT32 AF438521; N1 AF491931; Palampur FR694186; PA66 NC_003462; PB66 KF321966; pv2 HM125157; pv5 HM125159; pv7 HM125158; pv11 HM125156; PVYV D21828; Rhoru FR694922; ST54 AF345892; ST113 AF345895; ST132 AF345894; ST181 AF495382; VY 1 HM352767; Y2 JF946774)

3.6 Herstellung eines Vollängen cDNA Klons

Zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klons des ASPV wurden drei verschiedene Methoden verwendet, dazu gehörten die Ligationsstrategie, die Vollängen PCR und das Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC). Die Vollängen PCR und das CPEC wurden im Weiteren auch auf ASGV angewendet.

3.6.1 Herstellung eines Vollängen cDNA Klons von ASPV PB66 mit Hilfe der entwickelten Ligationsstrategie

Für die Ligationsstrategie zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klons des ASPV wurde die Sequenz des Isolates PB66 in drei Fragmente D, E und F unterteilt (Abb. 14A) Der Vektor p1657 (Tab. 3, Prof. Dr. Maiss) mit dem 35S Promotor vor und dem HDVpA Terminator aus dem *Hepatitis Delta Virus* hinter der Multiple Cloning Site (Abb. 14B) wurde als Zielvektor benutzt. Die Multiple Cloning Site des Vektors p1657 beinhaltet eine *StuI* und eine *SmaI* Schnittstelle, die ein Einfügen des ASPV Genoms ohne zusätzliche Nukleotide zwischen dem 35S Promotor und Terminator in

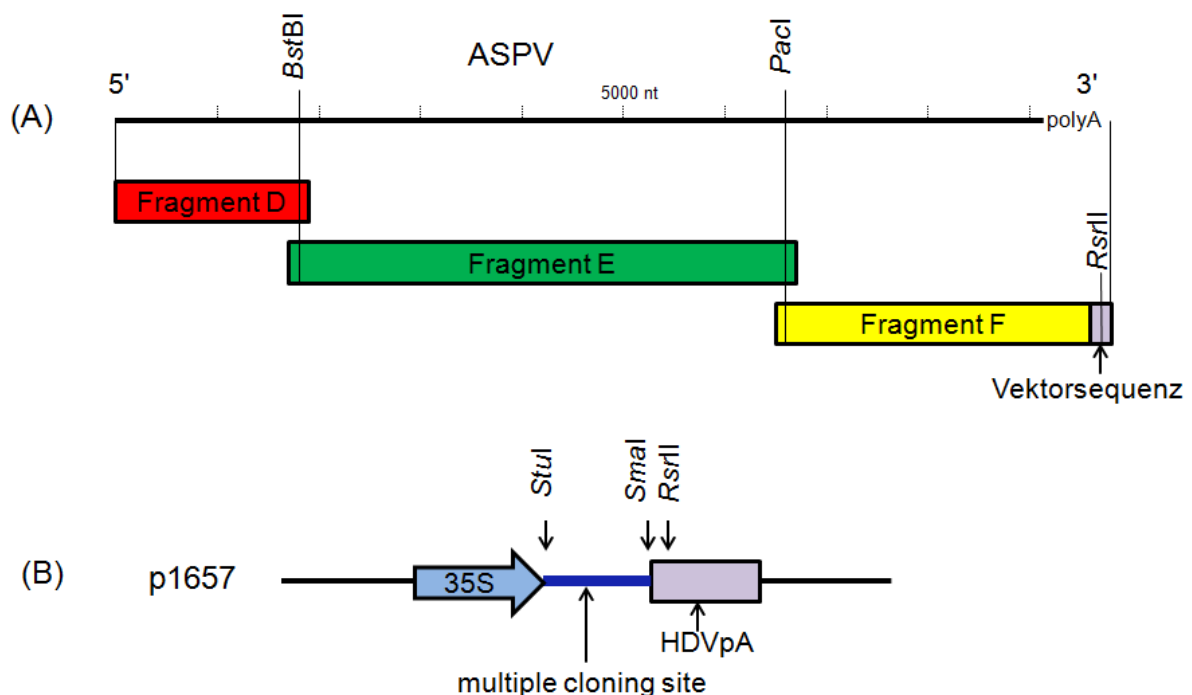


Abbildung 14: Schematische Darstellung des in drei Fragmente aufgeteilten ASPV Genoms und des verwendeten Vektors p1657 (A) Das ASPV Genom wurde in drei Fragmente unterteilt um mit Hilfe der eingezeichneten Restriktionsschnittstellen *BstBI* und *PacI* in den Vektor p1657 ligiert zu werden. An das Fragment F wurde über den Primer ASPV-R-9363*RsrII* ein Stück Vektorsequenz angehängt, um die *RsrII* Schnittstelle nutzen zu können. (B) Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Insertionsstelle des Vektors p1657 mit den verwendeten Schnittstellen *StuI*, *SmaI* und *RsrII*. Der Vektor hat vor der Insertionsstelle einen 35S Promotor und dahinter eine HDVpA Terminationssequenz.

den Vektor ermöglichen. Zur Klonierung des ASPV Genoms wurden die Restriktionschnittstellen *Bst*BI (Position 1822) und *Pac*I (Position 6609) aus dem ASPV Isolat und die *Rsr*II Schnittstelle aus dem HDVpA Terminatorbereich des Vektors genutzt. Der Vollängen cDNA Klon des ASPV wurde in drei Ligationsschritten hergestellt. Die Zwischenschritte wurden mittels PCR und Restriktionsverdau überprüft.

Im ersten Schritt wurde das Fragment D mittels PCR und den Primern ASPV-F-1 und ASPV-R-2634 amplifiziert. Es enthält eine *Bst*BI Schnittstelle an Position 1822 und ist 2634 nt lang. Das PCR Produkt wurde aufgereinigt und über eine blunt- end Ligation in den mit *Stu*I geschnittenen Vektor p1657 ligiert. Das entstandene Plasmid wurde als p1657_D bezeichnet und enthält die Schnittstellen *Bst*BI, *Sma*I und *Rsr*II (Abb. 15).

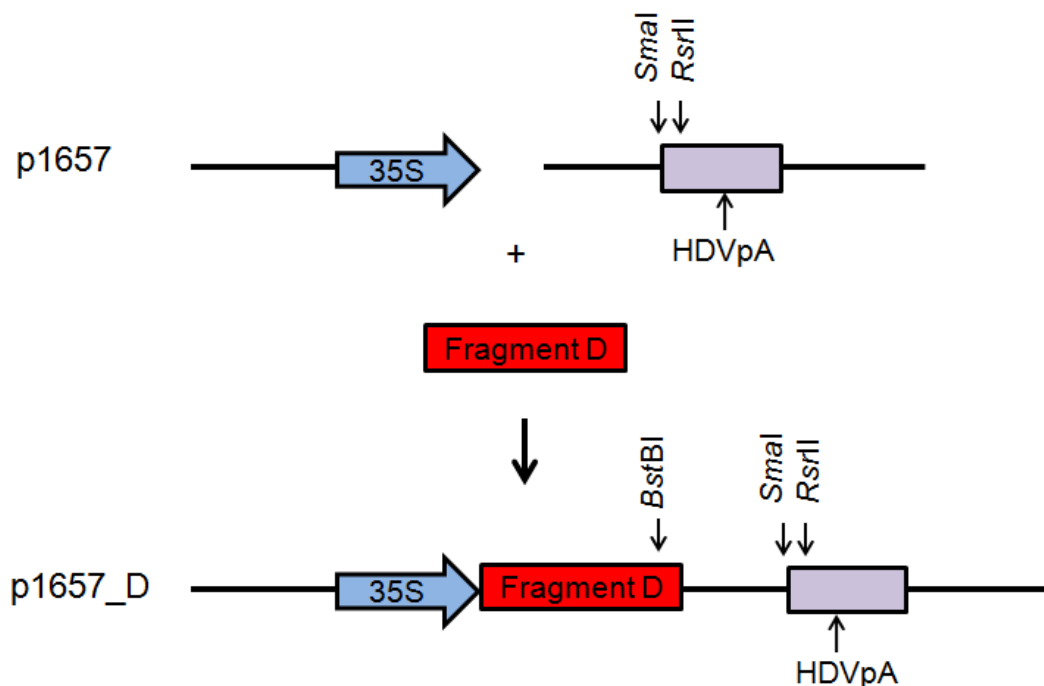


Abbildung 15: Schematische Darstellung des ersten Klonierungsschrittes zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klons vom ASPV Der Vektor p1657 wurde mit *Stu*I geschnitten und das PCR Produkt Fragment D wurde blunt- end ligiert. Daraus ergibt sich das Plasmid p1657_D mit den Schnittstellen *Bst*BI, *Sma*I und *Rsr*II.

Das Fragment E wurde mit den Primern ASPV-F-1609 und ASPV-R-6924 amplifiziert und enthält die ebenfalls im Fragment D enthaltene *Bst*BI Schnittstelle und eine *Pac*I Schnittstelle. Das 5315 bp große Fragment E wurde in einem Zwischenschritt blunt- end in den Vektor pJET 1.2 (Tab. 3) ligiert (Abb. 16A) um es über gerichtete Klonierung in das Plasmid p1657_D zu bringen. Der Vektor pJET 1.2 enthält eine

PmeI Schnittstelle, die zur weiteren Ligation genutzt wurde. Das entstandene Plasmid pJET 1.2_E wurde mit *Bst*BI und *PmeI* verdaut. Das Plasmid p1657_D (Abb. 16B) aus dem ersten Ligationsschritt wurde mit *Bst*BI und *Sma*I verdaut. Beide Verdauungen wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die ausgeschnittenen Fragmente aufgereinigt. Anschließend wurde das aufgereinigte Fragment E in das Plasmid p1657_D ligiert. Das entstandene Plasmid p1657_D_E (Abb. 16C) enthält die Restriktionsschnittstellen *Pac*I und *Rsr*II und ein Stück des Vektors pJET 1.2. Für den letzten Klonierungsschritt wurde das Fragment F mit den Primern ASPV-F-6494 und ASPV-R-9332*Rsr*II amplifiziert. Mit Hilfe des Primers ASPV-R-9332*Rsr*II wurden ein 25 Basen langer Poly(A)- Schwanz und eine *Rsr*II Schnittstelle aus dem Vektor p1657 an das 3'- Ende des ASPV Genoms gehängt. Das 2935 bp große Fragment F wurde in einem Zwischenschritt in den Vektor pGEMTeasy® ligiert (Abb. 17B) um eine gerichtete Klonierung mit den beiden Restriktionsenzymen *Pac*I und *Rsr*II zu

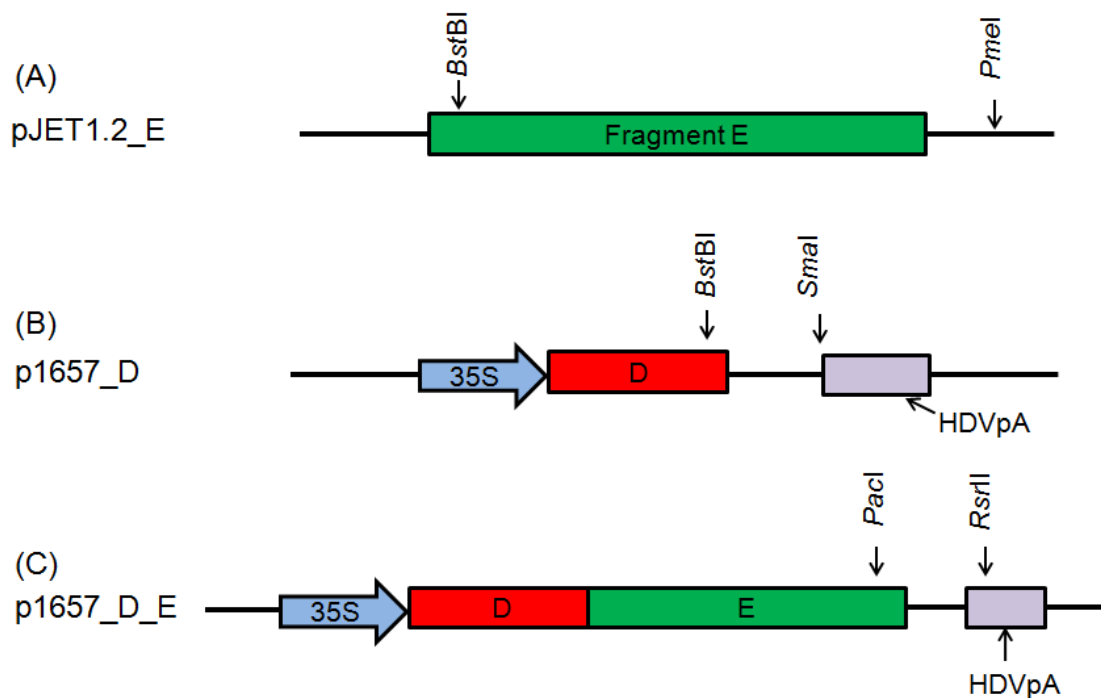


Abbildung 16: Schematische Darstellung des zweiten Klonierungsschrittes zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klon vom ASPV (A) Das Fragment E wurde blunt- end in den Vektor pJET1.2 ligiert. Daraus ergibt sich pJET1.2_E, welches in weiteren Schritten mit *Bst*BI und *Pme*I verdaut wurde. (B) Das Plasmid p1657_D, welches im ersten Klonierungsschritt entstanden ist, wurde mit *Bst*BI und *Sma*I verdaut. (C) Das ausgeschnittene Fragment E und der verdaute Vektor p1657_D wurden aufgereinigt und in einem weiteren Schritt wurde das Fragment E in p1657_D ligiert, daraus entstand das Plasmid p1657_D_E, welches eine *Pac*I und *Rsr*II Schnittstelle für die weitere Klonierung enthält.

ermöglichen. Das entstandene Plasmid pGEMTeasy_F und das im zweiten Ligationsschritt entstandene Plasmid p1657_D_E wurden mit *PacI* und *RsrII* verdaut (Abb. 17A + B). Nach Aufreinigung wurde das ausgeschnittene Fragment F in das verdaute Plasmid p1657_D_E ligiert. Das hierbei entstandene Plasmid p1657_ASPV (Abb 17C) enthält das komplette ASPV Genom im direkten Anschluss an den 35S Promotor mit einem 25 nt langen Poly(A)- Schwanz am 3'- Ende vor dem HDVpA Terminator und hat eine Gesamtgröße von 12727 bp.

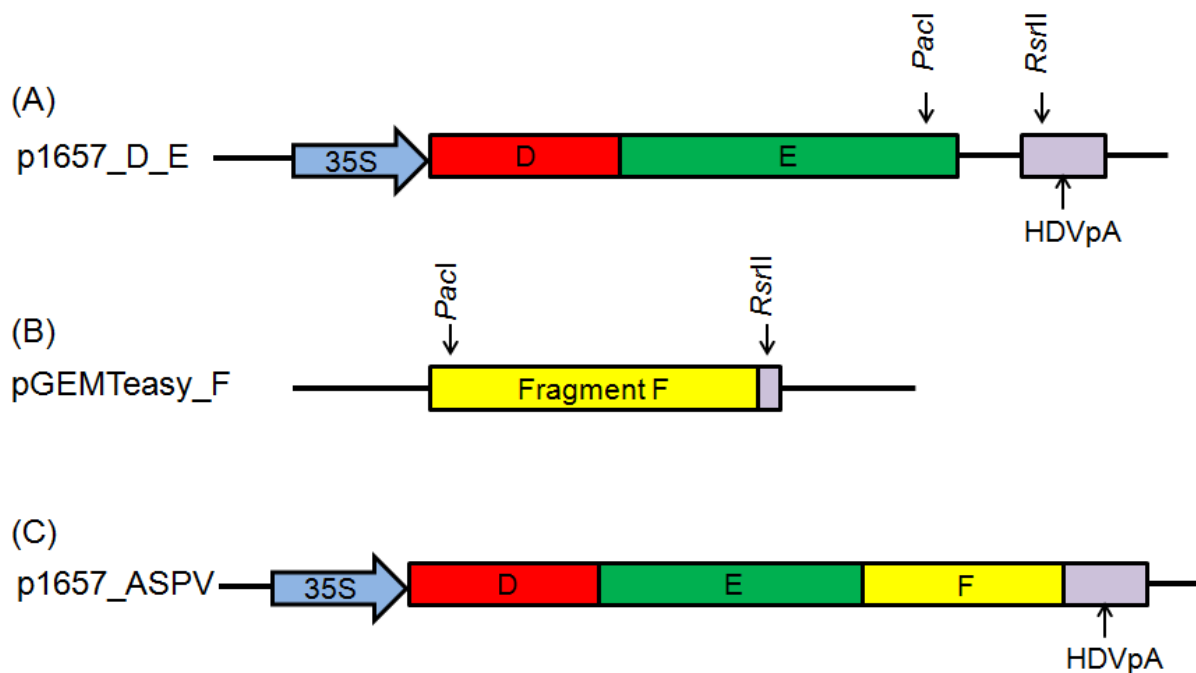


Abbildung 17: Schematische Darstellung des dritten Klonierungsschrittes zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klon vom ASPV (A) Das Plasmid p1657_D_E, welches im zweiten Klonierungsschritt entstanden ist, wurde mit *PacI* und *RsrII* verdaut. (B) Das Fragment F wurde mittels A- Überhang in den pGEMTeasy® ligiert. Daraus ergibt sich pGEMTeasy_F, welches in weiteren Schritten mit *PacI* und *RsrII* verdaut wurde. (C) Das ausgeschnittene Fragment F und der verdaute Vektor p1657_D_E wurden aufgereinigt und in einem weiteren Schritt wurde das Fragment F in p1657_D_E ligiert, daraus entstand das Plasmid p1657_ASPV.

Die Vollängen cDNA Klone wurden mit Hilfe von PCR und Restriktionsverdau überprüft. In der PCR wurden verschiedene Primerpaare verwendet, die das gesamte Genom abdecken. Die entsprechenden Fragmente konnten mit jeder Primerkombination amplifiziert werden. Das Plasmid wurde mit *ApaI*, *EcoRI* und *NotI* verdaut (Abb. 18) um die Größe zu überprüfen. Das Plasmid p1657_ASPV enthält eine *NotI* Schnittstelle und wurde durch den Verdau linearisiert. Das Restriktionsenzym *ApaI* schneidet das Plasmid p1657_ASPV in 3 Fragmente in den Größen 9002 bp, 2480 bp und 1246 bp. Mit *EcoRI* wurde der Vollängen cDNA Klon

in 4 Fragmente mit den Größen 7630 bp, 2749 bp, 1437 bp und 911 bp geschnitten. Die drei entstandenen Plasmide wurden in den weiteren Versuchen verwendet.

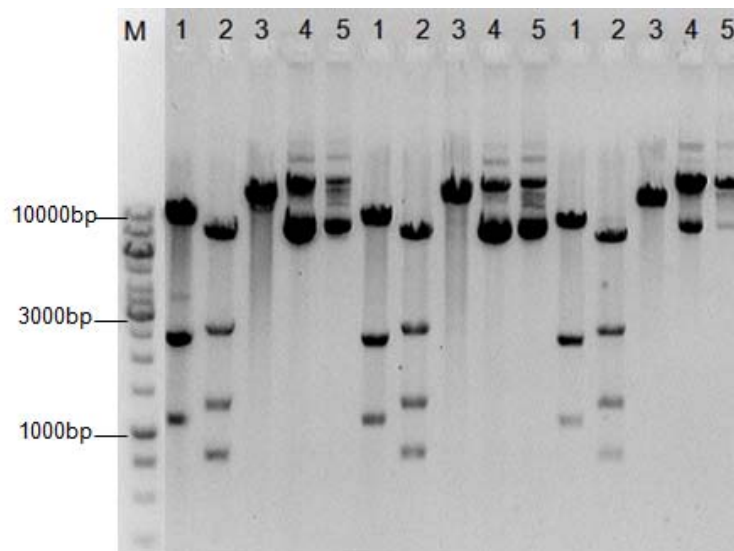


Abbildung 18: Restriktionsverdau von ASPV cDNA Volllängenklonen Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung von drei ASPV cDNA Volllängenklonen auf einem 1 % Agarosegel. Die drei ASPV Klone (p1657_ASPV) haben eine Gesamtgröße von 12727 bp und wurden mit *Apa*I (Spur 1), mit *Eco*RI (Spur 2) und *Not*I (Spur 3) verdaut. Das unverdaute Plasmid (Spur 4 und 5) wurde zur Kontrolle aufgetragen. M = DNA Längenstandard

3.6.1.1 Sequenzierung eines durch die Ligationsstrategie generierten

Volllängen cDNA Klons des ASPV

Die Sequenz eines durch die Ligationsstrategie generierten cDNA Klons des ASPV wurde durch die Sequenzierung von 16 überlappenden Fragmenten bestimmt (Anhang 6.1). Die erhaltene Sequenz wurde mit der Originalsequenz des Isolates PB66 (GenBank Accession no. KF321966) mit dem Programm SeqLab (Lasergene, Tab. 22) verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass der Klon das 5'- Ende des Isolates PA66 mit der Sequenz 'AATACGCA' anstatt des 5'- Endes des Isolates PB66 'GGATACGCA' enthielt. Somit ist die Sequenz des Klons um ein Nukleotid kürzer, hat insgesamt 9362 nt und das Guanin an Position 2 des Isolates PB66 wurde durch ein Adenin ersetzt. Außerdem beinhaltet die Sequenz des Klons 19 weitere Basenaustausche, von denen sich 14 in den ORFs befinden (Tab. 31). Im ersten ORF traten 6 Basenaustausche auf, von denen 4 zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz führten. Die beiden Basenaustausche im zweiten ORF führten zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz. Im überlappenden Bereich von ORF 3 und 4 befindet sich an Position 7818 ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin, welcher in beiden Proteinen zu einer Änderung der betreffenden Aminosäure

Tabelle 31: Basenaustausche in den Open Reading Frames (ORF) zwischen dem ASPV Isolat PB66 und dem sequenzierten cDNA Klon Gezeigt werden die Position und die Änderung in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz zwischen der Ausgangssequenz des ASPV Isolates PB66 (GenBank Accession no. KF321966) und der Sequenz des generierten cDNA Klons (Anhang 6.1).

ORF	Position (nt)	Base PB66	Klon	Aminosäure PB66	Klon
1	1747	A	C	Lys	Gln
	1805	T	C	Phe	Ser
	2722	C	T	His	Tyr
	2860	T	C	Ser	Pro
	4629	A	G	Phe	Phe
	4653	T	C	Arg	Arg
2	7237	C	T	Ile	Ile
	7393	A	G	Leu	Leu
3	7818	G	A	Glu	Lys
4	7818	G	A	Met	Ile
5	8398	G	A	Asp	Asn
	8539	A	G	Thr	Ala
	8578	G	A	Gly	Ser
	8686	G	C	Ala	Pro
	9203	A	G	Lys	Arg

A Adenin; C Cytosin; G Guanin; T Thymin; (Ala) Alanin; (Arg) Arginin; (Asn) Asparagin; (Asp) Asparaginsäure; (Gln) Glutamin; (Glu) Glutaminsäure; G (Gly) Glycin; (His) Histidin ; (Ile) Isoleucin; (Leu) Leucin; (Lys) Lysin; M (Met) Methionin; (Phe) Phenylalanin ; (Pro) Prolin; (Ser) Serin; (Thr) Threonin; (Tyr) Tyrosin

führt. Im Hüllprotein wurden 5 Basenaustausche festgestellt, die alle zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führten. Im nicht translatierten Bereich zwischen dem ersten und zweiten ORF traten 3 Basenaustausche (Position 6669, T → C; 6747 T → C und 6765 A →G) auf. Zwischen ORF 4 und 5 wurde an Position 8008 aus dem Adenin ein Guanin und im nicht translatierten Bereich des 3'- Endes wurde an Position 9313 ebenfalls aus einem Adenin ein Guanin. In der gesamten Sequenz konnten somit neben dem Anfang des Isolates PA66 19 weitere Abweichungen zur Originalsequenz festgestellt werden, von denen 10 zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz führten. Von den restlichen 9 befanden sich 5 in nicht translatierten Bereichen und 4 führten zu keiner Änderung der Aminosäureabfolge innerhalb der ORF.

3.6.1.2 Umklonierung des Vollängen cDNA Klons vom ASPV in einen binären Vektor

Der Vollängen cDNA Klon des ASPV Isolates PB66 wurde in den binären Vektor pCB301N umkloniert. Dazu wurde das Plasmid p1657_ASPV mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *SbfI* verdaut. Die *NotI* Schnittstelle befindet sich an Position 2220

direkt vor dem 35S Promotor. Mit Hilfe der *SbfI* Schnittstelle an Position 12378 wurde die Sequenz hinter dem HDVpA Terminator geschnitten. Dadurch wurde das entstandene Vollängen cDNA Klon Konstrukt (3.6.1) mit dem 35S Promoter und dem HDVpA Terminator ausgeschnitten. Der binäre Vektor pCB301N wurde mit *NotI* und *PstI* verdaut. Beide Enzyme befinden sich in der Multiple Cloning Site des Vektors, an Position 3318 (*NotI*) und 3353 (*PstI*). Die beiden Enzyme *SbfI* und *PstI* erzeugen

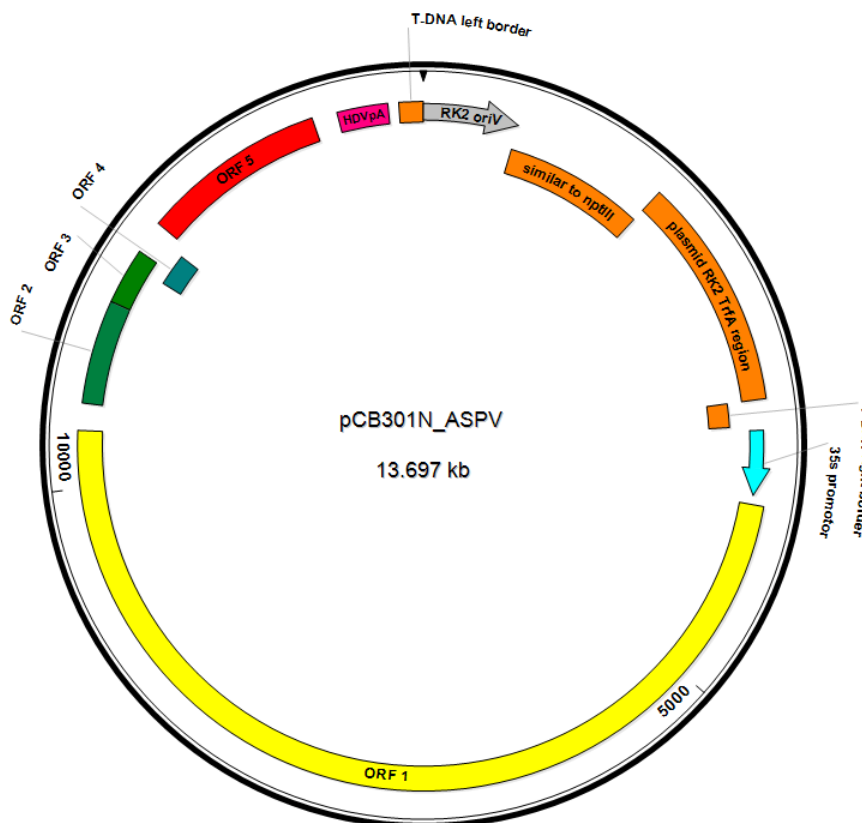


Abbildung 19: Schematische Darstellung des binären Vektors pCB301N_ASPV Gezeigt ist der durch Umklonierung des Vollängen cDNA ASPV Klon Konstruktes aus dem Vektor p1657_ASPV entstandene binäre Vektor pCB301N_ASPV.

ein kompatibles Ende. Das Vollängen cDNA Klon Konstrukt wurde über gerichtete Klonierung in den binären Vektor pCB301N gebracht. Beide Verdauungen wurden mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt. Danach wurde das ausgeschnittene Fragment in den Vektor pCB301N ligiert und *E. coli* NM 522 transformiert. Die entstandenen Plasmide pCB301N_ASPV (Abb. 19) wurden durch Restriktionsverdau und PCR überprüft und in einem weiteren Schritt *Agrobacterium tumefaciens* ATHV transformiert. Die transformierten Agrobakterien wurden in Inokulationsversuchen verwendet.

3.6.2 Entwicklung einer Vollängen PCR für ASPV und ASGV

Für die Herstellung eines Vollängen cDNA Klons des ASPV sollte eine Vollängen PCR entwickelt werden, welche es ermöglicht das gesamte Virusgenom in einer PCR zu amplifizieren. Für die PCR- Methode wurden die Primer ASPV-F-1lang am 5'- Ende und ASPV-R-9332P am 3'- Ende des ASPV Isolates PB66 designt. Der Primer ASPV-F-1lang (Tab. 11) umfasst die ersten 38 nt der Sequenz am 5'- Ende. Der zum Genomende komplementäre Primer ASPV-R-9332P (Tab. 11) ist 21 nt groß und hat zusätzlich noch 25 T um den Poly(A)- Schwanz des Virus zu generieren. Das infizierte Pflanzenmaterial wurde wie in 2.2.16.3 beschrieben für die PCR aufbereitet.

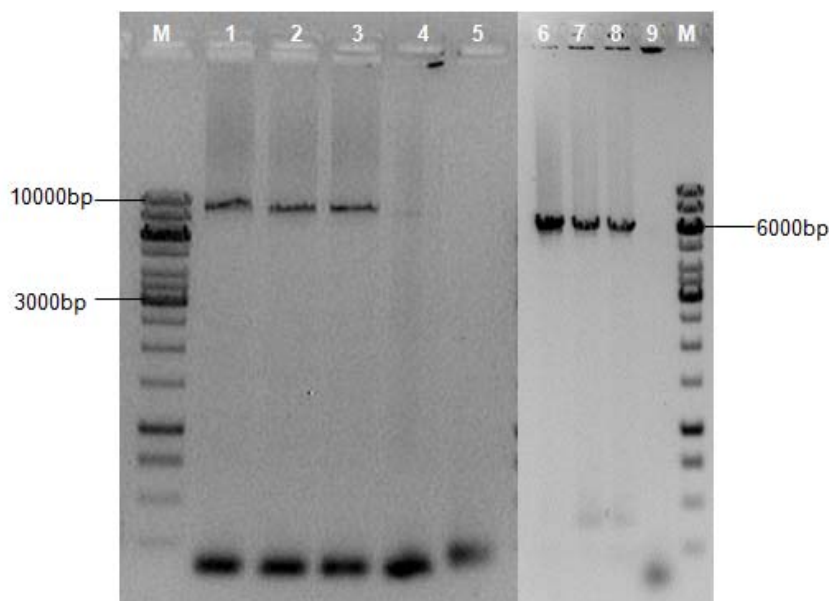


Abbildung 20: Vollängen PCR Produkte von ASPV und ASGV Gelelektrophoretische Auswertung einer Vollängen PCR mit den jeweiligen Vollängen PCR Primern von ASPV (Spur 1 - 5) und ASGV (Spur 6 - 9) auf einem 1 % Agarosegel. Als Template wurde für ASPV und ASGV eine Probe einer infizierten Pflanze verwendet. Spur 5 und 9 zeigen das PCR Ergebnis einer gesunden Pflanze mit den Vollängen PCR Primern von ASPV und ASGV als negative Kontrolle. M = DNA Längenstandard

Für die PCR mit der Precisor High- Fidelity DNA Polymerase wurden 2 bis 4 μ l Produkt der RT- PCR und 0,5 U der Polymerase benutzt. Es handelt es sich um eine long range Polymerase mit Proofreading Funktion, die es ermöglicht große DNA Fragmente zu generieren. In Versuchen zeigte die Precisor High- Fidelity DNA Polymerase im Gegensatz zur Ampliqon Taq DNA Polymerase PCR Amplifikate mit der richtigen Größe. Für die PCR werden Primer mit einer hohen Annealing-Temperatur benötigt. Das entwickelte PCR Programm Full- length (Tab. 24) besteht aus einem Denaturierungsschritt von 30 s bei 98°C bevor 40 Zyklen mit 30 s bei 98°C, 30 s bei 65°C als Annealingschritt und 5 min bei 72°C als Elongationsschritt

gewählt wurden. Als letzter Programmschritt wurde eine zusätzliche Elongation von 5 min bei 72°C gemacht. Die Ergebnisse einer Vollängen PCR mit dem Primerpaar für ASPV werden in Abbildung Spur 1 - 5 gezeigt wobei in Spur 5 das PCR Ergebnis einer gesunden Pflanze als negative Kontrolle dargestellt wurde. Das generierte PCR- Fragment ist etwa 9 kb groß, was mit der erwarteten Genomgröße von 9388 bp übereinstimmt. Ein Alignment von 5'- und 3'- Enden von verschiedenen ASPV Isolaten (Abb. 21) zeigte hohe Sequenzidentität zwischen den Isolaten und somit eine erhöhte Konserviertheit dieser Bereiche, was eine Anwendung der Primer ASPV-F-1lang und ASPV-R-9332P für die Herstellung von Vollängen PCR Produkten von weiteren ASPV Isolaten ermöglichen sollte. Die Vollängen PCR Methode wurde auch auf ASGV angewendet, dafür wurden das 5'- und 3'- Ende des ASGV Isolates Gambach mit Hilfe der RACE PCR bestimmt. Am 5'- Ende wurde der Primer ASGV-F-1 (Tab. 11) eingesetzt, der die ersten 28 nt der Sequenz umfasst. Der zum Genomende komplementäre Primer ASGV-R-6475 ist 45 nt lang, wovon 20 nt das Ende der ASGV Sequenz darstellen und zusätzlich 25 T vorhanden sind, die den Poly(A)- Schwanz des Virus generieren. Es wurde das gleiche Protokoll wie für die ASPV Proben verwendet. In Abbildung 20 werden in den Spuren 6- 9 die

(A) 5'-Ende

ASPV-F-1lang	1	5'-GGATACGCAAACAACTCTGAACAAGTAAATTATAAAG -----3'	38
ASPV PB 66	1	5'-GGATACGCAAACAACTCTGAACAAGTAAATTATAAAGGCAACCTC-3'	46
ASPV IF 38	1	5'-GGATACGCAAACAACTCTGAACAAGTAAATTATAAAGGCAACTTC-3'	46
ASPV Hannover	1	5'-GGATACGCAAACAACTCTGAACAAGTAAATTATAAAGGCAACTTC-3'	46

(B) 3'-Ende

ASPV PB 66	9319	5'-TTTCTTTTCATGCTTTAGCTTATTTTTGTTTTAACTAGATTTTC-3'	9363
ASPV IF 38	9250	5'-TTAATTTCCATGCTTTAGCTTATTTTTGTTTTAACTAGATTTTC-3'	9293
ASPV Hannover	9281	5'-TTACTTTACGTCCTTAGCTTATTTTTGTTTTAACTAGATTTTC-3'	9324
ASPV-R-9332P	1	5'-----TTTTGTTTTAACTAGATTTTC-3'	21

Abbildung 21: Alignments von 5'- und 3'- Enden von drei ASPV Isolaten mit den entwickelten Primern für die Vollängen PCR Gezeigt werden Alignments vom 5'- (A) und 3'- Ende (B) der drei ASPV Isolate PB66 (GenBank accession no. KF321966), IF 38 (GenBank accession no. AB045371) und Hannover (GenBank accession no. KF321967) mit dem jeweiligen Primer für die Vollängen PCR.

Ergebnisse einer Vollängen PCR mit dem Primerpaar für ASGV dargestellt. Die Spuren 6 - 8 zeigen die PCR Produkte von infizierten Pflanzenproben, während Spur 9 die PCR von gesundem Material darstellt. Das generierte PCR Fragment ist über 6 kb groß, was mit der erwarteten Genomgröße von 6500 bp übereinstimmt. Für

die weitere Verwendung wurde der gesamte PCR Ansatz auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und mittels Gelextraktion (2.2.9) aufgereinigt. Die Ligation der Vollängen PCR Produkte von ASPV und ASGV in den mit *Sma*I und *Stu*I linearisierten Vektor p1657 über eine blunt- end Ligation gelang nicht. In einem weiteren Ansatz wurde der linearisierte Vektor p1657 dephosphoryliert, um die Religation zu erschweren und das Vollängen PCR Produkt im Gegenzug phosphoryliert. Die Ligation dieser Produkte war ebenfalls nicht erfolgreich.

3.6.2.1 *In vitro* Transkription von Vollängen PCR Produkten

Die Vollängen PCR wurde durch das Anhängen des T7 Promoters an den Forward Primer zur Synthese von cDNA Template für die *in vitro* Transkription genutzt. An die Forward Primer ASPV-F-1T7 für ASPV und ASGV-F-1T7 für ASGV (Tab. 12) wurde der 18 Nukleotid lange T7 Promoter mit der Sequenz 5'-TAATACGACTCACTATAG-3' angehängt, wobei das letzte Nukleotid des T7 Promoters gleichzeitig das erste Nukleotid der Virussequenz von ASPV und ASGV darstellte. Das cDNA Produkt wurde in einer weiteren PCR als Template für die T7 Polymerase verwendet um *in vitro* Transkripte zu generieren. Der T7 PCR wurde in einem Ansatz eine Capping-Reagenz (Ribo m⁷ G Cap Analog, Tab. 19) zugegeben. Mit diesen 50 µl T7 PCR-Ansätzen wurden unverdünnt und mit Abreibepuffer 1:2 verdünnt mechanische Abreibungen auf *Nicotiana occidentalis* 37B durchgeführt, wobei pro Blatt für die Abreibung 10 µl verwendet und jeweils zwei Blätter pro Pflanze inokuliert wurden. Im

Tabelle 32: Virusnachweis nach Abreibung von *in vitro* RNA Transkripten cDNA von ASPV und ASGV wurde über T7 PCR in gecappte und ungecappte full-length Transkripte überschrieben. Für nachfolgende Infektionsversuche wurden pro Pflanze 20 µl des PCR-Ansatzes direkt oder in Abreibepuffer verdünnt mechanisch auf *Nicotiana occidentalis* 37B abgerieben. Nach 10 - 14 Tagen wurden infektiöse Viruspartikel mittels PCR nachgewiesen. Als Kontrolle wurde das Template der T7 PCR eingesetzt.

	aufgereinigtes Template				unaufgereinigtes Template			
	ohne Cap		mit Cap		ohne Cap		mit Cap	
	unverdünnt	1:2	unverdünnt	1:2	unverdünnt	1:2	unverdünnt	1:2
ASPV cDNA	-	-	-	-	0/10 ^a	0/3	-	-
ASPV	0/27	0/11	0/9	0/15	-	-	4/42	0/10
ASGV cDNA	-	-	-	-	0/6	-	-	-
ASGV	0/27	0/11	5/6	6/10	-	-	-	-
Kontrolle	0/1	0/1	0/3	0/3	-	-	0/10	0/6

^a infiziert/ inokuliert

ersten Teil des Versuches wurde das cDNA Produkt aufgereinigt und dem Reaktionsansatz der T7 PCR keine Capping Reagenz zugegeben. Dies führte bei beiden Viren nach Abreibung des unverdünnten oder verdünnten T7 PCR Ansatzes nicht zur Infektion (Tab. 32). Mit Ribo m⁷ G Cap Analogs konnte bei ASGV sowohl mit dem unverdünnten als auch mit dem 1:2 verdünnten T7 PCR Ansatz eine Infektion von Tabak hervorgerufen werden. Mit dem unverdünnten T7 PCR Ansatz konnten 5 von 6 und mit dem verdünnten 6 von 10 Tabakpflanzen infiziert werden. Als Symptome traten 10 - 14 Tage nach Inokulation leichte Chlorosen auf den Blättern (Abb. 22) auf, die sich nach einigen Tagen wieder zurückbildeten. Im Gegensatz zur Infektion mit dem nativen ASGV Isolat Gambach traten keine verschmälerten Blattspreiten und kein gestauchtes Wachstum auf. Von den Pflanzen

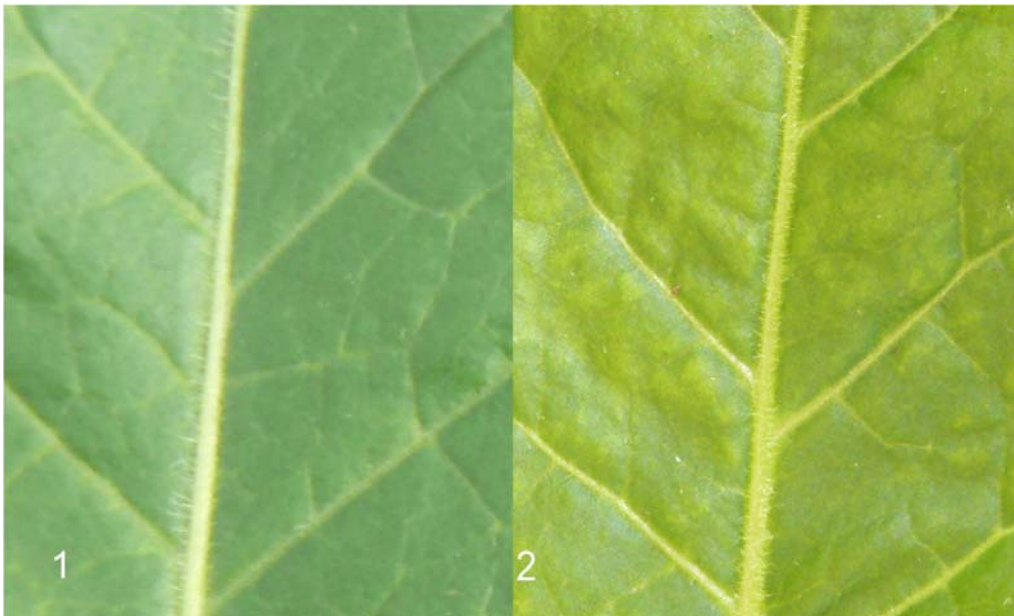


Abbildung 22: Symptome mit ASGV T7 Transkripten infizierter *Nicotiana occidentalis* 37B Blätter Gezeigt sind Tabakblätter 10 - 14 Tage nach der mechanischen Inokulation mit T7 Transkripten ((1) Kontrolle, (2) ASGV T7 Transkript). Als Symptome traten leichte Chlorosen auf.

mit positivem Virusnachweis wurden 3 bis 4 Wochen nach der Inokulation Proben zur elektronenmikroskopischen Untersuchung entnommen. Filamentöse Viruspartikel wurden am Julius- Kühn Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik in Braunschweig mittels ISEM unter Verwendung von ASGV- Antiserum im Elektronenmikroskop nachgewiesen. Die Spezifität der Viruspartikel wurde durch Dekoration mit Antiserum belegt (Abb. 23). Bei ASPV konnte mit aufgereinigtem Template und Ribo m⁷ G Cap Analog keine Infektion hervorgerufen werden (Tab. 32), deshalb wurde das cDNA Template in den weiteren T7 PCR Ansätzen unaufgereinigt zugegeben.

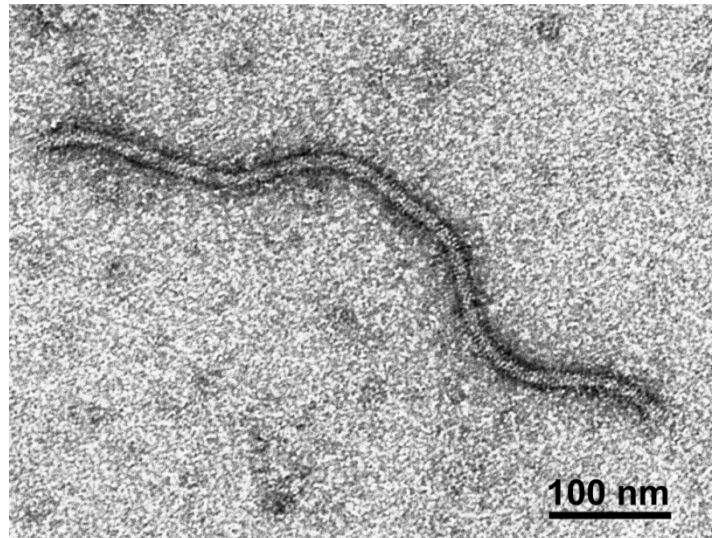


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ASGV- Viruspartikels aus einer mit dem T7 Transkript inokulierten *Nicotiana occidentalis* 37B Pflanze Gezeigt ist ein Viruspartikel aus einer mit dem ASGV T7 Transkript infizierten Tabakpflanze in elektronenmikroskopischer Aufnahme. Die Proben wurden 3 - 4 Wochen nach Inokulation entnommen. Die Spezifität des Viruspartikels wurde durch Dekoration mit dem Antiserum für ASGV belegt. Foto: Christina Maaß, Julius Kühn Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

Mit diesem Ansatz konnten nach Abreibung mit dem unverdünnten Reaktionsansatz 4 von 42 Pflanzen infiziert werden. Die Inokulation mit verdünntem PCR Ansatz führte zu keiner Infektion. 10. bis 14. Tage nach der Inokulation traten auf dem gesamten Blatt Chlorosen auf (Abb. 24). Im Vergleich zur Infektion mit dem nativen

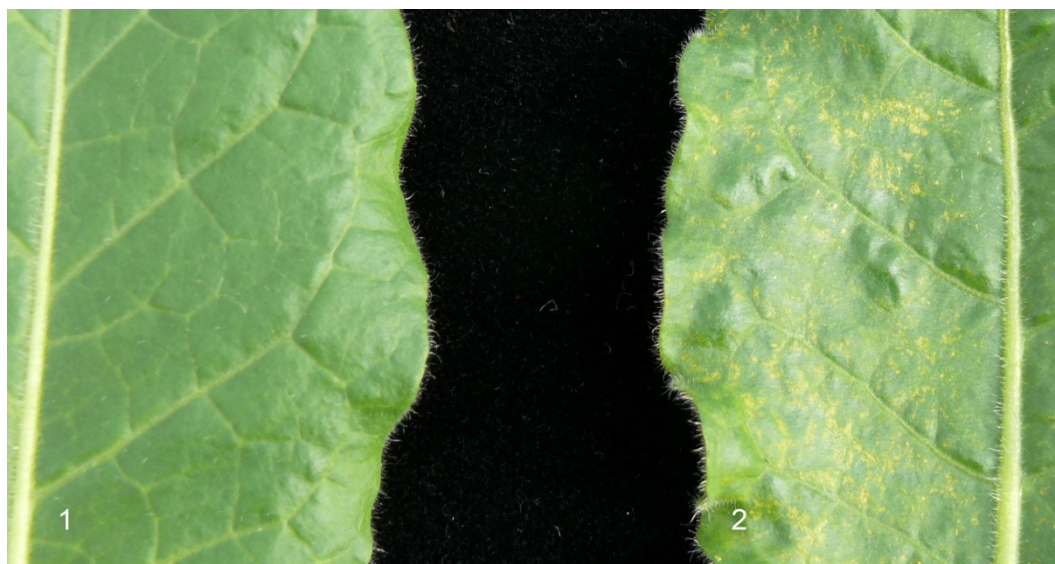


Abbildung 24: Symptome mit ASPV T7 Transkripten infizierter *Nicotiana occidentalis* 37B Blätter Gezeigt sind Tabakblätter 10 - 14 Tage nach der mechanischen Inokulation mit T7 Transkripten ((1) Kontrolle, (2) ASPV T7 Transkript). Als Symptome traten Chlorosen auf den Blättern auf.

ASPV Isolat PB66 waren die Chlorosen stärker ausgeprägt und weniger gleichmäßig über das Blatt verteilt. Nach 3 - 4 Wochen wurde infiziertes Pflanzenmaterial mit Hilfe des Elektronenmikroskops auf Viruspartikel untersucht. Es konnten mit ASPV-Antiserum dekorierte filamentöse Viruspartikel aufgenommen werden (Abb. 25). Mit positiv getesteten T7 ASGV und ASPV Tabakpflanzen wurden Folgeinokulationen durchgeführt, dabei zeigten die mit diesem Pflanzenmaterial infizierten *Nicotiana occidentalis* 37B nach 10 - 14 Tagen die gleichen Symptome wie bei Abreibung mit den T7 PCR Ansätzen.

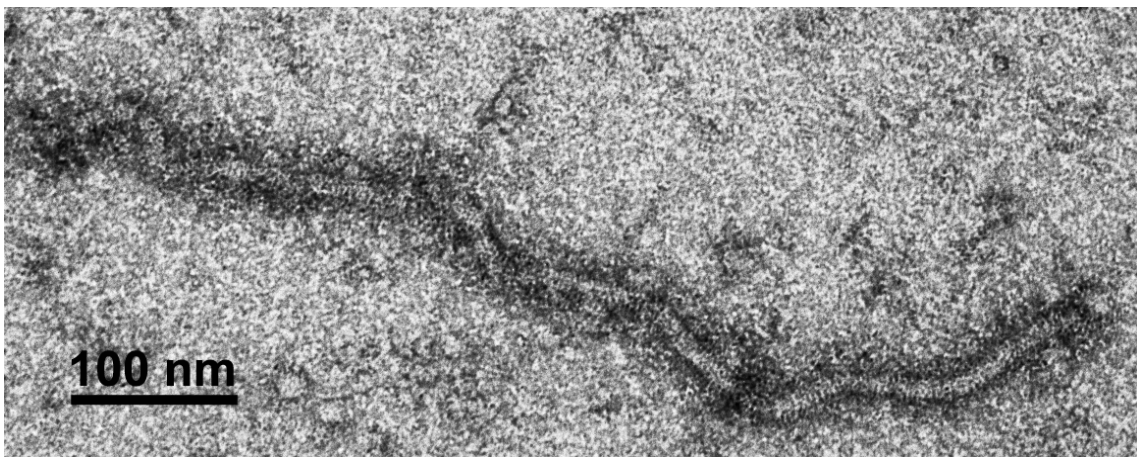


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ASPV- Viruspartikels aus einer mit dem T7 Transkript inokulierten *Nicotiana occidentalis* 37B Pflanze Gezeigt ist ein Viruspartikel aus einer mit dem ASPV T7 Transkript infizierten Tabakpflanze in elektronenmikroskopischer Aufnahme. Das Probenmaterial wurde 3 - 4 Wochen nach der Inokulation entnommen. Die Spezifität des Viruspartikels wurde durch Dekoration mit dem Antiserum für ASPV belegt. Foto: Christina Maaß, Julius Kühn Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

Nach weiteren Folgeinokulationen konnte bei beiden Viren keine Verstärkung der Symptome, wie sie beim nativen ASGV Isolat Gambach auftrat, beobachtet werden. Als Kontrolle wurden die als Template verwendete cDNA und die Extraktion einer gesunden Tabakpflanze, die in der Vollängen PCR und der anschließenden T7 PCR als Negativkontrolle diente, abgerieben. Bei beiden Kontrollen blieben die Pflanzen symptomlos (Tab. 32). Sämtliche inokulierte Pflanzen wurden ebenfalls mittels PCR (Primerpaare, Tab. 6; Programm Apfelviren, Tab. 23) auf eine Infektion überprüft, dabei führten die symptomatischen Pflanzen zu positiven PCR Nachweisen, während die verwendeten Kontrollen keine PCR Amplifikate aufwiesen.

3.6.3 Herstellung eines cDNA Vollängen Klons mit Hilfe der Circular

Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode

Als dritte Methode zur Herstellung eines Vollängen cDNA Klons des ASPV wurde das Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC; 2.2.18) in Anlehnung an Quan and Tian (2009) verwendet. Bei dieser Methode wird über eine Fusions- PCR der verwendete Vektor mit dem Insert, in diesem Fall dem kompletten Virusgenom, verbunden (Abb. 26; Abb. 27). Im ersten Schritt wurden Primer am 5' - und 3'- Ende des ASPV Genoms abgeleitet, die zusätzlich Vektorsequenz enthalten. Der Primer ASPVfusionF (Tab. 13) am 5' - Ende ist 48 nt lang und beinhaltet zusätzlich 25 nt des Vektors. Am 3'- Ende wurde der Primer ASPVfusionR entwickelt, der zusätzlich zur ASPV Sequenz 25T für den Poly(A)- Schwanz und 18 nt aus dem Vektor enthält (Tab. 13). Zur Amplifikation der Vektoren p1657 und pCBS35HDVpA wurden die Primer 2087 und 2088 (Tab. 13) eingesetzt. Mit Hilfe einer Vollängen PCR (2.2.16.3)

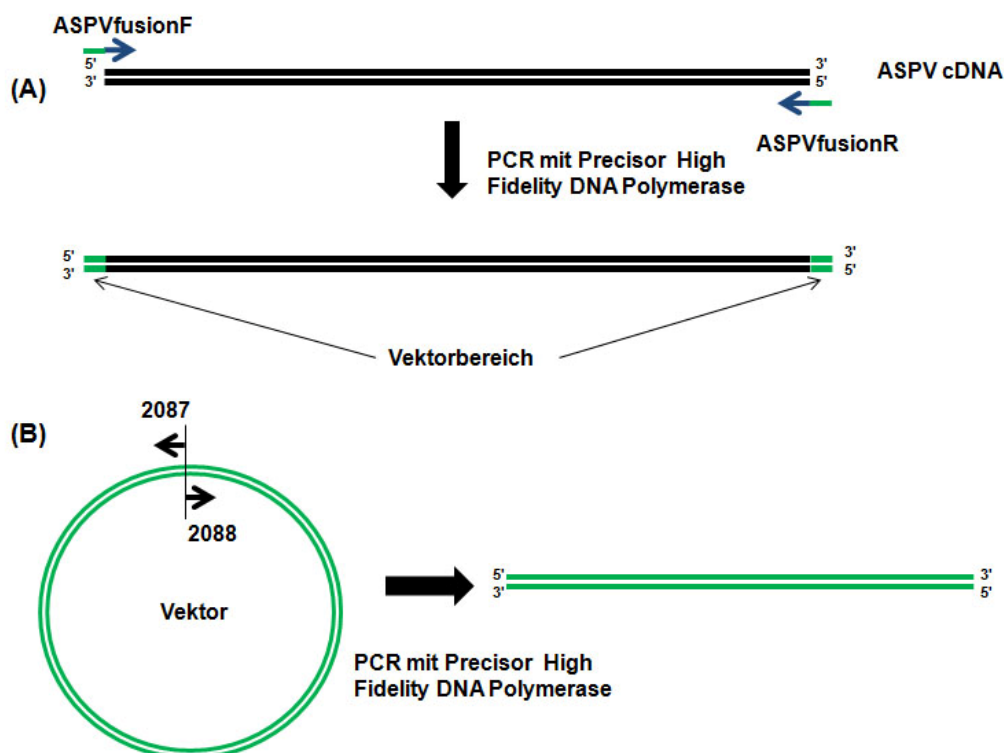


Abbildung 26: Schematische Darstellung der für die Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode benötigten PCR Produkte In einer PCR mit der Precisor High Fidelity PCR Polymerase werden die Ausgangstemplates für die CPEC- Methode amplifiziert. (A) Dazu werden an die Virussequenz über die Primer Bereiche des Vektors angehängt. (B) Der Vektor wird mit dem Primerpaar 2087 und 2088 amplifiziert.

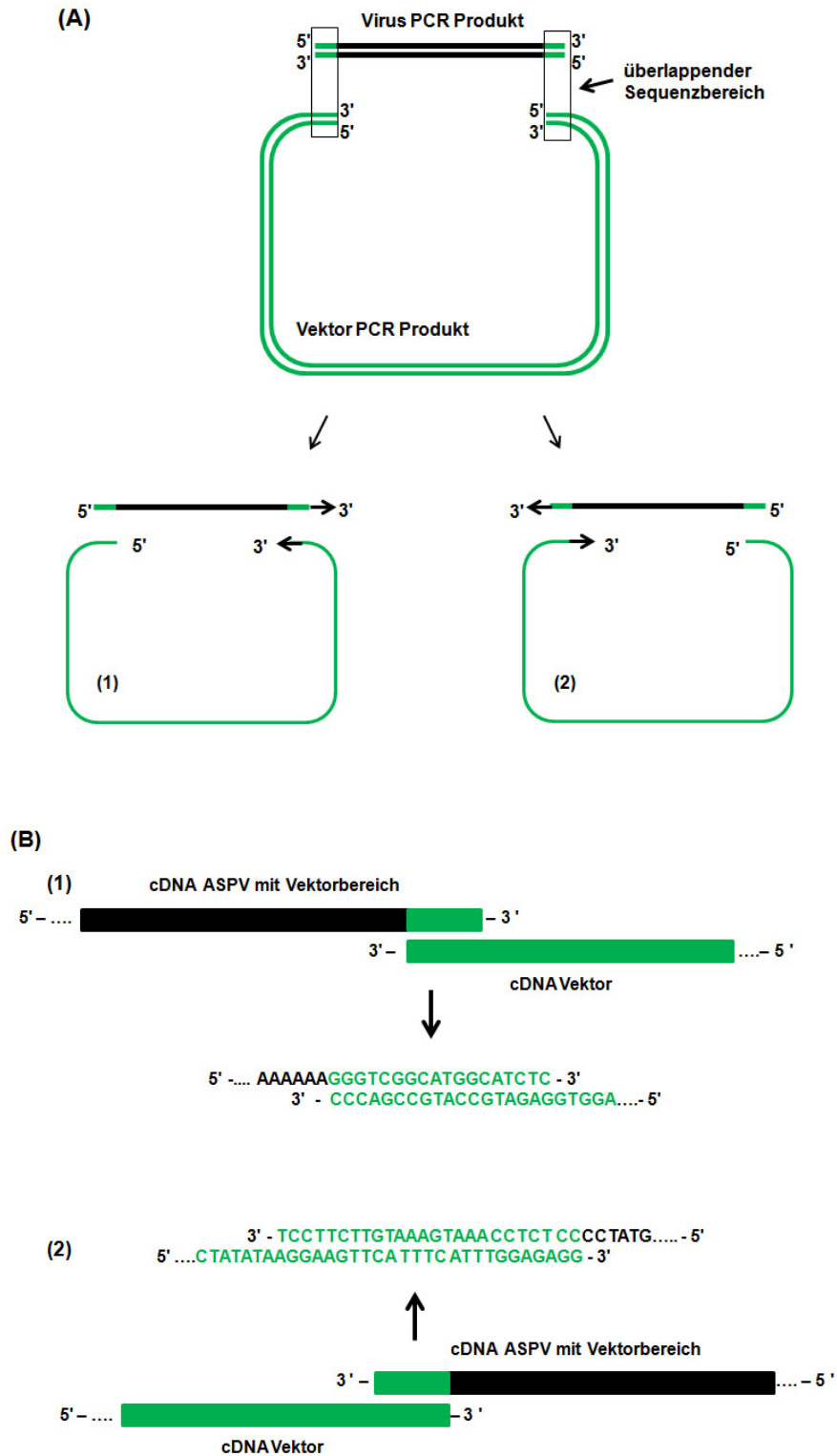


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode (A): Schematische Darstellung des Ablaufes der CPEC. In der Reaktion annealen die beiden eingesetzten PCR Produkte in den überlappenden identischen Sequenzbereichen diese liefern für die PCR Polymerase die Startpunkte (durch Pfeile markiert), um ein doppelsträngiges Endprodukt aus beiden Templates zu erstellen. (B): Genaue Darstellung der überlappenden Bereiche zwischen Vektorsequenz (grün) und ASPV Virussequenz (schwarz), die als Startpunkt für die PCR Polymerase zur Herstellung eines doppelsträngigen Endproduktes genutzt werden (siehe A (1) und (2)).

wurden die Templates für das CPEC generiert (Abb. 26; Abb. 28). Die beiden amplifizierten Produkte wurden mittels Gelextraktion (2.2.9) oder PCR Clean up (2.2.6) für den nächsten PCR Schritt aufgereinigt, um die Primer und Nukleotide der vorangegangenen PCR zu entfernen. Die beiden Templates wurden in einer Fusions- PCR mit dem Programm Fusion (Tab. 24) bei 98°C für 30 s zur Denaturation, anschließend 25 Zyklen bei 98°C 30 s, 65°C 30 s und 72°C 5 min und einem finalen Elongationsschritt bei 72°C für 5 min miteinander verbunden. Das 5' - Ende des Plasmides p1657_ASPV wurde durch den verwendeten Primer ASPVfusionF in das 5' - Ende des Isolates PB66 abgeändert. In der CPEC werden keine Primer verwendet da die überlappenden Bereiche, die durch die Primer ASPVfusionF und ASPVfusionR mit dem Vektor hergestellt wurden, als Primer für die Precisor High Fidelity DNA Polymerase in der PCR dienen (Abb. 26). Der Fusions-PCR Ansatz wurde danach auf einer Membran entsalzt und direkt *E. coli* NM 522 transformiert. Die entstandenen Plasmide wurden mit Hilfe von Colony PCR und Restriktionsverdauen überprüft. Im Fall von ASPV konnte mit dem PCR Produkt, das in einer Vollängen- PCR mit dem Einsatz von RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase PCR Produkt als Template generiert wurde, kein Vollängen cDNA Klon hergestellt werden, weil durch die Aufreinigung des PCR- Produktes zu viel Material verloren ging. Deshalb wurde in weiteren Vollängen- PCR Ansätzen das

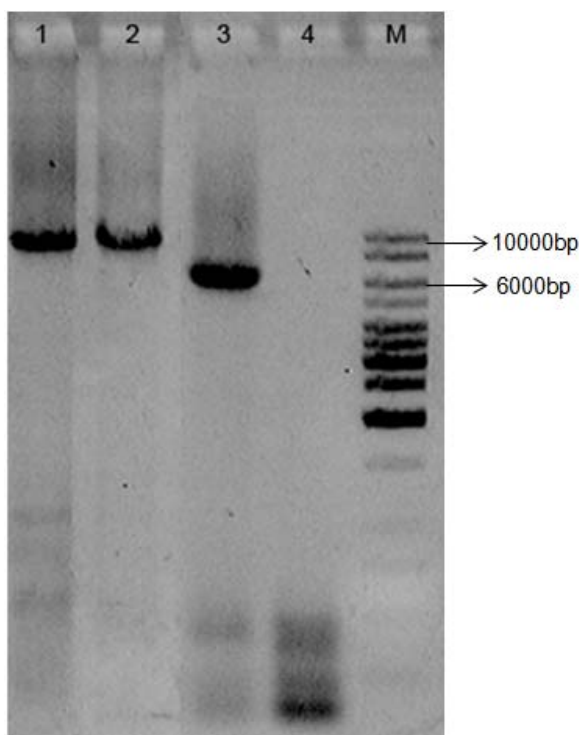


Abbildung 28: Vollängen PCR Produkte von ASPV und ASGV für die Circular Polymerase Extension Cloning Methode (CPEC) Gel-elektrophoretische Auswertung einer Vollängen PCR mit den jeweiligen Fusionsprimern von ASPV (Spur 1 + 2) und ASGV (Spur 3) auf einem 1 %iges Agarose-gel. Als Template wurde für ASPV das Plasmid p1657_ASPV und für ASGV direkt eine Probe von einer infizierten Pflanze verwendet. Spur 4 zeigt das PCR Ergebnis einer gesunden Pflanze mit den Fusionsprimern von ASGV als negative Kontrolle. M = DNA Längenstandard

mittels Ligation hergestellte Plasmid p1657_ASPV (3.6.1) als Template verwendet. Der Einsatz des Plasmides in der Vollängen- PCR führte zu höheren Produktmengen, die mittels Gelextraktion aufgereinigt und in der Fusions- PCR eingesetzt wurden. Dadurch konnte das Vollängen- PCR Produkt des ASPV in den pBin Vektor pCBS35HDVpA eingebracht und ein Vollängen cDNA Klon generiert werden. Mit den entstandenen pCBS35HDVpA_ASPV wurden nach Transformation von *E. coli* NM 522 und anschließender Überprüfung durch PCR und Restriktionsverdau *Agrobacterium tumefaciens* ATHV transformiert. Der pBin Vektor pCBS35HDVpA_ASPV ist 13.697 bp groß (Abb. 29). Der Vektor enthält den 35S Promotor vor dem integrierten Virusgenom und den HDVpA Terminator hinter der Virussequenz. Das 5' - und 3'- Ende des entstandenen pCBS35HDVpA_ASPV wurden durch Sequenzierung überprüft. Das 5' - Ende konnte durch den Einsatz des Primers ASPVfusionF erfolgreich in das Original 5' - Ende des ASPV Isolates PB66 abgeändert werden. Die Sequenz des 3'- Endes war mit der Sequenz des Isolates PB66 identisch und der Übergang von Virussequenz zu Vektor war ebenfalls korrekt.

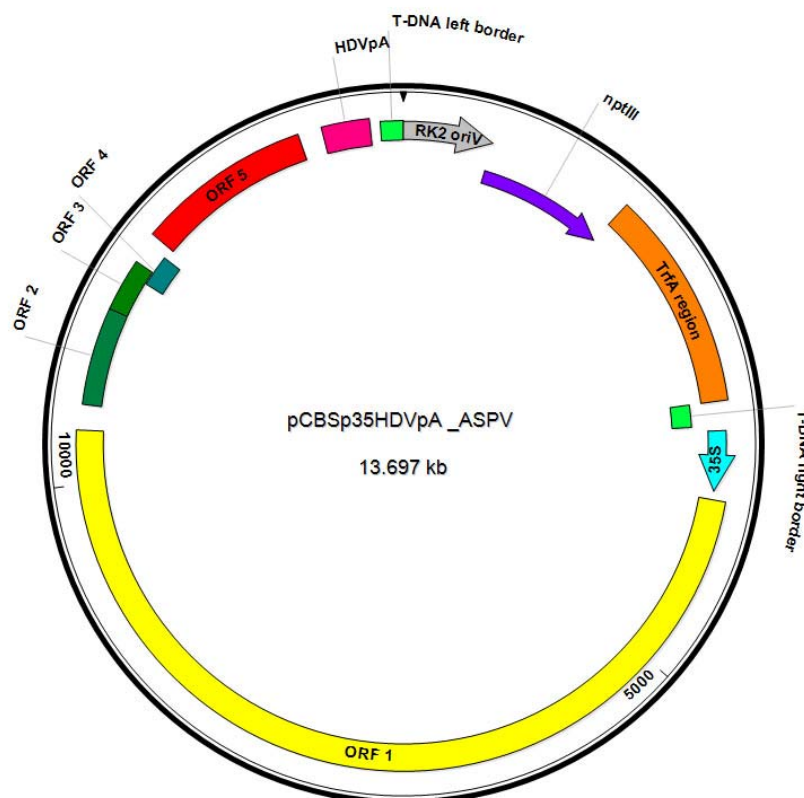
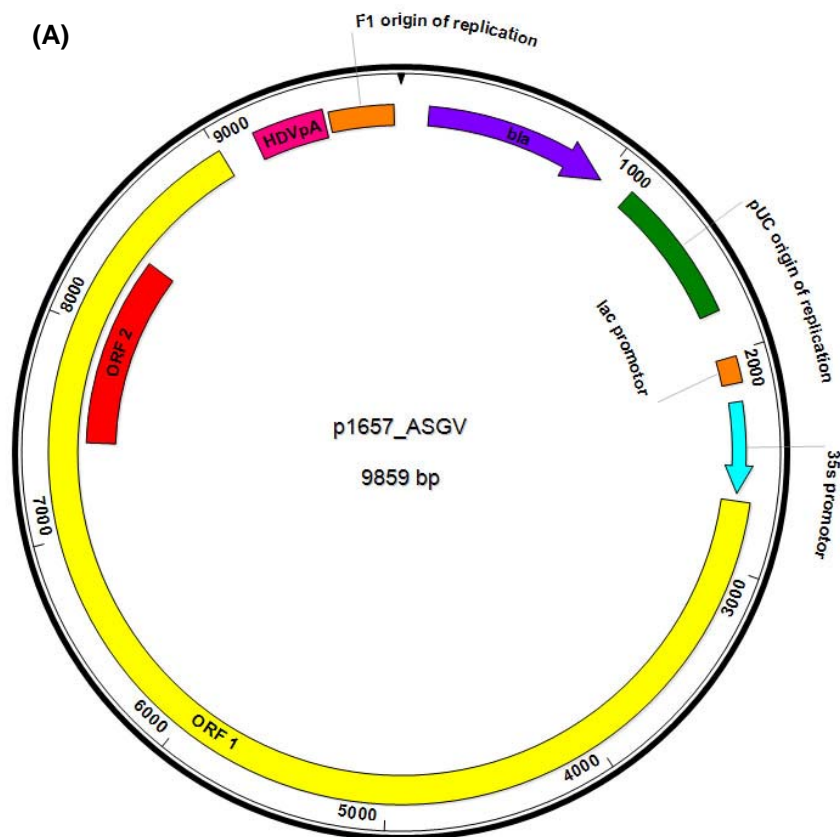


Abbildung 29: Schematische Darstellung des binären Vektors pCBSp35HDVpA_ASPV Gezeigt wird der durch Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) entstandene Vollängen cDNA ASPV Klon im binären Vektor pCBSp35HDVpA.

Das CPEC wurde ebenfalls auf ASGV angewendet. Dafür wurde am 5' - Ende der Primer ASGVfusionF (Tab. 13) mit 24 nt aus der Virussequenz und zusätzlichen 25 nt aus dem Vektor designt. Der Primer ASGVfusionR (Tab. 13) wurde am 3'-Ende verwendet, ist 52 nt lang und beinhaltet neben 9 nt des 3'- Endes des Virusgenoms 25T für den Poly(A)- Schwanz und 18 nt aus der Vektorsequenz. Das Vollängen- PCR Produkt für die Fusions- PCR konnte direkt aus den RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase PCR Ansätzen gewonnen werden (Abb. 28). Nach Aufreinigung des etwa 6850 bp großen ASGV Vollängen- PCR Produktes wurde dieses in zwei verschiedenen Fusions- PCR Ansätzen eingesetzt. Im ersten Ansatz wurde das Vollängen- PCR Produkt mit dem Vektor p1657 verbunden. In der zweiten Fusions- PCR wurde das Vollängen PCR- Produkt mit dem pBin Vektor pCBS35HDVpA verbunden. Für die Fusions- PCR wurde das gleiche Programm wie für den ASPV Ansatz verwendet. Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* NM 522 mit dem über die Membran auf gereinigten PCR- Ansatzes wurden die entstandenen Plasmide mittels PCR und Restriktionsverdau überprüft.



(B)

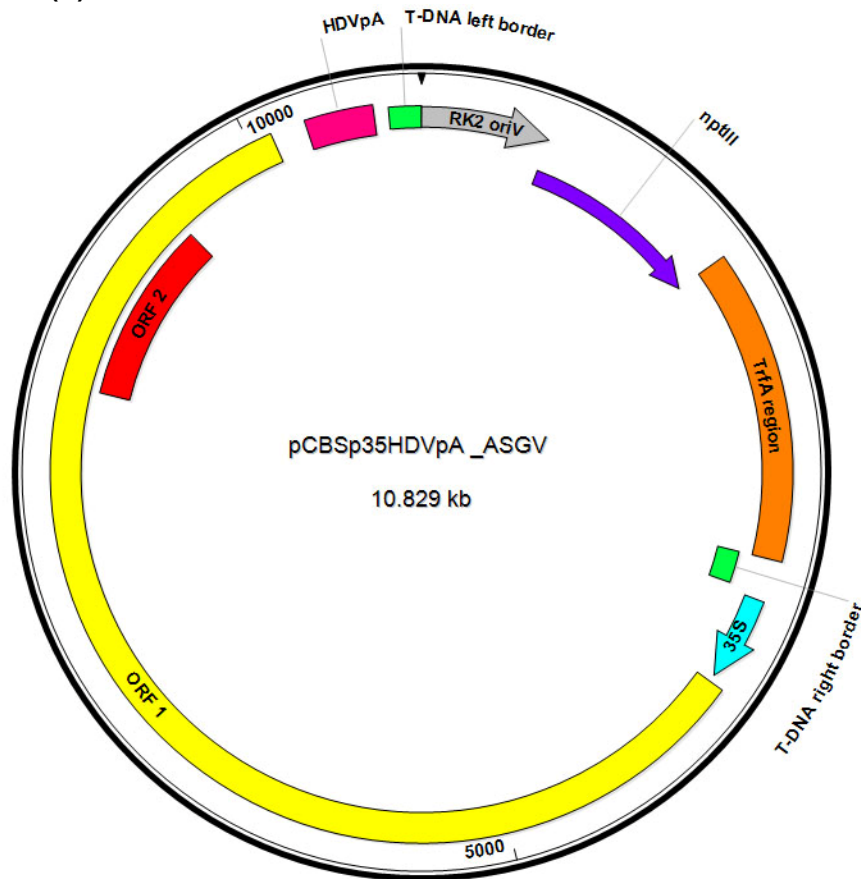


Abbildung 30: Schematische Darstellung der durch Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) entstandenen Vollängen cDNA Klone des ASGV Gezeigt sind die durch Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) entstandenen Vollängen cDNA ASGV Klone im Vektor p1657 (A) und im binären Vektor pCBSp35HDVpA (B).

Mit den pBin- Vektoren wurden in einem weiteren Schritt *Agrobacterium tumefaciens* ATHV transformiert. Das Vollängen- PCR Produkt von ASGV konnte erfolgreich mit beiden Vektoren verbunden werden. Das entstandene Plasmid p1657_ASGV (Abb. 30A) ist 9859 bp groß und wurde in nachfolgenden Versuchen für mechanische Inokulationen verwendet. Der pBin- Vektor pCBS35HDVpA_ASGV (Abb. 30B) ist 10.829 bp groß. Die Übergänge von Vektor und 5'- und 3'- Ende des ASGV Genoms wurden mittels Sequenzierung überprüft. Die durch die CPEC entstandenen pBin- Vektoren pCBS35HDVpA_ASPV und pCBS35HDVpA_ASGV wurden in verschiedenen Infektionsversuchen eingesetzt.

3.6.4 Infektionsversuche mit den generierten Vollängen cDNA Klonen

Mit den Vollängen cDNA Klonen des ASPV und ASGV, die durch die Ligationsstrategie und CPEC- Methode hergestellt wurden, wurden zur Überprüfung der Infektiösität verschiedene Infektionsversuche (Tab. 33) durchgeführt. Die

inokulierten Pflanzen wurden über 4 Wochen auf Symptome bonitiert und mittels Silica capture (2.2.2.1) und anschließender PCR mit den Nachweisprimern (Tab. 6) auf eine Infektion getestet. Der Vollängen cDNA Klon p1657_ASPV aus der Ligationsstrategie wurde für mechanische Abreibungen (2.2.19.1) auf verschiedene Versuchspflanzen verwendet, dazu wurde die hergestellte Plasmid- DNA Präparation von unverdünnt bis 1:50 mit Abreibepuffer (krautig → krautig) verdünnt eingesetzt. Eine Infektion mit ASPV durch den Klon p1657_ASPV konnte bei keinem der 161 inokulierten *Nicotiana occidentalis* 37B festgestellt werden. Die inokulierten Pflanzen zeigten keine Symptome und auch die Testung mittels PCR auf ASPV wies negative Ergebnisse auf. Als weitere Versuchspflanzen wurden Apfel- und Birnensämlinge verwendet, bei denen ebenfalls keine Infektion nachgewiesen werden konnte. Als negative Kontrolle wurde der Vektor p1657 abgerieben und ebenfalls 4 Wochen lang

Tabelle 33: **Ergebnisse der Inokulationsversuche mit verschiedenen cDNA Vollängen Viruskonstrukten.** Gezeigt werden die Ergebnisse der mechanischen Inokulation von verschiedenen Versuchspflanzen mit den cDNA Vollängen Viruskonstrukten und den dazugehörigen Kontrollen. Die Pflanzen wurden 4 Wochen auf Symptome bonitiert, da die Symptombildung beim ASGV Konstrukt nach 14 Tagen nachlässt, während die ASPV Konstrukte zu diesem Zeitpunkt erst Symptome ausbilden und mehrmals mittels PCR auf Virusinfektion getestet.

	Testpflanzen			
	<i>Nicotiana occidentalis</i> 37B	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Malus x domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>
p1657	0/26 ^a	0/4	0/1	0/1
p1657_ASPV	0/161	–	0/8	0/17
p1657_ASGV	0/57	0/19	–	–
pCBSp35HDVpA	0/9	0/4	–	–
pCBSp35HDVpA_ASPV	0/25	0/6	–	–
pCBSp35HDVpA_ASGV	0/25	0/6	–	–
ATHV	0/40	–	0/2	–
ATHV: pCBS35HDVpA	0/40	0/5	0/12	–
ATHV: pCB301N	0/9	–	–	–
ATHV: pCB301N_ASPV	0/65	–	–	–
ATHV: pCBS35HDVpA_ASPV	10/338	–	0/45	–
ATHV: pCBS35HDVpA_ASGV	23/103	0/10	0/41	–

^a infiziert/inokuliert; – Versuchspflanzen nicht getestet

auf Symptome bonitiert und mittels PCR auf ASPV und ASGV getestet. Die Testpflanzen zeigten keine Symptome und waren in sämtlichen PCR- Tests negativ. Der mit Hilfe der CPEC- Methode hergestellte cDNA Klon p1657_ASGV wurde direkt mechanisch auf Tabak und *Chenopodium quinoa* abgerieben. Bei beiden Versuchspflanzen konnten keine Symptome festgestellt werden. Die Überprüfung der

Versuchspflanzen mittels PCR war negativ. Mit dem Klon p1657_ASPV und dem Vektor p1657 wurden zusätzlich *in vitro* angezogene Pflanzen von Apfel und Birne inokuliert, dazu wurden die Pflanzen mit einer sterilen Kanüle leicht an der Blattoberfläche verletzt und ein Tropfen Plasmid- DNA Lösung auf die Verletzung gegeben. Die mit p1657_ASPV und p1657 inokulierten Pflanzen wurden nach 2 - 4 Wochen mittels Western Blot (2.2.20) und dem Antikörper AS 647 (Tab. 2) auf eine Infektion mit ASPV überprüft. Zusätzlich wurden die inokulierten Apfel- und Birnenpflanzen mittels Silica capture mit anschließendem DNase Verdau (2.2.3) und PCR überprüft. Der Klon p1657_ASPV konnte keine der verwendeten Versuchspflanzen infizieren. Das durch Ligation hergestellte Vollängen Konstrukt des ASPV wurde in einem weiteren Versuch aus dem Vektor p1657 ausgeschnitten und in den pBin Vektor pCB301N ligiert. Das Konstrukt pCB301N_ASPV (3.6.1.1) wurde für Versuche zur Infektion von Tabak mittels Agroiinokulation (2.2.19.2) eingesetzt. Die Inokulation mit *Agrobacterium tumefaciens* ATHV: pCBN301N_ASPV führte bei keiner der 65 Tabakpflanzen zu Symptomen. Die Überprüfung der Proben mittels PCR erbrachte ebenfalls negative Ergebnisse. Als Kontrollen für die Agroiinokulation wurden die verschiedenen Versuchspflanzen mit dem Agrobakterium ohne pBin-Vektor und mit den pBin- Vektoren ohne Insert inokuliert. Die Bonitierung auf Symptome und die Überprüfung auf eine Infektion mit ASPV und ASGV durch PCR mit den Nachweisprimern (Tab. 6) war in allen Fällen negativ. Die durch die CPEC-Methode hergestellten pBin- Vektoren pCBS35HDVpA_ASPV und pCBS35HDVpA_ASGV wurden mechanisch auf *Nicotiana occidentalis* 37B und *Chenopodium quinoa* abgerieben. Dazu wurde die hergestellte Plasmid- DNA Präparation 1:20 mit Abreibepuffer (krautig → krautig) verdünnt verwendet. Bei beiden Vektoren kam es zu keiner Infektion. Die Bonitierung auf Symptome über 4 Wochen war negativ. Als Kontrolle wurde in diesem Fall der der pBin- Vektor pCBS35HDVpA ohne Insert genutzt. Die Überprüfung sämtlicher Testpflanzen 2 und 4 Wochen nach der Inokulation durch PCR erbrachte ebenfalls negative Ergebnisse. Mit den pBin- Vektoren pCBS35HDVpA und pCBS35HDVpA_ASPV transformierte Agrobakterien wurden in der Infiltration mit Agrobakterien (2.2.19.3) eingesetzt. Es wurden jeweils 5 - 10 Blätter von *Nicotiana occidentalis* 37B, *Nicotiana tabacum* var. Samsun und *Chenopodium quinoa* infiltriert und nach drei Tagen mittels Silica capture mit anschließendem DNase Verdau (2.2.3) und PCR auf eine Infektion überprüft. Zusätzlich wurden die infiltrierten Blätter mittels Western Blot (2.2.20) und

dem Antikörper AS 647 (Tab. 2) auf eine Infektion mit ASPV überprüft. Bei keinem der infiltrierten Blätter konnte eine Infektion nachgewiesen werden.

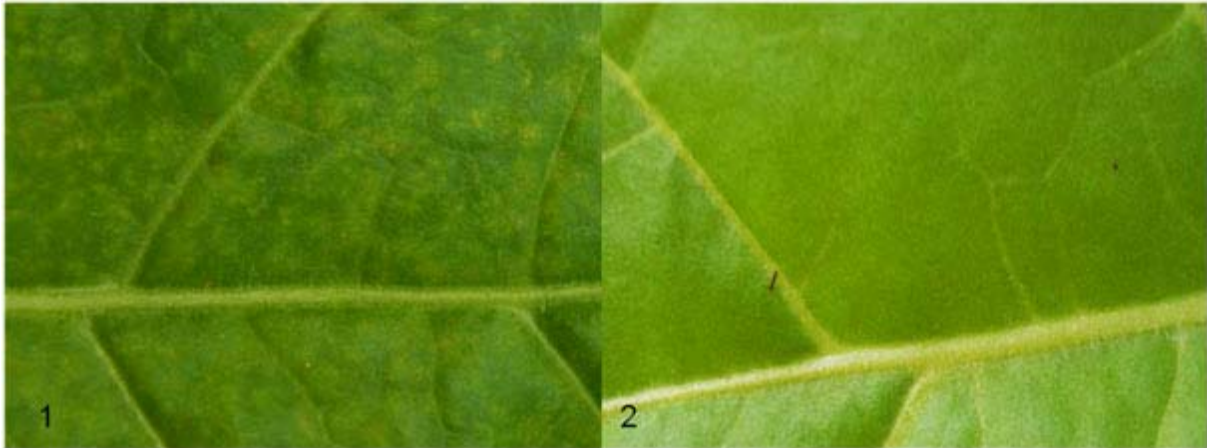


Abbildung 31: Symptome des infektiösen ASPV cDNA Vollängen Klon auf *Nicotiana occidentalis* 37B (1) Gezeigt wird ein mittels ATHV: pCBS35HDVpA_ASPV infiziertes Tabakblatt mit leichten Chlorosen 4 Wochen nach der mechanischen Inokulation (2) Die Kontrollabreibung mit ATHV: pCBS35HDVpA führte zu keinen Symptomen.

Die Agroinokulation mit *Agrobacterium tumefaciens* ATHV: pCBS35HDVpA_ASPV infizierte 10 von 338 *Nicotiana occidentalis* 37B Pflanzen (Tab. 33). Dabei wurden drei von einander unabhängige Klone verwendet, von denen zwei zu einer Infektion führten. Der erste Klon infizierte 1,6 % und der zweite Klon 7,6 % der Versuchspflanzen. Auf den Tabakblättern bildeten sich 2 bis 3 Wochen nach Inokulation leichte Chlorosen (Abb. 31). Diese Symptome blieben während der gesamten weiteren Kultivierungszeit erhalten. In den 10 symptomatischen Tabaken konnte mittels PCR ASPV nachgewiesen werden. Von den symptomatischen Pflanzen wurden mechanische Abreibungen mit dem infiziertem Pflanzenmaterial auf junge Tabakpflanzen durchgeführt. Nach zwei Wochen traten auf diesen Chlorosen auf und die Infektion mit ASPV konnte per PCR nachgewiesen werden. Die auftretenden Symptome sind denen dem cDNA Klon zu Grunde liegendem nativen Isolat PB66 sehr ähnlich. Die Chlorosen, die nach Infektion mit dem Isolat PB66 auftraten, sind stärker ausgeprägt, als die Chlorosen, die nach Agroinokulation mit dem cDNA Klon pCBS35HDVpA_ASPV, auftraten. In weiteren Agroinokulationsversuchen mit *Agrobacterium tumefaciens* ATHV: pCBS35HDVpA_ASPV mit Apfelsämlingen konnten keine Infektionen erzielt werden. Die Agroinokulation mit *Agrobacterium tumefaciens* ATHV: pCBS35HDVpA_ASGV infizierte 23 von 103 *Nicotiana occidentalis* 37B Pflanzen (Tab. 33). Es wurden zwei von einander unabhängige Klone verwendet, von denen der erste eine Infektionsrate von 50 % und der zweite

eine Infektionsrate von 5 % hatte. Auf den Tabakblättern bildeten sich zwischen dem 10. und 14. Tag sehr schwache Chlorosen, die nach einigen Tagen wieder zurück gebildet werden (Abb. 32). Danach blieb der Tabak während der gesamten weiteren Kultivierungszeit symptomlos. In den 23 symptomatischen Tabaken konnte per PCR ASGV nachgewiesen werden. Mit Tabakblättern dieser infizierten Pflanzen wurde eine mechanische Inokulation auf junge Tabake durchgeführt. Zwischen dem 10. und 14. Tag traten auf diesen Tabakpflanzen die sehr schwachen Chlorosen auf, die sich ebenfalls wieder zurückbildeten und die Infektion mit ASGV konnte per PCR nachgewiesen werden. Die auftretenden Symptome unterscheiden sich stark vom dem cDNA Klon zu Grunde liegendem Isolat Gambach. Beim Isolat Gambach traten zwar ebenfalls sehr schwache Chlorosen zwischen dem 10. und 14. Tag auf, die sich dann zurückbildeten bei den ersten Abreibungen nach der Übertragung von Apfel auf Tabak, aber zusätzlich kam es zu einer Verschmälerung der Blattspreite und einem gestauchten Wachstum. Diese beiden Symptome wurden im Laufe der Erhaltung und weiteren Abreibung immer ausgeprägter. Die Verschmälerung der Blattspreite und das gestauchte Wachstum traten beim cDNA Klon pCBS35HDVpA_ASGV nicht auf.

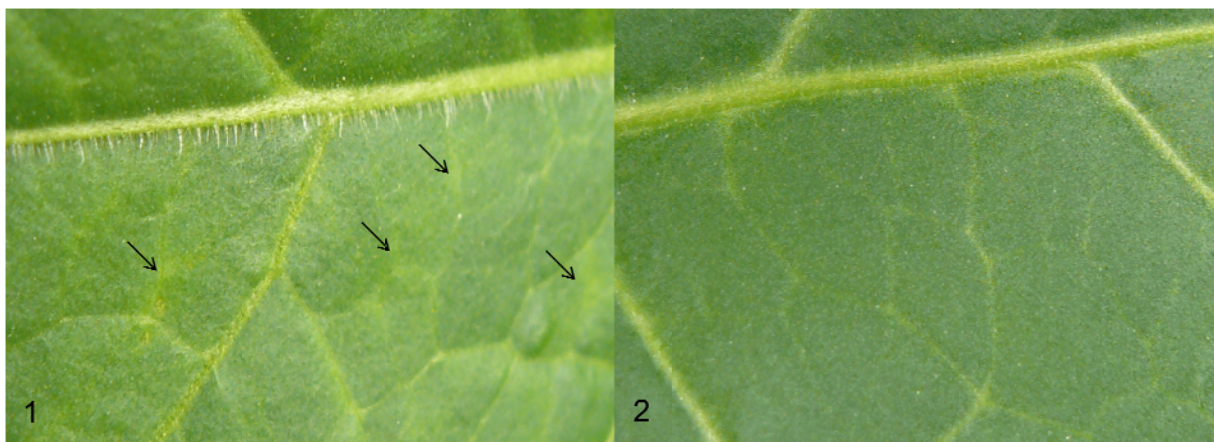


Abbildung 32: Symptome des infektiösen ASGV cDNA Vollängen Klons auf *Nicotiana occidentalis* 37B (1) Gezeigt wird ein mittels ATHV: pCBS35HDVpA_ASGV infiziertes Tabakblatt mit sehr schwachen Chlorosen die durch Pfeile markiert sind und zwischen dem 10 und 14 Tag nach der mechanischen Inokulation auftreten. Diese Chlorosen bildeten sich nach einigen Tagen wieder zurück und die Infektion war dann nur noch mittels PCR nachzuweisen. (2) Die Kontrollabreibung mit ATHV: pCBS35HDVpA führte zu keinen Symptomen.

pCBS35HDVpA_ASGV mit *Chenopodium quinoa* und Apfelsämlingen konnten keine Infektionen erzielt werden. Von den Pflanzen mit positivem Virusnachweis für ASPV und ASGV wurden 3 bis 4 Wochen nach der Agroinokulation Proben zur elektronenmikroskopischen Untersuchung entnommen. Filamentöse Viruspartikel wurden am Julius- Kühn Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik in Braunschweig

mittels ISEM unter Verwendung von ASPV- oder ASGV- Antiserum im Elektronenmikroskop nachgewiesen. Die Spezifität der Viruspartikel wurde durch Dekoration mit den jeweiligen Antiseren belegt (Abb. 33).

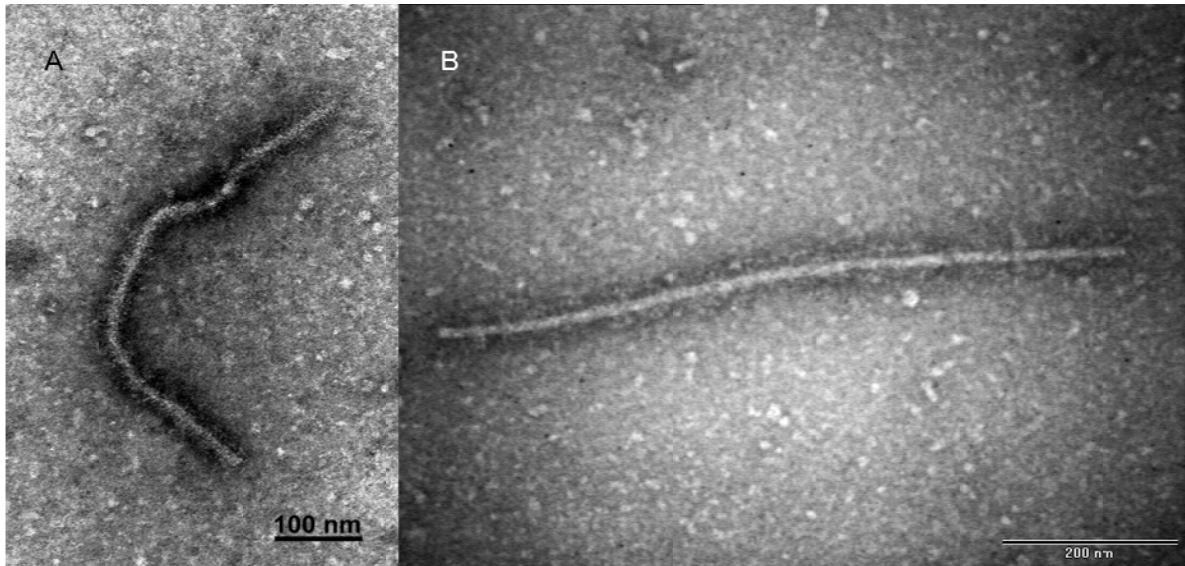


Abbildung 33: Elektronenmikroskopisches- Bild von Viruspartikeln aus mit CPEC- Produkten infizierten *Nicotiana occidentalis* 37B Gezeigt sind Viruspartikel aus einer mit dem CPEC- Produkt von ASGV (A) bzw. ASPV (B) inokulierten Tabakpflanze. Die Proben wurden 3-4 Wochen nach der Inokulation entnommen. Die Spezifität der Viruspartikel wurde durch Dekoration mit den jeweiligen Antiseren für ASGV und ASPV belegt. Foto: Christina Maaß, Julius Kühn Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

Von den getesteten Konstrukten konnten nur die durch die CPEC- Methode hergestellten pCBS35HDVpA_ASPV und pCBS35HDVpA_ASGV in Verbindung mit Agroinokulation *Nicotiana occidentalis* 37B Pflanzen infizieren. Die Infektionsraten lagen bei den ASPV cDNA Klonen bei nur 3 % und bei dem ASGV cDNA Klonen bei 22 %. Es konnte kein Apfelsämling mit diesen beiden Vollängen cDNA Klonen infiziert werden. Das durch Ligation entstandene Plasmid p1657_ASPV mit dem Anfang des Isolates PA66 konnte auch nach Umligation des Vollängen Konstruktes in einen pBin- Vektor keine Infektion mit ASPV bei verschiedenen Testpflanzen hervorrufen. Der durch die CPEC- Methode entstandene ASGV cDNA Klon in p1657 war ebenfalls nicht infektiös. Die verwendeten Kontrollen führten in keinem Fall zu Symptomen oder positiven PCR Ergebnissen.

4. Diskussion

Zum Nachweis von Apfelviren werden Bioindikatoren, ELISA oder verschiedene PCR- Methoden verwendet. Die Bioindikatoren sind meistens aufgrund der langen Versuchszeiten von 12 Wochen bis zu 3 Jahren eher ungeeignet um neues Sorten- oder Unterlagenmaterial zu überprüfen, und darüber hinaus lassen sich die hervorgerufenen Symptome nicht immer exakt einem Virus zuordnen (Kundu 2002; Menzel et al. 2003). In der routinemäßigen Kontrolle von Vermehrungsmaterial oder zur Überprüfung von verdächtigen Apfelbäumen in Obstanlagen werden häufig ELISA verwendet (Karešová and Paprštejn 2001; Kirby et al. 2001; Radaelli et al. 2006). Allerdings können auch dabei Probleme auftreten, da der Erfolg dieser Methode vom Virustiter und von funktionierenden Antikörpern abhängig ist (Kinard et al. 1996). Letzteres kann bei hoch variablen Viren wie ASPV, ASGV und ACLSV problematisch sein. Zusätzlich können sekundäre Pflanzenstoffe, wie Polysaccharide und phenolische Verbindungen zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen (Menzel et al. 2003). Verschiedene PCR Methoden wie die RT-PCR (James 1999), die Immunocapture PCR (Hilf 2008), die qPCR (Roussel et al. 2005) oder die Multiplex PCR (Menzel et al. 2002; Hassan et al. 2006; Ma et al. 2008) wurden entwickelt und werden heute zur Überprüfung von verdächtigem Material verwendet. Allerdings gibt es bei diesen Methoden ebenfalls eine Limitierung durch die Variabilität der Isolate, da es möglich ist das Primerpaare aufgrund von veränderten Primerbindestellen nicht binden können und somit nur eine begrenzte Anzahl von Isolaten detektiert werden (Paunović and Jevremović 2004; Mathioudakis et al. 2009; Komorowska et al. 2010). Beim Vergleich der drei Methoden zur Überprüfung und Bestimmung von Infektionsraten in bestehenden Obstanlagen wurde festgestellt, dass durch ELISA oftmals weniger Infektionen nachgewiesen werden, als durch Bioindikatoren oder PCR- Methoden (Kirby et al. 2001; Çaglayan et al. 2006; Paunović and Jevremović 2008; Lolić et al. 2010; Wang et al. 2011). Die PCR bietet zusätzlich den Vorteil der geringeren Zeitspanne bis zum Ergebnis gegenüber der Verwendung der Bioindikatoren.

In dieser Arbeit wurden für die Detektion der drei latenten Apfelviren ASPV, ASGV und ACLSV die von Menzel *et al.* (2002) beschriebenen Primerpaare verwendet (3.2; Tab. 6). Dabei konnte die Spezifität der einzelnen Primerpaare für die jeweiligen Viren bestätigt werden. Mit dem für ASPV verwendeten Primerpaar (ASPV-F-

8869/ASPV-R-9211) konnte jedoch das in dieser Arbeit verwendete ASPV Isolat Hannover nicht nachgewiesen werden. Anhand der Sequenz des Isolates PB66 (GenBank Accession No. KF321966) wurde ein Primerpaar abgeleitet, dessen Produkt den Bereich der ORFs 2 - 5 abdeckt. Das Primerpaar ASPV-F-6710/R-8040 (Tab.8) detektierte in der PCR nur die beiden Isolate PB66 und Hannover. Für das Isolat Hannover wurde ein spezifisches Primerpaar im mittleren Bereich des ersten ORF generiert, welches nur bei diesem Isolat eine Bande in der PCR hervorrief und somit zur Detektion dieses Isolates in Mischinfektionen genutzt werden könnte. Des Weiteren sollte ein Primerpaar entwickelt werden, das mindestens alle in dieser Arbeit verwendeten ASPV Isolate sicher nachweist, um damit die Möglichkeit zur Entwicklung einer qPCR zu haben. Diese sollte zur Überprüfung auf Infektion mit ASPV von Pflanzenmaterial das aus verschiedenen Herkünften kommt verwendet werden und im Weiteren zur Bestimmung des Virustiters innerhalb verschiedener Wirtspflanzen und Pflanzengewebe in Einzel- und Mischinfektionen genutzt werden. Die beiden abgeleiteten Primerpaare wiesen nicht alle in dieser Arbeit verwendeten Isolate nach und können somit nicht für die Entwicklung einer qPCR genutzt werden. Die Ergebnisse der PCR Reaktionen mit den verschiedenen Primerpaaren und verschiedenen ASPV Isolaten zeigen die hohe Variabilität der einzelnen ASPV Isolate und die damit verbundene Schwierigkeit ein zuverlässiges Nachweissystem für die Zertifizierung von Virus- freiem Material, wie Reisern und Unterlagen, für die Vermehrung und Produktion von Apfelbäumen zu generieren (3.2). Bei der Testung von veröffentlichten Primerpaaren durch verschiedene Arbeitsgruppen mit Isolaten aus unterschiedlichen Herkünften konnte ebenfalls eine Limitierung der Detektion aufgrund von Variabilität zwischen den Isolaten festgestellt werden (Mathioudakis et al. 2009; Komorowska et al. 2010).

Zur Ermittlung der Nachweisbarkeit des ASPV über den gesamten Jahresverlauf in verschiedenen Geweben in seit 20 Jahren sicher infizierten Apfelbäumen wurden insgesamt 180 Proben extrahiert und mittels PCR überprüft. Am sichersten ließ sich ASPV während der Monate Februar bis Mai in allen getesteten Geweben nachweisen (3.3). Diese Ergebnisse könnten sich durch das zu dieser Jahreszeit beginnende oder auftretende Wachstum des Apfelbaumes erklären lassen, weil sich dadurch auch die Verteilung des Virus ändern und ein Anstieg des Virustiters in den Geweben einsetzen könnte, wie es bei RNA Viren in Oliven beobachtet wurde

(Bertolini et al. 2003). An den 16 Extraktionszeitpunkten konnte nur in einer Probe im August in Blättern der Apfelsorte Cox kein ASPV nachgewiesen werden. In den Monaten August bis September waren im Testjahr nur schwach positive PCR-Nachweise von ASPV in fast allen Gewebeproben möglich. Dies könnte sich durch die hohen Temperaturen und die starke Sonneneinstrahlung während der Sommermonate erklären lassen, die dazu führen, dass der Virustiter stark absinkt. Dieses Phänomen kann aufgrund einer erhöhten Aktivität des pflanzlichen Abwehrsystems und geringerer Replikation des Virus bei heißen Temperaturen auftreten (Szittyá et al. 2003; Chellappan et al. 2005; Matic' et al. 2008). Besonders im Laub der Bäume findet dann eine Art *in-vitro* Thermotheapie statt, wie sie bei ASPV, ASGV und ACLSV angewendet wird um aus infiziertem Material in *in-vitro* Kultur wieder Virus- freies Pflanzenmaterial zu gewinnen (Paprštein et al. 2008; Tan et al. 2010). Im Versuch zur Nachweisbarkeit von ASPV über den gesamten Jahresverlauf in verschiedenen Apfelbaumgeweben erwies sich Phloem als zuverlässiges Nachweisgewebe, welches im Gegensatz zu Wurzelphloem und Blatt über das gesamte Jahr, beprobt werden kann (3.3; Tab. 27). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten anderer Arbeiten, die zur Entwicklung von zuverlässigen Nachweisverfahren verschiedene Apfelbaumgewebe getestet haben (Paunović and Jevremović 2004; Ma et al. 2008). Im Gegensatz dazu wurde in vielen anderen Arbeiten mit Blättern als Probenmaterial für den Nachweis von Apfelviren gearbeitet (Kinard et al. 1996; Malinowski et al. 1998; Kundu et al. 2003; Komorowska et al. 2010). Dies lässt sich durch die wesentlich einfachere Probengewinnung und die Verfügbarkeit bei jüngeren Versuchspflanzen erklären. Die Detektierbarkeit von ASPV in sämtlichen Geweben von Apfel, Birne und Quitte über ein ganzes Jahr mittels Nested- PCR wurde bereits gezeigt und dabei auf die Wichtigkeit der Bedingungen während des Zeitpunktes der Probenahme hingewiesen (Mathioudakis et al. 2009). Die Nachweisbarkeit von ASPV in verschiedenen Geweben über das gesamte Jahr wurde damit in verschiedenen holzigen Wirten mittels PCR bewiesen.

Außerhalb des Gewächshauses findet man häufig Mischinfektionen von diversen Viren in ökonomisch wichtigen Nutzpflanzen, wie zum Beispiel der Süßkartoffel und dem Apfel (Murphy and Bowen 2006; Kareem and Taiwo 2007; Untiveros et al. 2007; Malik et al. 2010; Wang et al. 2011). Dabei können zwei grundsätzliche Formen der Interaktion zwischen den einzelnen Viren auftreten. Zum einen eine synergistische Interaktion, die zu stärkeren Symptomen führt, als sie bei der Addition der einzelnen

Symptome auftreten würden (García-Cano et al. 2006) oder zum anderen eine antagonistische Interaktion die zur Verhinderung einer Infektion oder Ausprägung der Symptome eines an der Infektion beteiligten Virus führen kann (Ziebell and Carr 2010). Allerdings kann es auch zu einer Mischung der synergistischen und antagonistischen Interaktionen kommen, was dazu führt, dass die Folgen einer Mischinfektion schwer vorherzusagen sind (Syller 2012). Um die Auswirkung einer Mischinfektion von verschiedenen Apfelviren aufeinander und die Detektierbarkeit in ihrem holzigen Wirt Apfel zu untersuchen, wurden mittels Veredelung 68 Sämlinge mit Einfach-, Zweifach- oder Dreifachinfektionen inokuliert. Jede gesetzte Infektion wurde auf 4 Bäumen ausgeführt, wobei jeweils zwei Bäume zusätzlich den Indikator *Malus pumila* cv. Virginia crab oder *Malus sp.* Spy 227 trugen, die bereits 14 Tage vor der Infektion mit den Apfelviren auf die Sämlinge veredelt wurden. Die erste Probennahme erfolgte 8 Monate nach der Infektion. Für den Nachweis wurden Blätter als Extraktionsmaterial verwendet, da ansonsten aufgrund des Alters und der Größe der Bäume nicht genügend Material für die weiteren Extraktionen vorhanden gewesen wäre und der Versuch zur Nachweisbarkeit von ASPV über den gesamten Jahresverlauf gezeigt hat, dass das Blatt als Probenmaterial verwendet werden kann. Im ersten Jahr wurden die Bäume von April bis Oktober monatlich und in den beiden darauffolgenden Jahren im April beprobt. ASPV Bologna und ASGV Gambach wiesen keine 100 %ige Infektionsrate auf. Auffällig ist, dass es bei beiden Isolaten Mischinfektionsbäume sind die nicht infiziert wurden, während die Einzelinfektionen eine Infektionsrate von 100 % hatten (3.4; Tab. 29). Für ASPV Bologna und ASGV Gambach lassen sich die niedrigen Infektionsraten nicht genau erklären, als Ursache könnte eine nicht funktionierende Veredelung in Frage kommen. Durch die Verteilung der nicht infizierten Bäume der Isolate innerhalb des Mischinfektionsversuches lassen sich keine Rückschlüsse ziehen, ob es eventuell Cross- Protection oder ähnliche Phänomene zwischen den einzelnen Isolaten gibt. Deshalb ist für die nicht gelungenen Infektionen von einer Ursache bei der Veredelung auszugehen, obwohl im Vorfeld das verwendete Veredelungsmaterial für die Infektion getestet und die Veredelungen auf korrektes Anwachsen bonitiert wurden. Um weitere Hinweise auf Interaktionen zwischen den Viren erhalten zu können, hätte man die Änderung der verschiedenen Virustiter mittels qPCR bestimmen und bereits den Zeitraum zwischen Inokulation und dem ersten Probennahmezeitpunkt intensiv untersuchen müssen, um die Verteilung der Viren und die Entwicklung der Virustiter während der

Ausbreitung der Infektion im Apfelsämling ermitteln zu können. Die verwendeten Indikatoren konnten aufgrund von unklarer Symptomatik und zum Teil nicht funktionierender Veredelung nicht für eine Auswertung herangezogen werden. Die in der Mischinfektion verwendeten ASPV, ACLSV und ASGV Isolate wurden vorher auf ihre zuverlässige Detektion mit den Nachweisprimern überprüft. Die Extraktions- und PCR- Methoden wurden nicht verändert oder modifiziert, trotzdem gelang bei keinem Isolat ein durchgängiger Nachweis in allen infizierten Bäumen. Im August konnte nur das ASGV Isolat Gambach in 7 % der infizierten Bäume nachgewiesen werden. Dieses Isolat hatte während des gesamten Versuches eine niedrigere Nachweisrate, einzig der Juli mit 54 % war etwas besser (3.4; Tab. 28). Allerdings ließ sich dieses Isolat zu jedem Probennahmezeitpunkt in einigen Bäumen nachweisen, während bei den anderen Apfelviren mindestens in einem Monat kein Nachweis gelang. Da Blätter als Material für die Extraktionen im Mischinfektionsversuch verwendet wurde, erklärt sich dieses in den Sommermonaten Juli und August bei ASPV und ACLSV durch einen niedrigen Virustiter innerhalb des Extraktionsmaterials (Kundu 2003). Beide ACLSV- Isolate sind während dieser Monate nicht nachweisbar. Das Isolat P203 könnte auf diese Art *in vitro* Wärmetherapie empfindlicher reagieren, als das Isolat Uhl, da es auch im September und Oktober in keiner Probe nachweisbar war. Das ASPV Isolat Bologna wurde erst im zweiten Jahr des Versuches in über 80 % der infizierten Bäume nachgewiesen, als Ursache könnte die Veredelung eines Birnenauges auf die Apfelunterlage in Frage kommen. Das ASPV Isolat PB66 konnte an einem Probennahmezeitpunkt dem August nicht nachgewiesen werden, somit unterscheidet sich das Ergebnis dieses Versuches vom Ergebnis der Ermittlung der Nachweisbarkeit über das Jahr in dem ASPV PB66 durchgängig nachweisbar war. Allerdings wurde auch in dem Versuch im August nur ein schwach positiver Nachweis in der PCR für alle Gewebe erzielt (3.3). Bei den beprobten Bäumen im Jahresversuch handelte es sich außerdem um über 20 Jahre alte Bäume, die schon sehr lange infiziert sind. Die Bäume im Mischinfektionsversuch waren sehr jung und erst seit ein paar Monaten infiziert, was für eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der Wärmeeinwirkung sprechen könnte (Dahal et al. 1998; Matić et al. 2008). Die Ergebnisse für April und September untermauern die Ergebnisse der mechanischen Inokulation auf die experimentelle Wirtspflanze *Nicotiana occidentalis* 37B, die während dieser beiden Monate am sichersten funktionierte (3.1). Der Vergleich der Werte im April über den Zeitraum von 3 Jahren zeigte einen Anstieg in der

Nachweisbarkeit von ACLSV und ASGV, während es bei ASPV zu einem starken Abfall im letzten Testjahr kam. Dieser Abfall lässt sich nicht erklären, da für Aussagen über Interaktionen zwischen den Isolaten oder anderen Faktoren eine Probennahme zu wenige Daten liefert und die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass es Probleme während der Extraktion oder der PCR gab. Während des gesamten Testzeitraumes konnte an keinem Probennahmezeitpunkt ein Isolat zu 100 % nachgewiesen werden. Der PCR- Nachweis detektierte in diesem Versuch nicht in allen infizierten Bäumen an den verschiedenen Zeitpunkten zuverlässig die Apfelviren. An den Ergebnissen lässt sich ablesen, dass dies für alle Isolate zutrifft und auch für sämtliche Probenahmen. In der Literatur ist dieses Problem bereits für ACLSV Isolate beschrieben, die durch Bioindexing nachgewiesen wurden, aber nicht durch PCR mit spezifischen Primern (Silva et al. 2008) und führt zu Problemen für die Zertifizierung von Virus- freiem Material für die Vermehrung und Veredlung. Allerdings wurde in diesem Fall nicht nach EPPO Richtlinien gearbeitet, da die Versuche nicht in einem zertifizierten Labor durchgeführt wurden und deshalb ist es möglich, dass es an der Extraktions- oder PCR- Methode gelegen hat.

Im Freiland werden Mischinfektionen häufig durch Testung auf verschiedene Viren nachgewiesen (Çaglayan et al. 2006; Untiveros et al. 2007; Malik et al. 2010; Wang et al. 2011), während man diese im Gewächshaus künstlich auf krautigen Wirten erzeugt, um die Auswirkungen und Mechanismen im experimentellen Wirt zu erforschen (Dietrich and Maiss 2003; Murphy and Bowen 2006). Die Isolate der verwendeten Apfelviren ASPV und ASGV wurden mittels mechanischer Inokulation von ihren holzigen Wirten Apfel oder Birne auf den krautigen experimentellen Wirt *Nicotiana occidentalis* 37B übertragen, mit dem Ziel, über das gesamte Jahr Pflanzenmaterial mit hohem Virustiter für Versuche zur Verfügung zu haben (2.2.19.1.1). Ein weiterer Vorteil der krautigen Wirtspflanze ist der geringere Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen, wie beispielsweise Polysaccharide oder phenolische Verbindungen, welche die Extraktion und Nachweismethoden negativ beeinträchtigen können (Sipahioglu et al. 2006). Dabei stellte sich heraus, dass die mechanische Inokulation mit gemörsertem jungem Blattmaterial am besten in den Monaten April und September funktionierte, während zwischen Juni und August mit diesem Material keine Übertragung erzielt werden konnte. Für ASPV und ASGV ist die Übertragung mittels mechanischer Inokulation auf verschiedene krautige Pflanzen bereits lange bekannt (Koganezawa and Yanase 1990; Magome et al.

1997); allerdings kann die Übertragung durch niedrige Virustiter oder sekundäre Pflanzenstoffe innerhalb des verwendeten Materials bei ASPV problematisch sein (Koganezawa and Yanase 1990; Martelli et al. 2007). Der Übertragungserfolg in April und September könnte sich durch die passenden, weil moderaten Temperaturen und die Vegetationsphase erklären. Dahingegen kommt es in den Sommermonaten Juni bis August zu einem starken Absinken des Virustiters, was durch die hohen Temperaturen und die Sonneneinstrahlung verursacht wird, die quasi wie eine *in vitro* Wärmetherapie wirken (Paprštein et al. 2007; Paprštein et al. 2008). Zusätzlich tritt bei heißen Temperaturen eine erhöhte Aktivität des pflanzlichen Abwehrsystems und eine geringere Replikation des Virus auf (Szittyta et al. 2003; Chellappan et al. 2005; Matić et al. 2008). Dies lässt sich ebenfalls durch die Ergebnisse der beiden Nachweisversuche im Freiland als Ursache annehmen. Die Zeit zwischen mechanischer Inokulation und dem Auftreten erster Symptome liegt bei der Übertragung von holzigen auf krautigen Wirt mit den verwendeten Isolaten bei 2 - 4 Wochen. Bei anderen untersuchten Isolaten dauert es hingegen nur 2 Wochen bis zur ersten Symptomausprägung (Kundu et al. 2006); dieser Unterschied könnte auf den Virustiter zum Zeitpunkt der Probennahme oder dem zur Inokulation verwendeten Material zurückgeführt werden.

Bei der Übertragung von Tabak auf Tabak verkürzt sich die Latenzzeit auf 10 - 14 Tage, was einerseits durch die höhere Konzentration des Virus im Tabak zu erklären sein könnte und zusätzlich durch den geringeren Anteil an phenolischen Verbindungen im Tabak gegenüber dem Apfel als Infektionsmaterial. Die durch die vier verwendeten ASPV Isolate hervorgerufenen Symptome reichten von leichten Chlorosen bis zu starken Nekrosen. Von anderen Isolaten sind Symptome wie Adernvergilbung und Nekrosen bekannt (Koganezawa and Yanase 1990; Kundu et al. 2006). Die unterschiedliche Symptomausprägung der vier Isolate lässt auf einen großen Unterschied in der Sequenz schließen, wie er für verschiedene ASPV Isolate typisch ist (Schwarz and Jelkmann 1998; Komorowska et al. 2011; Liu et al. 2012). Das verwendete ASGV Isolat Gambach rief nach der mechanischen Inokulation auf dem experimentellen Wirt *Nicotiana occidentalis* 37B leichte Chlorosen auf den Blättern hervor, die sich nach ein paar Tagen wieder zurückbildeten. Die weiteren Symptome waren verschmälerte Blattspreiten und ein gestauchtes Wachstum der gesamten Pflanze, welche während der Folgeabreibungen im Zeitraum von 1,5 Jahren von Tabak auf Tabak immer stärker in ihrer Ausprägung wurden, bevor sie in

der weiteren Erhaltung über 2 Jahre in ihrer Ausprägung gleichblieben. Für die Verstärkung der Symptome gibt es verschiedene Gründe. Zum einen kann sie durch die Erhöhung des Virustiters innerhalb des Infektionsmaterials für die mechanische Inokulation hervorgerufen werden. Außerdem kann sich das Virus an die experimentellen Wirte anpassen, indem sich eine der Sequenzvarianten, die in der natürlichen Population der Wirtspflanze vorhanden sind, durch bessere Anpassung durchsetzt (Domingo 2002; Yoshikawa 2009). Das führt dann zu stärker ausgeprägten Symptomen, die spezifisch für diese Sequenzvariante sind. Die im Mischinfektionsversuch verwendeten Apfelviren wurden auf den experimentellen Wirt *Nicotiana occidentalis* 37B übertragen und dann im Folgenden für Zwei- und Dreifachinfektionen in Tabak verwendet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Symptome der einzelnen an der Infektion beteiligten Viren verstärkt werden und es somit zu einem synergistischen Effekt gekommen sein könnte, wie er auch bei anderen Mischinfektionen beobachtet wurde (Murphy and Bowen 2006).

Für das Design von zuverlässigen Primern für den Nachweis von hochvariablen Viren wie dem ASPV ist es nötig möglichst viele Sequenzen von Isolaten aus verschiedenen Herkünften zu ermitteln, um einen konservierten Bereich für die Nachweisprimer zu finden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei ASPV Isolate sequenziert. Einmal das ASPV Isolat Hannover, welches ursprünglich im Mischinfektionsversuch verwendet werden sollte. Dieses Isolat lässt sich nicht mit den in unserem Labor üblichen Nachweisprimern (Menzel et al. 2002) nachweisen und wurde aufgrund dieser Tatsache komplett sequenziert. Zum anderen das ASPV Isolat PB66, welches für die Herstellung eines infektiösen Vollängen cDNA Klon verwendet werden sollte. Das Isolat PB66 (Genbank Accession No. KF321966) ist 9363 nt mit einem zusätzlichen Poly(A)- Schwanz groß, während das Isolat Hannover (Genbank Accession No. KF321967) mit 9324 nt und zusätzlichem Poly(A)- Schwanz 39 nt kleiner ist. Im Vergleich mit anderen Isolaten sind die Genome bis zu 100 nt größer, wie die anderen bis heute sequenzierten Isolate (Jelkmann 1994; Yoshikawa et al. 2001; Liu et al. 2012). Die Nukleotidsäuresequenzidentitäten der gesamten Genome zwischen den in dieser Arbeit verglichenen Isolaten PA66, PB66 und Hannover liegen zwischen 73,9 - 80,3 %, was im Vergleich mit Ergebnissen aus anderen Arbeiten die Identitäten von 70,2 - 92,5 % zwischen Isolaten aufzeigen im Rahmen liegt (Yoshikawa et al. 2001; Liu et al. 2012). Dies zeigt, dass ASPV Isolate aus unterschiedlichen Herkünften eine hohe

Sequenzvariabilität aufweisen und eine Sequenzidentität von 70 % bis über 90 % zwischen den einzelnen Isolaten auftreten kann. Beim Vergleich der Identitäten zwischen den Nukleotidsäuresequenzen und den Aminosäuresequenzen, der einzelnen in der Sequenz vorhandenen codierenden Bereiche fällt auf, dass der Wert der Identität der Aminosäuresequenz immer über dem Wert der Identität der Nukleotidsequenz liegt. Die abweichenden Nukleotide führen also in vielen Fällen zu keiner Änderung innerhalb der Aminosäuresequenz. In einigen Fällen gibt es bei ASPV Isolaten innerhalb eines Wirtes zusätzlich auftretende Sequenzvarianten, die sich in einzelnen Nukleotiden unterscheiden (Yoshikawa et al. 2001). Diese Sequenzvarianten ließen sich bei beiden sequenzierten Isolaten nachweisen. Beide Isolate zeigen den für das ASPV typischen Genomaufbau mit 5 ORF. Die nicht translatierten Bereiche zwischen den einzelnen ORFs sind hoch variabel und zeigen große Unterschiede in der Größe. Das durch den ersten ORF codierte Polyprotein, enthält konservierte Bereiche in der Aminosäuresequenz für sämtliche an der Replikation beteiligten Proteine und hat eine Größe von 247 kDa, was identisch mit dem ersten ORF der anderen sequenzierten Isolate ist (Jelkmann 1994; Yoshikawa et al. 2001; Liu et al. 2012). Die Identität der Aminosäuren zwischen den einzelnen Isolaten zeigt mit 69,3 – 90,5 % eine hohe Variabilität innerhalb des ersten ORF. Der Triple Gene Block wird von ORF 2 - 4 codiert und die einzelnen Proteine haben eine Größe von 25 kDa, 13 kDa und 7,5 – 8 kDa. Dabei zeigt ORF 2 eine sehr hohe Konserviertheit der Aminosäuren gegenüber den anderen ORF mit 92,9 bis 96 % Identität. Dies gilt ebenfalls für andere bereits sequenzierte Isolate (Yoshikawa et al. 2001; Liu et al. 2012). In den meisten phylogenetischen Untersuchungen wird die Aminosäuresequenz des Hüllproteins komplett oder zum Teil für den Stammbaum verwendet (Gadiou et al. 2010; Wu et al. 2010; Komorowska et al. 2011). Es wird durch den fünften ORF codiert und ist zwischen 42 und 48 kDa groß. Die Identität der Aminosäuresequenz zwischen den Isolaten PA66, PB66 und Hannover liegt zwischen 75,5 – 85,8 %. In weiteren Arbeiten werden Identitäten von 69,4 - 99,5 % genannt (Yoshikawa et al. 2001; Komorowska et al. 2011). Dies zeigt die hohe Variabilität des Hüllproteingens. Bei genauerer Betrachtung der Aminosäuresequenz des Hüllproteins kann man diese in zwei Bereiche unterteilen. Der Bereich am N'-terminalen Ende weist hohe Variabilität mit Deletionen und Insertionen zwischen den einzelnen Isolaten auf, während der C'- terminale Bereich stark konserviert ist (Schwarz and Jelkmann 1998; Wu et al. 2010). Die Isolate PB66 und Hannover

haben gegenüber dem Isolat PA66 eine 54 nt umfassende Deletion. Das Isolat Hannover hat zusätzlich noch eine 33 nt große Insertion im variablen N'-terminalen Bereich. Der Stammbaum, der auf der Grundlage der kompletten Aminosäuresequenz des Hüllproteins von 30 verschiedenen ASPV Isolaten erstellt wurde, zeigt eine Aufteilung in mehrere Gruppen, wie sie bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurde (Wu et al. 2010; Liu et al. 2012). Dabei gruppiert das Isolat PA 66 mit Isolaten, die aus Birne stammen, während das Isolat PB66 mit Apfelisolaten in einer Gruppe auftritt. Das Isolat Hannover gruppiert mit keinem anderen Isolat, sondern steht den Gruppen mit PA66 und PB66 gegenüber. Die Isolate KL 1, KL 2, KL 9 und Y2 aus China bilden ebenfalls eine weitere Gruppe, die den anderen gegenüber steht (Liu et al. 2012). In einem weiteren Ansatz werden die Isolate nach der Größe des Hüllproteingens in 3 Typen eingeteilt, wobei Typ 1 > 1200 nt, Typ 2 1185 - 1191 nt und Typ 3 <1180 nt groß ist (Wu et al. 2010). Die Isolate PA66 und Hannover gehören zum Typ 1, während das Isolat PB66 zum Typ 2 gehört. Beim Abgleich der Größe der Nukleotidsäuresequenz der einzelnen Isolate fällt auf, dass sowohl PA66 wie auch PB66 mit Isolaten in einer Gruppe im Stammbaum auftreten, die in den gleichen Größentyp eingeteilt werden. Einzig das Isolat Hannover fällt komplett aus dieser Einteilung heraus, da es im Stammbaum in eine eigene Gruppe ohne sehr nah verwandte Isolate eingeteilt wird. Das Isolat Hannover ist somit ein stark von den übrigen Sequenzen abweichendes ASPV Isolat, welches die hohe Variabilität der Sequenz, die zwischen den ASPV Isolaten auftreten kann, beispielhaft aufzeigt.

Zur Untersuchung der Ätiologie einer Viruserkrankung werden sehr häufig infektiöse Vollängen cDNA Klone verwendet. Diese ermöglichen die Erforschung von Funktionen von verschiedenen Genen innerhalb des Genoms, wie zum Beispiel der für die intra- und interzelluläre Bewegung benötigten Proteine. Außerdem lassen sich bei hochvariablen Viren, die zusätzlich noch in Sequenzvarianten im Wirt vorkommen, definierte singuläre Infektionen zur genauen Abklärung der Symptomatik und des Wirtsspektrums hervorrufen (Stephan et al. 2008). Zur Herstellung von infektiösen Vollängen cDNA Klonen werden verschiedene Strategien verwendet. Die klassische Herstellungsmethode ist die Ligationsstrategie, bei der der Vollängen cDNA Klon mit Hilfe von Restriktionsschnittstellen aus mehreren Genomfragmenten zusammengesetzt wird (Takahashi et al. 1997; Lamprecht and Jelkmann 1997; Gharsallah Chouchane et al. 2006; Stephan and Maiss 2006). Diese Methode sollte zur Generierung eines infektiösen Vollängen cDNA Klons des ASPV Isolates PB66

benutzt werden. Dazu wurde anhand der Sequenz des Isolates PA66 (Jelkmann 1994), dessen Sequenz bereits vollständig bekannt ist, eine Ligationsstrategie mit mehreren Fragmenten und spezifischen Restriktionsschnittstellen entwickelt. Bei der Amplifizierung der benötigten Fragmente für die Strategie zeigte sich jedoch durch fehlende Restriktionsschnittstellen und nicht funktionierende Primerpaare, dass die beiden Isolate einen hohen Sequenzunterschied aufweisen. Die anschließende Sequenzierung des Isolates PB66 bestätigte diese Annahme. Anhand der neuen Sequenz wurde eine neue Ligationsstrategie entwickelt, die das Genom in drei sich überlappende Fragmente unterteilt, die über spezifische Restriktionsschnittstellen zusammenligiert werden sollten. Für die Ligation wurden zwei Restriktionsschnittstellen aus dem Genom und eine aus dem Vektor p1657 verwendet. Dazu wurde über einen Primer ein Stück Sequenz des Vektor an das dritte Fragment angehängt, um die *RsrII* Schnittstelle in diesem Bereich verwenden zu können. Der verwendete Vektor p1657 enthält einen 35S Promotor vor der Insertionsstelle und eine HDVpA-Sequenz aus dem *Hepatitis Delta Virus* dahinter. Der 35S Promotor ermöglicht eine direkte mechanische Inokulation des entstehenden Vollängen cDNA Klons auf Versuchspflanzen ohne vorherige Linearisierung oder *in vitro* Transkription (Scholthof 1999). Die HDVpA-Sequenz hat die Funktion einer zusätzlichen Terminationssequenz. Im ersten Schritt wurde das erste Fragment über blunt- end Ligation in den mit *StuI* geschnittenen Vektor ligiert, damit zwischen dem 35S Promotor und dem Anfang der Sequenz keine Fremdnukleotide auftreten, da diese die Infektionsrate negativ beeinflussen oder sogar zu einer Infektionslosigkeit des Klons führen können (Janda et al. 1987; Boyer and Haenni 1994). Die anderen beiden Fragmente wurden in andere Vektoren zwischenkloniert und dann über gerichtete Klonierung in p1657 ligiert. Für die Fragmente E und F wurde eine gerichtete Ligation verwendet, um die Effizienz dieser Schritte zu erhöhen. Dies war besonders bei Fragment E notwendig, da es mit über 5 kb bereits eine Größe hatte, die bei blunt- end Ligationen zu Schwierigkeiten führen kann. Das entstandene Plasmid p1657_ASPV wurde sequenziert, um die Übergänge zwischen Vektor und Sequenz am 5'-Ende und 3'-Ende zu überprüfen. Dabei wurde festgestellt, dass der Klon 19 Basenaustausche gegenüber dem Ausgangsisolat PB66 hat, von denen 10 zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz geführt haben. Die Sequenzabweichungen liegen im Rahmen der bereits beschriebenen hohen Variabilität des ASPV und dürften sich somit nicht auf die Infektiosität des Klons auswirken

(Yoshikawa et al. 2001). Der größte Sequenzunterschied tritt am 5'-Ende auf, wo der Vollängen cDNA Klon die Sequenz des Isolates PA66 aufweist, anstatt die Sequenz des verwendeten Isolates PB66. Mit dem entstandenen Plasmid p1657_ASPV wurden Infektionsversuche in drei verschiedenen Versuchspflanzen durchgeführt. Dazu wurde es mit Hilfe von mechanischer Inokulation in verschiedenen Konzentrationen abgerieben, führte aber bei keinem Versuch zu Symptomen. Vollängen cDNA Klone können symptomlose Infektionen auslösen, deshalb wurden die Pflanzen ebenfalls mittels PCR und Westernblot auf eine Infektion untersucht (Spetz et al. 2008). Es konnte keine Infektion mit beiden Methoden nachgewiesen werden, somit kann eine symptomlose Infektion ausgeschlossen werden. Als weitere Ursache der nicht erfolgten Infizierung der Versuchspflanzen kann die mechanische Inokulation in Frage kommen, dies wurde bereits in anderen Arbeiten berichtet (Dagless et al. 1997; López-Moya and Garcia 2000). Deshalb wurde das Konstrukt mit dem 35S Promotor und der HDVpA-Sequenz in einen pBin-Vektor umligiert, um die Infektiosität des Konstrukts mittels Agroinokulation zu testen. Die Agroinokulation ist eine zuverlässige Methode zur Infektion von natürlichen und experimentellen Wirten mit generierten Vollängen cDNA Klonen von Pflanzenviren (Stephan and Maiss 2006; Wu et al. 2008). Allerdings führte auch die Agroinokulation mit pCB301N_ASPV zu keiner Infektion des experimentellen Wirtes *N. occidentalis* 37B. Als Ursache für die fehlende Infektiosität des durch die entwickelte Ligationsstrategie generierten ASPV Klons kommt das vertauschte 5'-Ende in Frage. Der Klon p1657_ASPV beginnt mit der Sequenz 'AATACGCA' des Isolates PA66 während das Isolat PB66 'GGATACGCA' besitzt. Es fehlt das erste Guanin und an Position 2 wurde aus dem Guanin ein Adenin. Diese Änderung am 5'-Ende könnte der Grund für die Infektionslosigkeit des Konstrukts sein, da sie sich ähnlich wie zusätzliche Fremdnukleotide am 5'-Ende auswirken könnte.

Die Herstellung von Vollängen cDNA Klonen durch die Ligationsstrategie ist zeitaufwendig und kann mit Schwierigkeiten verbunden sein, die sich aufgrund von Sequenzvariabilitäten ergeben. Für diese Methode benötigt man spezifische Restriktionsschnittstellen um die einzelnen Fragmente zusammen ligieren zu können, was eine genaue Kenntnis der Sequenz des verwendeten Virus voraussetzt. Viele Viren besitzen wie ASPV eine hoch variable Genomsequenz, weshalb sich die entwickelte Ligationsstrategie nicht für alle Isolate anwenden lässt (Yoshikawa 2009). Deshalb muss in den meisten Fällen zuerst das Genom des Virus sequenziert

werden, was zeit- und kostenintensiv ist. Anhand des ASPV sollte eine Alternative entwickelt werden, die weniger Zeit und Kosten in Anspruch nimmt. Deshalb wurde ein Vollängen PCR Protokoll für das ASPV Isolat PB66 entwickelt. Für diese Methode benötigt man die Sequenz des 5'- und 3'- Endes, um die Primer zu designen. Diese wurden mit Hilfe der RACE- PCR bestimmt. In der PCR mit einer Proof- reading Polymerase für große Amplifikate, in diesem Fall die Precisor High-Fidelity DNA Polymerase, wird die komplette Genomsequenz amplifiziert und kann anschließend für die Ligation in den Vektor benutzt werden. Mit Hilfe dieser Vollängen- PCR konnte das komplette ASPV Genom mit über 9 kb amplifiziert werden. Diese Methode wurde bereits zur Herstellung von anderen infektiösen Vollängen cDNA Klonen in verschiedenen Virusfamilien genutzt (Spetz et al. 2008; Rasmussen et al. 2009; Hasiów-Jaroszewska et al. 2009). Die generierten Amplifikate besitzen keinen A- Überhang und mussten somit blunt- end in den Vektor ligiert werden. Die Ligation des 9,3 kb großen Fragmentes gelang nicht. Die Ursachen hierfür könnten in der Größe des Fragmentes und in der PCR- Produktmenge, die in der Ligation eingesetzt werden konnte, zu suchen sein. Ähnliches wurde bei einem *Carlavirus*, dem 8,7 kb großem *Poplar mosaic virus* berichtet, dieses ließ sich ebenfalls nicht nach Vollängen PCR in den Vektor ligieren (Naylor et al. 2005). In anderen Strategien wurden in die Primer für die Vollängen PCR Restriktionsschnittstellen eingebaut, die eine Ligation des Amplifikats in den Vektor ermöglichen (Yoon et al. 2002; Rasmussen et al. 2009). Dieses war beim ASPV nicht möglich, da keine Fremdnukleotide zwischen dem Promotor des Vektor und dem Virusgenom eingeführt werden sollten, um die Infektiosität zu gewährleisten. Das PCR- Protokoll wurde ebenfalls auf das ASGV Isolat Gambach angewendet. Auch hier gelang die Amplifikation des 6,5 kb großen Genoms, allerdings konnte es nicht blunt- end in den Vektor ligiert werden, obwohl es ca. 3 kb kleiner ist wie das ASPV Genom. Auch hier könnte die Ursache in der Größe und der Menge des Amplifikats gewesen sein.

Als Abwandlung der Vollängen PCR wurde an den Forward Primer die Sequenz des T7 Promoters gehängt, wobei das letzte Guanin des Promotors gleichzeitig das erste Nukleotid der Virussequenz ist, da ab diesem Punkt transkribiert wird. Die *in vitro* Transkripte wurden in zwei Versuchsansätzen mittel mechanischer Inokulation auf *N. occidentalis* 37B abgerieben. In einem Ansatz wurde dem PCR- Gemisch Ribo m⁷ G Cap Analog zugegeben, da von beiden Viren bekannt ist, dass sie am 5'- Ende

gecappt sind (Adams 2009). Der Ansatz ohne Capping Reagenz führte bei beiden Viren zu keiner Infektion, während mit dem Ansatz mit Capping Reagenz bei beiden Viren eine Infektion der Versuchspflanzen gelang (3.6.2.1). Dieses Ergebnis konnte ebenfalls bei *in vitro* Transkripten eines Vollängen cDNA Klons mit T7 Promotor vom *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV) beobachtet werden (Yoon et al. 2001). Die Infektion wurde sowohl mittels PCR wie auch im Elektronenmikroskop durch mit spezifischen Antikörpern dekorierte filamentöse Partikel nachgewiesen. Bei ASGV konnte eine Infektionsrate von 83 % bei unverdünntem PCR- Ansatz und von 60 % bei 1:2 mit Abreibepuffer (krautig → krautig) verdünntem PCR- Ansatz erzielt werden. Diese Infektionsrate ist vergleichbar mit den 82 % Infektionsrate der *in vitro* Transkripte beim *Zuchini green mottle mosaic virus* (ZGMMV), welches ungefähr die gleiche Genomgröße hat und welche ebenfalls direkt ohne vorherige Klonierung generiert wurden (Yoon et al. 2002). Bei ASPV gelang dies nur bei 9,5 % der inokulierten Pflanzen, wenn man den Aufreinigungsschritt zwischen Vollängen- PCR und *in vitro* Transkription wegließ. Die Abreibung des verdünnten PCR- Ansatzes führte auch in diesem Fall zu keiner Infektion. Die Ursache für die Infektionslosigkeit der *in vitro* Transkription mit dem Aufreinigungsschritt bei ASPV könnte am hohen Verlust des PCR- Produktes im Aufreinigungsprozess liegen. Das Vollängen- PCR Produkt ist über 9 kb groß und konnte in der PCR, die Reverse Transkriptase PCR Produkte nutzt, die direkt aus infizierten Pflanzenmaterial gewonnen werden, nicht in ausreichender Menge hergestellt werden. Diese Tatsache führt auch bei nicht aufgereinigtem PCR- Produkt zu einer sehr niedrigen Infektionsrate bei Infektion mit dem T7 PCR Ansatz. Ein weiterer Grund für die schlechte Infektionsrate könnten T7 Transkripte sein, die nicht vollständig sind. Das bedeutet, dass die Sequenz nicht bis zum Ende transkribiert wird und diese dann nicht infektiös sind. Die Wahrscheinlichkeit für diese Transkriptionsabbrüche wird bei längeren Sequenzen, wie beim ASPV höher liegen, wie bei kürzeren Sequenzen. Im Vergleich dazu ist das ASGV Produkt ca. 3 kb kleiner und könnte somit weniger von den Transkriptionsabbrüchen betroffen sein. Zusätzlich konnte in der Vollängen PCR im Vergleich zur Produktmenge des ASPV eine ungefähr doppelt so große Menge an ASGV Vollängen PCR- Produkt generiert werden (3.6.2; Abb. 20). Außerdem lässt sich nicht ermitteln, wieviele der entstandenen T7 Transkripte einen Cap am 5'- Ende erhalten haben und somit infektiös sind (Bedoya and Daròs 2010). Als weiterer Punkt könnte ebenfalls die mechanische Inokulation als Infektionsmethode der Versuchspflanzen

eine Rolle spielen, weil diese nicht effizient genug ist, da die Dosis der in die Pflanzenzelle gelangten Transkripte aufgrund von RNA- Abbau innerhalb der Pflanzenzelle nicht ausreichen könnte, um eine Infektion auszulösen (Dagless et al. 1997). Außerdem sind die Verletzungen der Pflanzenzelle bei jeder mechanischen Inokulation unterschiedlich stark, was dazu führen kann, dass die Pflanzenzellen zu stark beschädigt worden sind und somit absterben ohne das der Infektionsprozess stattgefunden hat (López-Moya and Garcia 2000). Diese Faktoren könnten die niedrige Infektionsrate der ASPV T7 Transkripte erklären.

Infektiöse *in vitro* Transkripte wurden bereits von vielen Viren hergestellt, allerdings meistens durch Transkription des durch eine Ligationsstrategie hergestellten Vollängen cDNA Klons, dem ein T7 oder SP6 Promotor vorweg geschaltet ist (Rico and Hernández 2006; Spetz et al. 2008; Lee et al. 2011). In diesen Fällen wird das hergestellte Plasmid vor der *in vitro* Transkription linearisiert und ein Cap- Analog eingesetzt, um infektiöse *in vitro* Transkripte zu generieren (Stevens and Viganó 2007; Vives et al. 2008). Bei dieser Vorgehensweise kann man die eingesetzte Menge des PCR- Produktes in der *in vitro* Transkription genau bestimmen und gegebenenfalls erhöhen. Während bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode Material genutzt wird, welches auf direkt aus der Pflanze extrahierte Nukleinsäuren zurückgeht. Dadurch werden für die *in vitro* Transkription alle in der Pflanze vorkommenden Sequenzvarianten des Virus benutzt und nicht nur die durch eine Ligationsstrategie klonierte Variante. Zum anderen beweist dieses Experiment, das durch die Vollängen PCR infektiöse Vollängen cDNA Produkte generiert wurden (Yoon et al. 2002). Die Symptome der infizierten Pflanzen unterschieden sich in beiden Fällen von denen der nativen Infektion. Während bei den ASPV T7 Transkripten die hervorgerufenen Symptome stärker waren, zeigten sich bei ASGV schwache Chlorosen, die sich nach wenigen Tagen wieder zurückbildeten. Außerdem wurden die Symptome in beiden Fällen im Laufe von Folgeabreibungen über ein Jahr nicht stärker in ihrer Ausprägung. So kam es bei der Infektion mit ASGV T7 Transkripten zu keiner Stauchung der gesamten Pflanze und zu keiner Verschmälerung der Blattspreiten. Unterschiede in der Ausprägung der Symptome wurden bereits bei anderen Viren beobachtet (Zhu et al. 2006). Es wurde bei vielen Pflanzenviren gezeigt, dass Punktmutationen einen großen Einfluß auf Infektiösität, Symptomausprägung und den Wirtsbereich haben können (Brugidou et al. 1995; Kagiwada et al. 2005; Salvador et al. 2008). Da die T7 Transkripte von beiden Viren

nicht in ihrer Sequenz überprüft wurden und es eine Population mit Sequenzvarianten in der Wirtspflanze gibt (Yoshikawa 2009), läßt sich nicht genau sagen wie stark sich die Sequenzen zu der Sequenz des nativen Virus unterscheiden. Bei einem ASGV cDNA Klon reichte der Austausch einer Base um eine Änderung der Symptome hervorzurufen (Hirata et al. 2003). In diesem Fall waren die Symptome ebenfalls schwächer ausgeprägt und die infizierten Pflanzen zeigten kein gestauchtes Wachstum.

Als weitere Methode zur Herstellung eines infektiösen cDNA Vollängen Klons wurde die Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) Methode angewandt (Quan and Tian 2009). Dabei werden verschiedene Sequenzen durch spezifische überlappende Bereiche in der PCR fusioniert (3.6.3). Im Fall von ASPV und ASGV wurden die Vollängen PCR Produkte in einer PCR mit dem Vektor verbunden. Dazu wurden an die Primer für die Vollängen PCR Sequenzbereiche der verwendeten Vektoren p1657 und pCBS35HDVpA angehängt. Diese Bereiche sind für beide Vektoren identisch, da sie vor der Insertionsstelle einen 35S Promotor und dahinter die HDVpA- Sequenz besitzen. An den Forward Primer wurden 25 nt und an Reverse Primer 18 nt der Vektorsequenz gehängt (Tab. 13). Die entstehenden überlappenden Bereiche werden in der PCR als Primer für die Fusion verwendet, deshalb müssen nicht verwendete Primer aus den für die Fusions- PCR benötigten PCR Produkten entfernt werden. Im Falle von ASPV konnte mit dem Einsatz von RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase PCR Produkt als Template nicht ausreichend Vollängen PCR Produkt amplifiziert werden, um einen Klon mit der CPEC- Methode herzustellen. Genauso wie bei der T7- Transkription geht durch den in diesem Fall zwingend notwendigen Aufreinigungsschritt zu viel PCR Produkt verloren. Deshalb wurde im Weiteren das durch die Ligationsstrategie hergestellte Plasmid p1657 als Template verwendet, wobei der nicht korrekte Anfang durch den Forward Primer erfolgreich mutagenisiert wurde. Bei diesem PCR Ansatz konnte ausreichend Vollängen PCR Produkt generiert werden, welches in der Fusions- PCR mit dem pBin Vektor pCBS35HDVpA verbunden wurde. Mit dem pBin Vektor pCBS35HDVpA_ASPV wurden Agroiнокulationen auf *N. occidentalis* 37B durchgeführt, dabei gelang die Infektion von 3 % der inokulierten Versuchspflanzen (3.6.3; Tab. 35). Diese zeigten nach 2 - 3 Wochen leichte Chlorosen auf den Blättern, die denen durch das native Isolate PB66 hergerufenen Chlorosen sehr ähnlich waren. Der Zeitraum nach dem die Symptome nach der Infektion auftraten stimmt mit

Beobachtungen bei Vollängen cDNA Klonen von anderen Viren überein (Prüfer et al. 1995; Gharsallah Chouchane et al. 2006). Die mildere Ausprägung der Symptome bei Infektion durch einen cDNA Klon gegenüber der Infektion mit dem Wildtyp Isolat wurde bereits bei *Ribgrass mosaic virus* beobachtet (Zhu et al. 2006). Die niedrige Infektionsrate von 10 infizierten Pflanzen bei einer Gesamtzahl von 338 inokulierten Pflanzen steht allerdings im Widerspruch zu nahezu 100 % Infektionsraten bei Agroinokulations- oder Agroinfiltrationsversuchen mit cDNA Klonen anderer Viren (Lamprecht and Jelkmann 1997; Gharsallah Chouchane et al. 2006; Stephan and Maiss 2006; Bedoya and Daròs 2010). Ein Grund könnte die Methode der mechanischen Inokulation sein, da durch diese nicht das Zielgewebe innerhalb der Pflanze erreicht worden sein könnte. In vielen Arbeiten wird die Agroinfiltration mittels Spritze verwendet (Stephan and Maiss 2006). Für die Abreibungsversuche wurden drei Vollängen cDNA Klone verwendet, von denen einer zu keiner Infektion führte. Der zweite Klon wies eine Infektionsrate von 1,6 % auf. Der dritte Klon wies mit 7,6 % eine ähnliche Infektionsrate auf, wie die *in vitro* Transkripte. Niedrige Infektionsraten unter 10 % sind bei infektiösen Vollängen cDNA Klonen eher die Ausnahme. Als Grund für diese niedrige Infektionsrate könnte einer der bei der Sequenzierung des Plasmides p1657_ASPV festgestellten Basenaustausche in Frage kommen, da die verwendeten Klone eigentlich eine identische Sequenz mit diesem aufweisen sollten, bis auf das mutagenisierte 5'- Ende. Allerdings müsste man diese in weiteren Versuchen einzeln mutagenisieren und Infektionsversuche mit den Konstrukten durchführen um eine genaue Aussage treffen zu können. Außerdem wurde keiner der verwendeten Klone nochmals durch Sequenzierung überprüft und somit lassen sich weitere Änderungen in der Sequenz nicht ausschließen. Zwar gibt es in der Literatur Beispiele mit niedrigeren Infektionsraten, wie zum Beispiel bei einem Klon des *Oat blue dwarf virus* (OBDV) der Infektionsraten von 7 – 48 % aufwies, allerdings handelte es sich dabei um gecappte *in vitro* Transkripte (Edwards and Weiland 2010). Als weiterer Grund könnte eine niedrige Stabilität des pBin Vektors pCBS35HDVpA_ASPV in Frage kommen, wie sie bei anderen Viren beobachtet wurde (Yang et al. 1998; Ülper et al. 2008). Allerdings ließen sich hierfür durch PCR mit den Nachweisprimern keine Hinweise finden. Durch diese Nachweis PCR läßt sich nur ein kleiner Bereich der Sequenz überprüfen, deshalb ist es durchaus möglich, dass es zu Deletionen und Mutationen in anderen Bereichen während der Wachstumsphase der Agrobakterien gekommen ist. Um dieses zu überprüfen und

als Ursache annehmen zu können, müsste man die Plasmide reisolieren und komplett sequenzieren. Ein weiterer Optimierungsansatz wäre die Verwendung eines anderen Agrobakteriumstammes aus einer anderen Arbeit mit cDNA Klonen von Pflanzenviren, weil dadurch die Infektionsrate erhöht werden könnte (Yang et al. 1998; Stephan and Maiss 2006; Ülper et al. 2008).

Die CPEC- Methode wurde ebenfalls auf das ASGV Isolat Gambach angewandt. Dabei konnte mit dem Einsatz von RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase PCR Produkt als Template ein Vollängen cDNA Klon des ASGV in p1657 und pCBS35HDVpA generiert werden. Die mechanische Inokulation mit p1657_ASGV führte zu keiner Infektion der Wirtspflanzen. Auch die Überprüfung mittels PCR erbrachte negative Ergebnisse. Die Ursache der Infektionslosigkeit des Klons p1657_ASGV könnte in der Infektionsmethode zu suchen sein, da bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde, dass mechanische Inokulationen bei Konstrukten mit dem 35S Promotor nicht immer effizient sind, weil das Vollängen cDNA Konstrukt nicht in den Zellkern gelangt (Dagless et al. 1997; López-Moya and Garcia 2000). Die Agroinokulation mit dem pBin Vektor pCBS35HDVpA_ASGV führte zu einer Infektion in 22 % der Versuchspflanzen (3.6.3; Tab. 35). Der Tabak zeigte nach 2 - 4 Wochen die gleichen Symptome wie die mit *in vitro* ASGV Transkripten infizierten Tabake. Somit gab es auch in diesem Fall eine Abmilderung der Ausprägung der Symptome, wie sie für das *Ribgrass mosaic virus* beobachtet wurde (Zhu et al. 2006). Ein cDNA Klon eines ASGV Isolates aus Lilie führte ebenfalls zu schwächeren Symptomen ohne Stauchung der Pflanze. In diesem Fall konnte eine stille Punktmutation im ersten ORF als Ursache für die Symptomausprägung ausgemacht werden (Hirata et al. 2003). Die Infektion konnte mittels PCR und Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. Im EM zeigten sich filamentöse mit dem Antiserum für ASGV dekorierte Partikel. Auch bei diesem Vollängen cDNA Klon ist die Infektionsrate mit 22 % sehr niedrig im Vergleich zu anderen Arbeiten (Stephan and Maiss 2006; Bedoya and Daròs 2010). Allerdings wurden zwei voneinander unabhängige Klone für die Abreibungsversuche verwendet, von denen der eine Klon eine 50 % Infektionsrate aufwies, während der andere Klon nur 5 % der Versuchspflanzen infizierte. In der Sequenz der beiden Klone können sich verschiedene Mutationen befinden, die diese unterschiedlichen Infektionsraten auslösen. In verschiedenen Arbeiten wurden die Auswirkungen von Punktmutationen und Deletionen in cDNA Klonen von Pflanzenviren untersucht (Sit and AbouHaidar 1993; Kagiwada et al. 2005; Wen et al. 2011).

Zum Beispiel wurden durch cDNA Klone vom *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), in denen durch Mutationen Aminosäureaustausche eingeführt wurden, verschiedene Symptome auf Versuchspflanzen ausgelöst (Ichiki et al. 2009). Bei *Cucumber mosaic virus* (CMV) konnte mit Hilfe eines cDNA Klones und verschiedenen Mutationen innerhalb einer konservierten Domäne des Hüllproteins gezeigt werden, dass diese essentiell für die Übertragung durch Insekten ist (Liu et al. 2002). Mit verschiedenen Klonen des *Citrus exocortis viroid* (CEVd) konnte gezeigt werden, dass Sequenzunterschiede zu unterschiedlichen Akkumulations- und Replikationsraten und somit zu unterschiedlicher Pathogenität führen können (Hajeri et al. 2011). Zur genaueren Untersuchung der Gründe für die unterschiedliche Symptomausprägung und die niedrige Infektionsrate müsste man die cDNA Klone komplett sequenzieren und mit der Sequenz des als Ursprung verwendeten Isolates Gambach vergleichen. Der Vollängen cDNA Klon des ASGV mit 50 % Infektionsrate ist für weiterführende Arbeiten verwendbar. Um die Infektionsrate zu erhöhen könnte man die Infektionsmethode optimieren und die Agrobakterien in die Pflanze per Spritze infiltrieren (Stephan and Maiss 2006).

In dieser Arbeit ist es gelungen infektiöse Vollängen cDNA Klone des ASPV und ASGV herzustellen. Für die Herstellung wurden verschiedene Methoden verwendet, einmal die klassische Ligationsstrategie und zum zweiten die CPEC- Methode. Die Ligationsstrategie ist Grundlage für viele bereits hergestellte Vollängen cDNA Klone in den verschiedenen Virusfamilien (Scholthof 1999; Lin et al. 2002; Huang et al. 2005). Der durch Ligationsstrategie hergestellte Klon p1657_ASPV war nicht infektiös, was vermutlich an einem ausgetauschten 5'- Ende liegt. Die hohe Sequenzvariabilität von vielen Viren erschwert die Herstellung eines Vollängen cDNA Klons mittels Ligationsstrategie, da diese auf spezifischen Restriktionschnittstellen beruht und die Sequenz damit bekannt sein muss. Diese Methode ist somit sehr zeit- und kostenintensiv. Außerdem ist sie technisch sehr aufwendig und es kann zu Problemen durch Instabilität und Toxizität der Zwischen- und Endkonstrukte der Ligationsstrategie innerhalb von Bakterien kommen (Yang et al. 1998; Ülper et al. 2008). Anhand des ASPV sollte eine Methode entwickelt werden, die sowohl die Kosten wie auch den zeitlichen Rahmen herabsenkt und bei Voraussetzung von konservierten 3'- und 5'- Enden das Problem von Variabilität der Sequenz umgeht bzw. löst. Dafür wurde ein Vollängen PCR Protokoll entwickelt mit dem sich die Genome des ASPV und ASGV in einer PCR komplett amplifizieren

lassen, diese PCR wurde bereits zur Herstellung von anderen Virusklonen genutzt (Spetz et al. 2008; Hasiów-Jaroszewska et al. 2009). Durch Vollängen PCR konnte kein cDNA Klon generiert werden, da sich diese großen cDNA Produkte nicht in den Vektor ligieren ließen, was bereits bei einem anderen *Carlavirus* beobachtet wurde (Naylor et al. 2005). Als Abwandlung wurde ein T7 Promotor an die Forward Primer der Vollängen PCR gehängt, um direkt *in vitro* Transkripte der Viruspopulation in der Pflanze amplifizieren zu können und diese auf ihre Infektivität zu testen. Dieses führte bei beiden Viren zu infektiösen *in vitro* Transkripten, wenn diese gecappt wurden. Dies wurde bereits mit anderen Viren erfolgreich durchgeführt (Yoon et al. 2002). Die Infektionsraten bei ASPV und ASGV unterschieden sich stark, wobei *in vitro* Transkripte von ASGV eine Infektionsrate von 83 % hatten, wie sie auch bei anderen Viren beobachtet werden konnte (Yoon et al. 2002; Lee et al. 2011). Die Infektionsrate von ASPV war mit 9,5 % sehr niedrig. Mit Hilfe der CPEC- Methode (Quan and Tian 2009) konnten von ASPV und ASGV infektiöse Vollängen cDNA Klone in einem pBin Vektor generiert werden, die für weitere Untersuchungen genutzt werden können. Beide weisen niedrige Infektionsraten auf, die im Gegensatz zu anderen mittels Agroinfektion übertragenden cDNA Klonen liegt, (Lamprecht and Jelkmann 1997; Gharsallah Chouchane et al. 2006; Stephan and Maiss 2006; Bedoya and Daròs 2010). Als Gründe könnten hier die Virus- Wirt- Kombination und die wenige Erfahrung in Bezug auf Vollängen cDNA Klone bei Fovea- und Capilloviren eine Rolle spielen. Auch bei anderen Virusgattungen wie zum Beispiel den Poty- oder Closteroviren treten häufiger Schwierigkeiten durch Genomgröße und die damit verbundene Instabilität des Konstruktes oder auftretende Toxizität des Klons innerhalb von Bakterienzellen auf (Yang et al. 1998; Ülper et al. 2008). Im Gegensatz dazu gibt es in den Gattungen *Tobamo*- und *Potexvirus* viele Viren von denen schon frühzeitig infektiöse cDNA Klone hergestellt wurden und die zum Beispiel wie das *Potato virus X* (PVX) und das *Tobacco mosaic virus* (TMV) heute häufig zur Produktion von Fremdproteinen in Pflanzen genutzt werden (Nagyová and Šubr 2007; Lico et al. 2008; Hefferon 2012). Vom ASPV dem Typvirus der Gattung *Foveavirus* ist dies der erste infektiöse Vollängen cDNA Klon unter der Kontrolle des 35S Promoters. Aus der Gattung *Foveavirus* gibt es einen infektiösen Klon des *Grapevine rupestris stem pitting virus* (GRSPaV) der über eine Ligationsstrategie hergestellt wurde (Meng et al. 2013). Im Unterschied zum hergestellten Klon des ASPV konnte dieser keinen experimentellen Wirt systemisch infizieren, war aber in

der Lage den natürlichen Wirt Wein zu infizieren. Es gibt bereits infektiöse Vollängen cDNA Klone des ASGV, einmal eines Isolates von Lilie, welcher über die Ligationsstrategie unter der Kontrolle eines 35S Promotors hergestellt wurde und eine Infektionsrate von 67 % aufwies (Terauchi et al. 1997). Und zum anderen ein cDNA Klon unter Kontrolle des T7 Promotor des *Citrus tatter leaf* verursachenden Isolates von ASGV (Magome et al. 1997). Dieser wurde ebenfalls über eine Ligationsstrategie hergestellt und es konnten infektiöse *in vitro* Transkripte generiert werden (Ohira et al. 1995). Die beiden in dieser Arbeit hergestellten Klone wurden über die CPEC- Methode generiert und zeigen dass diese für die Herstellung von cDNA Klonen von Viren über eine Vollängen PCR Strategie anwendbar ist. Die Vollängen PCR wurde in der Vergangenheit bereits zur Herstellung von cDNA Klonen von Viren verwendet (Yoon et al. 2002; Spetz et al. 2008; Rasmussen et al. 2009). Allerdings wurden dabei Restriktionsschnittstellen in die Primer eingebaut, um diese für eine Ligation in den Vektor zu verwenden (Yoon et al. 2002; Spetz et al. 2008). Durch das Einfügen dieser Restriktionsschnittstellen werden dem 5'- Ende des Virus Fremdnukleotide angefügt, die die Infektiösität herabsetzen oder zu keiner Infektiösität des Klones führen können (Boyer and Haenni 1994). Vollängen PCR Produkte von Pflanzenviren blunt- end zu ligieren, kann aufgrund der Größe der verwendeten Viren nicht erfolgreich sein (Naylor et al. 2005). Mit der CPEC Methode werden diese Probleme umgangen, da durch das Anfügen der Vektorsequenz an das 5'- und 3'- Ende des Virus der im Vektor enthaltene 35S Promotor direkt an das 5'- Ende des Virus anschließt und keine Fremdnukleotide zwischen Promotor und Virusanfang eingebaut werden. Zu dem werden durch die Fusions- PCR die Schwierigkeiten, die während der blunt- end Ligation von großen Fragmenten auftreten, umgangen. Die CPEC Methode ermöglicht eine weniger kosten- und zeitintensive Durchführung der Generierung von Vollängen cDNA Klonen, da Probleme durch Sequenzvariabilität und dadurch resultierende Sequenzierungskosten wegfallen. Außerdem umgeht sie die zeitaufwändige Ligationsstrategie, bei der aufgrund von Instabilität und Toxizität der Zwischenkonstrukte zusätzlich Probleme auftreten können (Yang et al. 1998; Ülper et al. 2008). Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die relativ hohe Konserviertheit der 5'- und 3'- Enden, die sich bei Alignments von verschiedenen ASPV Isolaten gezeigt hat, dadurch das mit einem Primerpaar Klone von verschiedenen Isolaten hergestellt werden können.

5. Literatur

- Adams, M. J. 2009. Flexiviruses. p. 176-182. *In* B. W. J. Mahy, and M. H. V. van Regenmortel (eds.) Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Academic Press, Oxford.
- Adams, M. J., J. F. Antoniow, M. Bar-Joseph, A. A. Brunt, T. Candresse, G. D. Foster, G. P. Martelli, R. G. Milne, and C. M. Fauquet. 2004. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol* 149:1045-1060.
- Angell, S. M. and D. C. Baulcombe. 1997. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus x RNA. *EMBO Journal* 16:3675-3684.
- Barone, M., D. Alioto, A. Ragozzino, and T. Candresse. 2008. Investigation on occurrence of Tricho-, Fovea- and Capilloviruses in ancient fruit tree cultivars in campania. Proceedings of the Twentieth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases:53-58.
- Beck, D. L., P. J. Guilford, D. M. Voot, M. T. Andersen, and R. L. Foster. 1991. Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* 183:695-702.
- Bedoya, L. C. and J. A. Daròs. 2010. Stability of Tobacco etch virus infectious clones in plasmid vectors. *Virus Research* 149:234-240.
- Bertolini, E., A. Olmos, M. M. López, and M. Cambra. 2003. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* 93:286-292.
- Birişik, N., A. Myrta, M. Hassan, and S. Baloğlu. 2008. A preliminary account on apple viruses in Mediterranean Region of Turkey. Proceedings of the Twentieth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases:125-130.
- Boyer, J.-C. and A.-L. Haenni. 1994. Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses. *Virology* 198:415-426.
- Brugidou, C., C. Holt, M. Ngon A Yassi, S. Zhang, R. Beachy, and C. Fauquet. 1995. Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of Rice yellow mottle virus and mutagenesis of the coat protein. *Virology* 206:108-115.
- Çaglayan, K., C. Serçe, M. Gazel, and W. Jelkmann. 2006. Detection of Four Apple Viruses by ELISA and RT-PCR Assays in Turkey. *Turk J Agric For* 30:241-246.
- Campbell, A. I. 1963. The effect of some latent virus infections on the growth and cropping of apples. *J.Hort.Sci.* 38:15-19.

- Candresse, T., M. Lanneau, F. Revers, G. Macquaire, S. German, J. Dunez, N. Grasseau, and T. Malinowski. 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Horticulturae* 386:136-147.
- Cembali, T., R. J. Folwell, P. Wandschneider, K. C. Eastwell, and W. E. Howell. 2003. Economic implications of a virus prevention program in deciduous fruits in the US. *Crop Protection* 22:1149-1156.
- Chellappan, P., R. Vanitharani, F. Ogbe, and C. M. Fauquet. 2005. Effect of temperature on gemini- induced RNA silencing in plants. *Plant Physiology* 138:1828-1841.
- Chen, A. Y. S., A. Pavitrin, and J. C. K. Ng. 2012. Agroinoculation of the cloned infectious cDNAs of *Lettuce chlorosis virus* results in systemic plant infection and production of whitefly transmissible virions. *Virus Research* 169:310-315.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497-3500.
- Cieślińska, M., A. Borisova, and B. Komorowska. 2007. Some Molecular Properties of Several Isolates of Apple chlorotic leaf spot virus from Bulgaria. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 15:125-131.
- Dagless, E. M., M. H. Shintaku, R. S. Nelson, and G. D. Foster. 1997. A CaMV 35S promoter driven cDNA clone of tobacco mosaic virus can infect host plant tissue despite being uninfecious when manually inoculated onto leaves. *Arch Virol* 142:183-191.
- Dahal, G., J. d. A. Hughes, G. Thottappilly, and B. E. L. Lockhart. 1998. Effect of temperature on symptom expression and reliability of Banana streak badnavirus detection in naturally infected Plantain and Banana (*Musa* spp.). *Plant Disease* 82:16-21.
- de Sequeira, O. A. 1967. Studies on a virus causing stem grooving and graft union abnormalities in Virginia Crab apple. *Ann.Appl.Biol.* 60:59-66.
- Dietrich, C. and E. Maiss. 2003. Fluorescent labeling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of General Virology* 84:2871-2876.
- Domingo, E. 2002. Quasispecies Theory in Virology. *Journal of Virology* 76:463-465.
- Edwards, M. C. and J. J. Weiland. 2010. First infectious clone of the propagatively transmitted Oat blue dwarf virus. *Archives of Virology* 155:463-470.
- Froussard, P. 1992. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Research* 20:2900.
- Gadiou, S., J. K. Kundu, S. Paunović, P. Garcia-Diez, B. Komorowska, A. Gospodaryk, A. Handa, S. Massart, N. Birisik, P. D. Takur, and V. Polischuk.

2010. Genetic Diversity of Flexiviruses Infecting Pome Fruit Trees. *Journal of Plant Pathology* 92:685-691.
- García-Cano, E., R. O. Resende, R. Fernández- Muñoz, and E. Moriones. 2006. Synergistic interactions between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* 96:1263-1269.
- Gentit, P., X. Foissac, L. Svanella-Dumas, M. Peypelut, G. Macquaire, and T. Candresse. 2001. Biological properties and partial molecular characterisation of two Foveaviruses associated with similar disorders of Cherry trees. p. 161-168. *Acta Hort.*
- German, S., T. Candresse, M. Lanneau, J. C. Huet, J. C. Pernollet, and J. Dunez. 1990. Nucleotide sequence and genome organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology* 179:104-112.
- German-Retana, S., B. Bergey, R. P. Delbos, T. Candresse, and J. Dunez. 1997. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot Trichovirus. *Archives of Virology* 142:833-841.
- Gharsallah Chouchane, S., F. Gorsane, M. K. Nakhla, D. P. Maxwell, M. Marrakchi, and H. Fakhfakh. 2006. Complete Nucleotide Sequence and Construction of an Infectious Clone of a Tunisian Isolate of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*. *J.Phytopathology* 154:626-631.
- Hajeri, S., C. Ramadugu, K. Manjunath, J. Ng, R. Lee, and G. Vidalakis. 2011. In vivo generated Citrus exocortis viroid progeny variants display a range of phenotypes with altered levels of replication, systemic accumulation and pathogenicity. *Virology* 417:400-409.
- Hasiow-Jaroszewska, B., N. Borodynko, and H. Pospieszny. 2009. Infectious RNA transcripts derived from cloned cDNA of a pepino mosaic virus isolate. *Archives of Virology* 154:853-856.
- Hassan, M., J. Polák, and F. Paprštejn. 2008. Detection and distribution of four pome fruit viruses in germplasm collection in the Czech Republic. *Proceedings of the Twentieth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases*:113-118.
- Hassan, M., A. Myrta, and J. Polák. 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 133:124-129.
- Hefferon, K. L. 2012. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology* 433:1-6.
- Herzog, E., O. Hemmer, S. Hauser, G. Meyer, S. Bouzoubaa, and C. Frisch. 1998. Identification of genes involved in replication and movement of peanut clump virus. *Virology* 248:312-322.

- Hilf, M. E. 2008. An immunocapture RT-PCR procedure using Apple stem grooving virus antibodies facilitates analysis of citrus tatter leaf virus from the original Meyer lemon host. *Plant Disease* 92:746-750.
- Hirata, H., X. Lu, Y. Yamaji, S. Kagiwada, M. Ugaki, and S. Namba. 2003. A single silent substitution in the genome of *Apple stem grooving virus* causes symptom attenuation. *Journal of General Virology* 84:2579-2583.
- Holzberg, S., P. Brosio, C. Gross, and G. P. Pogue. 2002. *Barley stripe mosaic virus*-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J.* 30:1-13.
- Hood, E., G. Helmer, R. Fraley, and M. Chilton. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J.Bacteriol.* 168:1291-1301.
- Huang, F. F., F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2005. Construction and characterization of infectious cDNA clones of a chicken strain of hepatitis E virus (HEV), avian HEV. *Journal of General Virology* 86:2585-2593.
- Huang, Y., G. Wang, and N. Hong. 2011. Study on the molecular characteristics of partial sequence from different sources isolates of apple stem grooving virus. *Xinjiang Agricultural Sciences* 48:247-251.
- Ichiki, T. U., E. N. Nagaoka, K. Hagiwara, T. Sasaya, and T. Omura. 2009. A single residue in the 126-kDa protein of pepper mild mottle virus controls the severity of symptoms on infected green bell pepper plants. *Arch Virol* 154:489-493.
- Inouye, N., T. Maeda, and K. Mitsuhashi. 1979. Citrus tatter leaf virus isolated from lily. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 45:712-720.
- James, D. 2008. *Apple stem grooving virus*. p. 37-53. In G. P. Rao, A. Myrta, and K.-S. Ling (eds.) *Characterization, Diagnosis & Management of plant Viruses Vol. 2: Horticultural Crops*. Studium Press LLC, Texas, USA.
- James, D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods* 83:1-9.
- Janda, M., R. French, and P. Ahlquist. 1987. High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on transcript infectivity. *Virology* 158:259-262.
- Jelkmann, W. 1997. Apple stem pitting virus. p. 133-142. *Filamentous viruses of woody plants*.
- Jelkmann, W. and S. Paunović. 2011. *Apple stem pitting virus*. p. 35-40. In A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, and W. Jelkmann (eds.) *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Jelkmann, W. 1994. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses. *Journal of General Virology* 75:1535-1542.

- Jeske, H., D. Gotthardt, and S. Kober. 2010. In planta cloning of geminiviral DNA: The true *Sida micrantha* mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 163:301-308.
- Johansen, E. 1996. Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 93:12400-12405.
- Kagiwada, S., Y. Yamaji, K. Komatsu, S. Takahashi, T. Mori, H. Hirata, M. Suzuki, M. Ugaki, and S. Namba. 2005. A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the *Potato virus X* genome determines the symptoms in *Nicotiana* plants. *Virus Research* 110:177-182.
- Kareem, K. T. and M. A. Taiwo. 2007. Interactions of viruses in cowpea: effects on growth and yield parameters. *Viol.J.*
- Karešová, R. and F. Paprštejn. 2001. *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* in germplasm collection of fruit species. p. 259-264. *In* M. F. Clark (ed.) *Acta Hort.*
- Kinard, G. R., S. W. Scott, and O. W. Barnett. 1996. Detection of Apple Chlorotic Leaf Spot and Apple Stem Grooving Viruses Using RT-PCR. *Plant Disease* 80:616-621.
- Kirby, M. J., C. M. Guise, and A. N. Adams. 2001. Comparison of bioassays and laboratory assays for apple stem grooving virus. *Journal of Virological Methods* 93:167-173.
- Koganezawa, H. and H. Yanase. 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Disease* 74:610-614.
- Komori, T., T. Imayama, N. Kato, Y. Ishida, J. Ueki, and T. Komari. 2007. Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiology* 145:1155-1160.
- Komorowska, B., T. Malinowski, and L. Michalczyk. 2010. Evaluation of several RT-PCR primer pairs for the detection of Apple stem pitting virus. *Journal of Virological Methods* 168:242-247.
- Komorowska, B., P. Siedlecki, S. Kaczanowski, B. Hasiów-Jaroszewska, and T. Malinowski. 2011. Sequence diversity and potential recombination events in the coat protein gene of *Apple stem pitting virus*. *Virus Research*.
- Krizbai, L., I. Ember, M. Németh, M. Kölber, G. Pasquini, and F. Faggioli. 2001. Characterization of hungarian isolates of *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus*. p. 291-295. *In* M. F. Clark (ed.) *Acta Hort.*
- Kundu, J. K. 2002. The Application of RT-PCR Assay for the Detection of *Apple stem pitting virus* and *Apple stem grooving virus* in Four Apple Cultivars. *Plant Protect.Sci.* 38:13-17.
- Kundu, J. K. 2008. Detection, distribution and genetic diversities of Apple stem pitting virus and Apple stem grooving virus in the Czech Republic. *Proceedings of the*

Twentieth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases:135-142.

- Kundu, J. K. and N. Yoshikawa. 2008. *Apple stem pitting virus*. p. 1-15. In G. P. Rao, A. Myrta, and K.-S. Ling (eds.) *Characterization, Diagnosis & Management of plant Viruses Vol. 2: Horticultural Crops*. Studium Press LLC, Texas, USA.
- Kundu, J. K. 2003. The occurrence of *Apple stem pitting virus* and *Apple stem grooving virus* within field-grown apple cultivars evaluated by RT-PCR. *Plant Protect.Sci.* 39:88-92.
- Kundu, J. K., M. Ducháčová, and M. Jokeš. 2006. Cytopathology of *Apple stem pitting virus* in *Nicotiana occidentalis* L. *Biologia* 61:469-471.
- Kundu, J. K., J. Svobodá, and J. Polák. 2003. Detection of *Apple Stem Grooving Virus* in Different Tissues of Apple Trees throughout the Year. *Plant Protect.Sci.* 39:93-96.
- Lamprecht, S. and W. Jelkmann. 1997. Infectious cDNA clone used to identify strawberry mild yellow edge-associated potexvirus as causal agent of the disease. *Journal of General Virology* 78:2347-2353.
- Lapidot, M., G. Weil, L. Cohen, L. Segev, and V. Gaba. 2007. Biolistic inoculation of plants with *Tomato yellow leaf curl virus* DNA. *Journal of Virological Methods* 144:143-148.
- Lee, M. Y., Y. S. Song, and K. H. Ryu. 2011. Development of infectious transcripts from full-length and GFP-tagged cDNA clones of Pepper mottle virus and stable systemic expression of GFP in tobacco and pepper. *Virus Research* 155:487-494.
- Lico, C., Q. Chen, and L. Santi. 2008. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J.Cell.Physiol.* 216:366-377.
- Liebenberg, A., B. Moury, N. Sabath, R. Hell, A. Kappis, W. Jarausch, and T. Wetzel. 2012. Molecular evolution of the genomic RNA of Apple stem grooving capillovirus. *J Mol Evol* 75:92-101.
- Lin, S. S., R. F. Hou, and S. D. Yeh. 2002. Construction of in vitro and in vivo infectious transcripts of a Taiwan strain of Zucchini yellow mosaic virus. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 43:261-269.
- Liu, N., J. Niu, and Y. Zhao. 2012. Complete genomic sequence analyses of *Apple stem pitting virus* isolates from China. *Virus Genes* 44:124-130.
- Liu, S., X. He, G. Park, C. Josefsson, and K. L. Perry. 2002. A conserved capsid protein surface domain of *Cucumber mosaic virus* is essential for efficient aphid vector transmission. *Journal of Virology* 76:9756-9762.
- Lolić, B., S. Matić, G. Durić, M. Hassan, F. Di Serio, and A. Myrta. 2010. Pome fruit viruses in Bosnia and Herzegovina. p. 245-247. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops.

- López-Moya, J. J. and J. A. Garcia. 2000. Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Research* 68:99-107.
- Ma, B. G., J. X. Niu, M. Morley-Bunker, L. Z. Pan, H. P. Zhang, and L. X. Zhang. 2008. Detection of three pear viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of an internal control. *Australasian Plant Pathology* 37:117-122.
- Magome, H., N. Yoshikawa, T. Takahashi, T. Ito, and T. Miyakawa. 1997. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology* 87:389-396.
- Maiss, E., U. Timpe, A. Briske-Rode, D.-E. Lesemann, and R. Casper. 1992. Infectious *in vivo* transcripts of a plum pox potyvirus full-length cDNA clone containing the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *Journal of General Virology* 73:709-713.
- Malik, A. H., S. Mansoor, S. Iram, R. W. Briddon, and Y. Zafar. 2010. Severe disease of melon in north west frontier province is associated with simultaneous infection of two RNA viruses. *Pak.J.Bot.* 42:361-367.
- Malinowski, T., B. Komorowska, T. Golis, and B. Zawadzka. 1998. Detection of Apple stem pitting virus and Pear vein yellows virus using reverse Transcription - Polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae* 472:87-95.
- Martelli, G. P., M. J. Adams, J. F. Kreuze, and V. V. Dolja. 2007. Family *Flexiviridae*: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annu.Rev.Phytopathol.* 45:73-100.
- Mathioudakis, M., V. Maliogka, I. C. Dovas, I. S. Paunovic, and N. Katis, I. 2009. Reliable RT-PCR detection of Apple stem pitting virus in pome fruits and its association with quince fruit deformation disease. *Plant Pathology* 58:228-236.
- Mathioudakis, M. M., V. I. Maliogka, A. T. Katsiani, and N. I. Katis. 2010. Incidence and Molecular Variability of Apple Stem Pitting and Apple Chlorotic Leaf Spot Viruses in Apple and Pear Orchards in Greece. *Journal of Plant Pathology* 92:139-147.
- Matić, S., J. A. Sánchez- Navarro, B. Mandić, A. Myrta, and V. Pallás. 2008. Tracking three ilarviruses in stone fruit trees throughout the year by ELISA and tissue-printing hybridization. *Journal of Plant Pathology* 90:137-141.
- Meng, B., S. Venkataraman, C. Li, W. Wang, C. Dayan-Glick, and M. Mawassi. 2013. Construction and biological activities of the first infectious cDNA clones of the genus Foveavirus. *Virology* 435:453-462.
- Menzel, W., W. Jelkmann, and E. Maiss. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99:81-92.

- Menzel, W., V. Zahn, and E. Maiss. 2003. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. *Journal of Virological Methods* 110:153-157.
- Mink, G. I. 1989. Apple chlorotic leafspot. p. 8-19. *In* P. R. Friedlund (ed.) *Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders*. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University, Pullmann, WA.
- Mink, G. I. and J. R. Shay. 1959. Preliminary evaluation of some Russian apple varieties as indicators for apple viruses. *Plant Dis.Repr.(Supp.)* 254:13-17.
- Morozov, S. Yu. and A. G. Solovyev. 2003. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* 84:1351-1366.
- Morris, T. J. and J. A. Dodds. 1979. Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA from Virus-Infected Plant and Fungal Tissue. *Phytopathology* 69:854-858.
- Mühl, F. 1999. *Alte und neue Apfelsorten*, 3. erweiterte Auflage edition, München.
- Murphy, J. F. and K. L. Bowen. 2006. Synergistic disease in pepper caused by the mixed infection of *Cucumber mosaic virus* and *Pepper mottle virus*. *Phytopathology* 96:240-247.
- Nagyová, A. and Z. Šubr. 2007. Infectious full-length clones of plant viruses and their use for construction of viral vectors. *Acta Virologica* 51:223-237.
- Naylor, M., J. Reeves, J. I. Cooper, M.-L. Edwards, and H. Wang. 2005. Construction and properties of a gene-silencing vector based on poplar mosaic virus (genus *Carlavirus*). *Journal of Virological Methods* 124:27-36.
- Nemchinov, L., A. Hadidi, and F. Faggioli. 1998. PCR- Detection of apple stem pitting virus from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates. *Acta Horticulturae* 472:67-73.
- Niu, J. X., B. G. Ma, and X. Y. Han. 2008. *Apple Chlorotic leaf spot virus*. p. 17-36. *In* G. P. Rao, A. Myrta, and K.-S. Ling (eds.) *Characterization, Diagnosis & Management of plant Viruses Vol. 2: Horticultural Crops*. Studium Press LLC, Texas, USA.
- Ohira, K., S. Namba, M. Rozanov, T. Kusumi, and T. Tsuchizaki. 1995. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capillovirus: comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *Journal of General Virology* 76:2305-2309.
- Paduch-Cichal, E. and K. Tomala. 2007. Detection of Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and Apple stem grooving virus (ASGV) in different tissues of 'Mutsu' apple cultivar trees by ELISA. *Phytopathologia Polonica*:53-59.
- Paprštein, F., J. Sedlák, J. Polák, L. Svobodová, M. Hassan, and M. Bryxiova. 2008. Results of in vitro thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 94:347-352.

- Paprštein, F., J. Sedlák, P. Zeman, L. Svobodová, J. Polák, and M. Hassan. 2007. Preliminary results of *in vitro* chemotherapy of apple and pear. *Inovace pestovani ovocnych plodin*:29-35.
- Paunović, S. and D. Jevremović. 2004. *Apple Stem Pitting Virus* Detection from Dormant Pome Fruits by RT-PCR. *Acta Horticulturae* 657:45-49.
- Paunović, S. and D. Jevremović. 2008. Comparative results of detection of pome fruit viruses by different methods. *Proceedings of the Twentieth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases*:147-153.
- Pogue, G. P., J. A. Lindbo, S. J. Garger, and W. P. Fritzmaurice. 2002. Making an ally from an enemy: Plant virology and the new Agriculture. *Annu.Rev.of Phytopathol.* 40:45-74.
- Prüfer, D., C. Wipfscheibel, K. Richards, H. Guilley, H. Lecoq, and G. Jonard. 1995. Synthesis of A Full-Length Infectious Cdna Clone of Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virus and Its Use in Gene Exchange Experiments with Structural Proteins from Other Luteoviruses. *Virology* 214:150-158.
- Pûpola, N., I. Morocko-Bicevska, A. Kale, and A. Zeltins. 2011. Occurrence and Diversity of Pome Fruit Viruses in Apple and Pear Orchards in Latvia. *J.Phytopathology* 159:597-605.
- Qian, G. Z., L.-F. Liu, and G. G. Tang. 2006. A new section in *Malus* (Rosaceae) from China. *Ann.Bot.Fennici* 43:68-73.
- Quan, J. and J. Tian. 2009. Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways. *PLoS ONE* 4:e6641.
- Radaelli, P., O. Nickel, J. Schons, J. L. Aragão, and T. V. M. Fajardo. 2006. Diagnóstico Biológico e Molecular e Análise da Seqüência de Nucleotídeos do Gene da Proteína Capsial de um Isolado do *Apple stem pitting virus*. *Fitopatol.Bras.* 31:51-56.
- Rana, T., A. Negi, S. Dhir, T. Thockchom, V. Chandel, Y. Walia, R. M. Singh, R. Ram, V. Hallan, and A. Zaidi. 2011. Molecular diagnosis of apple virus and viroid pathogens from India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44.
- Rasmussen, T. B., I. Reimann, A. Uttental, I. Leifer, K. Depner, H. Schirrmeier, and M. Beer. 2009. Generation of recombinant pestivirus using a full-gemone amplification strategy. *Veterinary Microbiology*.
- Ratcliff, F., A. M. Martin- Hernandez, and D. C. Baulcombe. 2001. *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 25:237-245.
- Rico, P. and C. Hernández. 2006. Infectivity of *in vitro* transcripts from a full-length cDNA clone of *Pelargonium flower break virus* in an experimental and a natural host. *Journal of Plant Pathology* 88:103-106.

- Rodoni, B. C. and F. E. Constable. 2008. The incidence and strain variation of Apple stem grooving and Apple stem pitting viruses in Australian pome fruit. Proceedings of the Twentieth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases:167-174.
- Rott, M. E. and W. Jelkmann. 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 Plant pathology 107:411-420.
- Roussel, S., J. Kummert, M. Salmon, O. Dutrecq, and H. Jijakli. 2005. Development of RT-PCR assays using fluorogenic-3' minor groove binder DNA probes for detection of fruit tree viruses. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35:105-108.
- Rubino, L., M. Russo, A. De Stradis, and G. P. Martelli. 2012. Tepovirus, a novel genus in the family Betaflexiviridae. Arch Virol 157:1629-1633.
- Salvador, B., M. O. Delgadillo, P. Sáenz, J. A. Garcia, and C. Simón-Mateo. 2008. Identification of *Plum pox virus* Pathogenicity determinants in herbaceous and woody hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions 21:20-29.
- Sambrook, J. and D. W. Russel. 2006. The condensed protocols from molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Satoh, H., N. Yoshikawa, and T. Takahashi. 1999. Construction and Biolistic Inoculation of an Infectious cDNA Clone of Apple Chlorotic Leaf Spot Trichovirus. Ann.Phytopathol.Soc.Jpn. 65:301-304.
- Scholthof, H. B. 1999. Rapid delivery of foreign genes into plants by direct rub-inoculation with intact plasmid DNA of a Tomato bushy stunt virus gene vector. Journal of Virology 73:7823-7829.
- Scholthof, H. B., K.-B. G. Scholthof, and A. O. Jackson. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. Annu.Rev.of Phytopathol. 34:299-323.
- Schwarz, K. and W. Jelkmann. 1998. Detection and characterization of european Apple stem pitting virus sources form apple and pear by PCR and partial sequence analysis. Acta Horticulturae 472:75-85.
- Silva, F., O. Nickel, T. Fajardo, V, and A. Bogo. 2008. Biological multiple indexing and RT-PCR detection of latent viruses in apple plants. Tropical Plant Pathology 33:157-161.
- Sipahioglu, H. M., M. Usta, and M. Ocak. 2006. Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods. Journal of Virological Methods 137:120-124.
- Sit, T. L. and M. G. AbouHaidar. 1993. Infectious RNA transcripts derived from cloned cDNA of papaya mosaic virus: effect of mutations to the capsid and polymerase proteins. Journal of General Virology 74:1133-1140.

- Smith, W. W. 1954. Occurrence of stem pitting and necrosis in some body stocks for apple trees. *Proc.Amer.Hort.* 472:101-113.
- Spetz, C., R. Moe, and D. R. Blystad. 2008. Symptomless infectious cDNA clone of a Norwegian isolate of Poinsettia mosaic virus. *Archives of Virology* 153:1347-1351.
- Stephan, D., I. Moeller, A. Skoracka, F. Ehrig, and E. Maiss. 2008. Eriophyid mite transmission and host range of a Brome streak mosaic virus isolate derived from a full-length cDNA clone. *Archives of Virology* 153:181-185.
- Stephan, D. and E. Maiss. 2006. Biological properties of *Beet mild yellowing virus* derived from a full-length cDNA clone. *Journal of General Virology* 87:445-449.
- Stevens, M. and F. Viganó. 2007. Production of a full-length infectious GFP-tagged cDNA clone of *Beet mild yellowing virus* for the study of plant-polerovirus interaction. *Virus Genes* 34:215-221.
- Stouffer, R. F. 1989. Apple stem pitting. p. 138-144. *In* P. R. Friedlund (ed.) *Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders*. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University, Pullman, WA.
- Syller, J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* 13:204-216.
- Szittyá, G., D. Silhavy, A. Molnár, Z. Havelda, A. Lovas, L. Lakatos, Z. Bánfalvi, and J. Burgyán. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing- mediated defence by control of siRNA generation. *EMBO Journal* 22:633-640.
- Takahashi, Y., T. Takahashi, and I. Uyeda. 1997. A cDNA Clone to Clover Yellow Vein Potyvirus Genome is Highly Infectious. *Virus Genes* 14:235-243.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tan, R., L. Wang, N. Hong, and G. Wang. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:229-235.
- Terauchi, H., H. Magome, N. Yoshikawa, T. Takahashi, and N. Inouye. 1997. Construction of an Infectious cDNA Clone of the Apple Stem Grooving Capillovirus (Isolate Li-23) Genome Containing a Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA Promoter. *Ann.Phytopathol.Soc.Jpn.* 63:432-436.
- Ülper, L., I. Sarand, K. Rausalu, and A. Merits. 2008. Construction, properties and potential application of infectious plasmids containing Semlike Forest virus full-length cDNA with an inserted intron. *Journal of Virological Methods* 148:265-270.

- Untiveros, M., S. Fuentes, and L. F. Salazar. 2007. Synergistic interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (*Crinivirus*) and carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato. *Plant Disease* 91:669-676.
- Velasco, R., A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro, A. Kalyanaraman, P. Fontana, S. K. Bhatnagar, M. Troggio, D. Pruss, S. Salvi, M. Pindo, P. Baldi, S. Castelletti, M. Cavaiuolo, G. Coppola, F. Costa, V. Cova, A. Dal Ri, V. Goremykin, M. Komjanc, S. Longhi, P. Magnago, G. Malacarne, M. Malnoy, D. Micheletti, M. Moretto, M. Perazzolli, A. Si-Ammour, S. Vezzulli, E. Zini, G. Eldredge, L. M. Fitzgerald, N. Gutin, J. Lanchbury, T. Macalma, J. T. Mitchell, J. Reid, B. Wardell, C. Kodira, Z. Chen, B. Desany, F. Niazi, M. Palmer, T. Koepke, D. Jiwan, S. Schaeffer, V. Krishnan, C. Wu, V. T. Chu, S. T. King, J. Vick, Q. Tao, A. Mraz, A. Stormo, K. Stormo, R. Bogden, D. Ederle, A. Stella, A. Vecchietti, M. M. Kater, S. Masiero, P. Lasserre, Y. Lespinasse, A. C. Allan, V. Bus, D. Chagne, R. N. Crowhurst, A. P. Gleave, E. Lavezzo, J. A. Fawcett, S. Proost, P. Rouze, L. Sterck, S. Toppo, B. Lazzari, R. P. Hellens, C. E. Durel, A. Gutin, R. E. Bumgarner, S. E. Gardiner, M. Skolnick, M. Egholm, Y. Van de Peer, F. Salamini, and R. Viola. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus [times] domestica* Borkh.). *Nat Genet* 42:833-839.
- Vives, M., S. Martin, S. Ambros, A. Renovell, L. Navarro, J. Pina, P. Moreno, and J. Guerri. 2008. Development of a full-genome cDNA clone of Citrus leaf blotch virus and infection of citrus plants. *Molecular Plant Pathology* 9:787-797.
- Wang, L. P., N. Hong, S. Matić, A. Myrta, Y. S. Song, R. Michelutti, and G. P. Wang. 2011. Pome fruit viruses at the Canadian Clonal Genebank and molecular characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates. *Scientia Horticulturae* 130:665-671.
- Welsh, M. F. and F. A. van der Meer. 1989. Apple Stem grooving. p. 127-137. *In* P. R. Friedlund (ed.) *Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders*. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University, Pullman, WA.
- Wen, R.-H., M. A. Saghai Maroof, and M. R. Hajimorad. 2011. Amino acid changes in P3, and not the overlapping *pipo*- encoded protein, determine virulence of *Soybean mosaic virus* on functionally immune *Rsv1*- genotype soybean. *Molecular Plant Pathology* 12:799-807.
- Wu, C.-Y., Y.-C. Lai, N.-S. Lin, Y.-H. Hsu, H.-T. Tsai, J.-Y. Liao, and C.-C. Hu. 2008. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. *Journal of Virological Methods* 147:355-359.
- Wu, Z. B., H. M. Ku, C. C. Su, I. Z. Chen, and F. J. Jan. 2010. Molecular and Biological Characterization of An Isolate of Apple Stem Pitting Virus Causing Pear Vein Yellows Disease in Taiwan. *Journal of Plant Pathology* 92:721-728.
- Yang, S. J., F. Revers, S. Souche, H. Lot, O. Le Gall, T. Candresse, and J. Dunez. 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. *Arch Virol* 143:2443-2451.

- Yoon, J. Y., B. E. Min, J. K. Choi, and K. H. Ryu. 2002. Genome structure and production of biologically active in vitro transcripts of cucurbit-infecting *Zucchini green mottle mosaic virus*. *Phytopathology* 92:156-163.
- Yoon, J. Y., B. E. Min, S. H. Choi, and K. H. Ryu. 2001. Completion of nucleotide sequence and generation of highly infectious transcripts to cucurbits from full-length cDNA clone of *Kyuri green mottle mosaic virus*. *Arch Virol* 146:2085-2096.
- Yoshikawa, N. 2009. *Capillovirus, Foveavirus, Trichovirus, Vitivirus*. p. 131-139. In B. W. J. Mahy, and M. H. V. van Regenmortel (eds.) *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Academic Press, Oxford.
- Yoshikawa, N., H. Matsuda, Y. Oda, M. Isogai, and T. Takahashi. 2001. Genome Heterogeneity of Apple Stem Pitting Virus in apple trees. p. 285-290. In M. F. Clark (ed.) *Acta Hort*.
- Yoshikawa, N., E. Sasaki, M. Kato, and T. Takahashi. 1992. The nucleotide sequence of apple stem grooving capillovirus genome. *Virology* 191:98-105.
- Youssef, F., A. Marais, C. Faure, P. Gentit, and T. Candresse. 2011. Strategies to facilitate the development of uncloned or cloned infectious full-length viral cDNAs: *Apple chlorotic leaf spot virus* as a case study. *Virology Journal* 8:488.
- Zhu, H. Q., J. P. Chen, and S. Q. Yu. 2006. Construction of an infectious cDNA clone of *Ribgrass mosaic virus* Shanghai isolate and its modification to express an epitope of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Virol* 151:1853-1861.
- Ziebell, H. and J. P. Carr. 2010. Cross protection: a century of mystery. *Adv. Virus Res.* 76:211-264.

6. Anhang

6.1 Nukleotidsäuresequenz des ASPV cDNA Vollängen Klonen

p1657_ASPV

AATACGCAAAACAAACTCTGAACAAGTAAATTATAAAGGCAACCTCATAATTTACTCGAAATGGCTCTTCTATCAAGAACT 80
GCCGCAGAGGAAGTAATCGCATCATTCACTTCTGAGGAACAGTCTCGGATTTCAACCCAAGCTGTGTTAGCCCTGACTAA 160
CGTAGAAAAGGACAAGCATGATCTTTTCAACTATGCGTTACCAGAGTTGGCAAAGATGAAGTTGTTTAAATCTGGGATTT 240
ACCTCAGCCCCACTCTACAGACCTCATTCCCATCCTGTGTGTAAGACGCTCGAGAATAATATCTTATTCAATATTCTG 320
CCTAGTTACTTAGATAAATCTTTCTATTTGGTTAGTATTAAGAAGAATAAAGTTGATTTTCTTAAGAGGAGGCACCCAGA 400
TCTGCAAAATGGTTGAGACCATCAATAGGTACATATCAAGTATTGACAAAACCTAGGTATGGCGGTTTCTCCATGTAGCC 480
CATCTAAAATAAGTGCCAAATCAAGTGTGACCGAAGAACTGGCTTTGAAAATGATGCATCCCTAGTTGATCTCATACCT 560
GGATGCATGGAGGGTGCAAGGAAGCGTTTCTTCTCCATGATGAACTGCATTACTGACTAAGGAGGCTTTAATTACGTT 640
TTTGGACCATGTAAGGCCAGAGGTGATGTTAGCATCAATTGTGTTTCCCCTGAAATTTCTGCTGGGGCTAAAGAGAGTC 720
TCAATCCCTGGTGCTACACTTTCAAAATCCTGGGTAAGGATCTGGTTTTCTCCAGACGGTGAGCAATCTGAGGCTTAC 800
ATTCAGCTGTTTCCGGTCTATTTATTTGAAGACTGGCAAATAACTACACCCTCAGGAGATGTCTTCCAATTGGATCT 880
ACTCAAAGCAGCTTTTCCCATCATCTCATCTCAATTACCAAGGGAGAAGCTATAGGCCAGAAAATGCGGTTCTTCAATG 960
GTTTCGAGGCTGTAGCTATGAAGGGCTTAACCCCTTAAGGAGGAAGGTAGAAAAGTTGCTTACCTATTTCAAAGCACT 1040
ATTTTGAAGATTATAGTACTTGAGAACTCTTAAGAAGCCTGACCTCAGTCGGCCATGGCAAAGTTGAGTCAAGTCTG 1120
TAAGACCCCAATGGTTACGAGATAAAGTTTTTTGAGGAGTTTTTCAAATTTGTGCCTCAAGTGTGAGACCTTAAATACAA 1200
ACATGCTGCCTGATATGAAGAGGATTGTTCAAGTTTCTTCCCTAAGCTATTTCAAATCCCATTGCTAGGAACCTCAA 1280
GTTGTTACAGCAGTTACACCTTGATAACTTCATAGAGACGCTGGAGGAGTTCAATTTCAAGTATCAGCACAGAGGACTTATC 1360
ATTGAACTGGAAGGATGACCTGGAATTTGTCAACTTGACCTTTGGGGATACCGATTTTAAATATGGAGGAATCTTTTGCTA 1440
GTGTGTGGGGCACACAGAAAGATGTGGTTGATATCACCCTGTGCATCACTCACCTTACATGGTCAGCAAGTTTGATTCC 1520
TATGATCATCAGTTCCACTCGCTTCTGAGCGTCAATTTACCACAGCACTAACCAAAATGCAAAGATAGTTTTATCTTT 1600
GTATGATCCATGTGTGGTTGAGCTTTCAAGTGTGAGGCTTCCAACCTGGCCGTCAATGTAATTATAGCGGCAAAT 1680
TGAGAGCTTGTGTTGCTGTAACGTATTTGTGGCAGACATTTGAGGGAATACTCCTCAGGGAGTGCCAGAAGgCACAGGGA 1760
AAAATGAGGAAGAAGTTCTACTTTGAGCTTGAATTAATGGTCTTGTGTTGTTGATGTTTTCGAATCAGTGGTTCCCTCC 1840
ACCATGTCGTGACGGGTTGATATCAAGATCAGTGTCTTTGATCAATTCATCAAAGGTTGTCAGCGTCACAATTCCTTTC 1920
ATAATGGGCGGATGGCTTTAAGACAGGTCTTTAGAACTTCAAGCTTCAGGCCCTCCTTGACGAATCAGAATTGTCCATC 2000
ATTCACATGGTTGAAATGGGAAAGCTTCAGAGGTTAAACCAGCTGCAGAGAATGAACAAAATTTAAATTCATTTCTCC 2080
TGAGATTATTCGGATCACACAGTTGGGTGCAATGTCTGTTCCATGTAATGCAACCTGAACTGTTTCATTCAGCAAGCAG 2160
ATGTGAGTTCTCTTCATGGCAACCTGGTTTTCTTCTGACTTCATAGGGGGGCTCGAGGGCGTGGAGCAAGTTTTTACTCG 2240
AGGGACTTTAAGGGATACAGCTACACAGGATTTAGTCACGTCTCAAGAGGCTGGCCTGATTTTTTGGATAAGTTCCCTCAG 2320
TGATAACAAAATTCACAAAATTTCTACAATCAGTGTTTGATACAGGAATACAGCACAGGACATGGTCTCTCCATGCACA 2400
AAGATGATGAGGGAATTTATGATATCAATCACCAAGTTCTGACGGTTAATTAATCTGGTGATGCTATCTTTTGCAATTGAA 2480
TGTTCTGGATCAGGTTTTGAGGTGCCGTGAGTGGTCTCAAATGCTCCTCATGCCCTTCGGGTTCAAAGAGAGCACAG 2560

GCATGGAATCAAATCACCTCAAAGGACGAATTTCTTAACGTTTCAGGTTGGCTAAGGAAGATGATCATCAGGTTCCAG 2640
TTCAGGAGGTTGTGGCCATCAGCATGGTGATTGATGATGACAGAGCAGCTTTGAAACAAATGGAAACAGAATGCCGCCCTT 2720
TACGGGGGAAAACCTCTTCTGATTCTGGTGGGCAAAATAGGGAAAAGGTCACCTGGGGATCCATGTGGAAGCGCACCTGT 2800
TCAAGAGTTTCTGATCCAGATTGATTCATCAATTCTCGAATATGCATTAAGAGTCTGCCTGGACTGTCTAAAGATGTCTG 2880
TCAACTGCGATATGTGCCTGTGTAATAGCCCTGGCTCAAAAATGAGGaaTTAAAGTTTTTCAGAAGCTCTGAGGGATTTG 2960
GCATTTGCCCTCCGGGTTCAACCTACTGATCGATTTTCACTGGCGAAGGGTATAGAAGGCGTTAGGGGAATGAATAGAAT 3040
AATTAATGAGTTGCCGACTCATGTTTTTCCGCTCAGAGGCACTATGCATGTGGTTGATCTTGATGATAAGAGCATCAAAG 3120
GGGACATTAAGGAGGGCCTCTTTTCTGGATTTAGGAGATGGAAAATAACAAGTTGCTCCACGGATCTGATTGTGTGGCT 3200
TTCTTGAAGCCAAAATGACTCTAGGGGGTGGAGCTAAGGTCCCATGAAGATGAATGTGAACTTTCTGATCTCACTGAAAA 3280
ATTGCATGGGTGCTCAGTCATATTGAGTAGAAAATTTGAACCTGACCTTTTCCACTCCTTTGATGTTGAGGCAGATGGCA 3360
ATTGCTTTTGGCACTCTGTGGGACCATTAATAGGTGTTGATGGTGAATACTTGAAGAAGATTTTACATGATCAAGCCCTG 3440
AAAGATGGGGTCAAGTGTCCAAGATTGAGCAAACAACCTGAGGGGAGCACCTGGGCTGAAAGGGAAGCTGTGCCTACTT 3520
TTGTTCTCATTATGGAATACGACTGAATGTGCTCTACACTCGAGAAGAATGCACCTGGATATTCAAACCTCACGAAGTTC 3600
TTAAGGCTGCGACTCTTGTGTTGCCAGGACAATCACTTTAAGCCCTGCATGCCAGTCAATGGGTGCGTCATAAGGGCAATT 3680
GCCTCAGCTCTTAACCGTAGGGAGGTTGATGTTCTGGCTGTTTTGGGTAAACCTGCTCATGAAGATCTTTTCGAGGAAGT 3760
CGCAGAGGGTAGAGGCTTCAAGTATTTTGTATCTGACAAGGTTATTTGAAATATTCTCAATTTGTGGCAGTGTGGACACAG 3840
GTGGGGAATTAATATGTTCAACGAGAATGGAAAGATCCCTGCTGAATCTCTTTGGAGAAAGAACACCTGGCCACATA 3920
CCCCTCTTTCAAGGAGGAAATTTAGCCCAATTGTCTCAGATCTTAATAGAGTTTCAAATAGTGCAATGAGGTTCTTGGC 4000
CATTAACGGAGCTGAAATGATATAGGCCCTCAATTGATCGTGCATCAACTTTGCTTGACAGTTTTGAGCTAGGTGCTA 4080
CAGGTGTACTTTGTGTCAGGAATAAAGGAGGCGCAAAAAGGGTTGGCAGCCAAGCTTGTTCAGAGTCAGTTCATGATAGA 4160
AAATTAATAATGATTCTGGGAACATTTGGATGTGGGAAAAGTTCTCTCTTTAAGAAATTCATTGAGAAGTCCCCTGGAAA 4240
GGCGATAACTTTTGTCTCGCAAGGAGGTCACCTGCTGAGTCAATAAATCATGATCTAGGACTGCTCGTGTGGGGGAA 4320
AGAAGGCTGGCAAATGCAAAGACCTCAAAAATGTACGTGTCAAGACATTTGAGTTGTTTATTCTACATCTTGATAGCATT 4400
AAGGAGGTCACACTGTTGTCTATCGATGAGATTGAGCTATTTCCGCCCGCTACATAGATTTAATTATACTTGGGTTGAA 4480
TTTGAAAGTGAATATTATAATTGCCGGAGATCCATGCCAGAGTGATTATGACAGCAGTTCGGATCGGCACATCTTTGCGG 4560
GCAGTGAGAGTGACATCATGAGGATTTAGTGGCCGAAGTTACAAATCAACATCTTGAGTCAAAGGTTCCGGAATCCC 4640
GTCTTTTATGCGACAGTGCCTTGCAATCTCAATAAGACCAGATTGACCCTTGATGAGGAAGAGTACACACTCTGGGACAG 4720
CATACAGGAATTTTCAATGATGGGCCGCAAGGACTGCCAGTTGTGTTAGTTTCCAGCTTTGAAGAGAAAAAGATTGTGG 4800
CAGCCACCTGGGTTTAAAGATGAAGTGCATAACATACGGTGAATCAACAGGTTCTTAATTTCCAGAAAGGCGCAATCCTT 4880
GTGACTTATGAGAGTGCCTTGACTAGTGATAGAAGGTGGTGGACAGCCCTCTCGAGATTTAGCCATGATATTCAATTCAT 4960
TAATGGAATGGGCGTCACATGGGACAATGCCATAACTCATTTCGTTGGAAAGCCATTGCACAAATTTTTTACCAAGAGAG 5040
CTTGTAATGACGACATTAATTGATCTCCTGCCAGGGCGTCTGAGCTGATTGAGGGTTTTCAAAGTCAGGTTGGCGCAGAT 5120
GAAGGTGTGGGGAGGCAAAATTTGCCCGGAGATCCATGGCTAAAGACTAAGATTTTCTTGGACAGAGTGGGACGTAGA 5200
GCCTGAGTTACTTGATGAGGTGGAGGCAGCTGAAGATTGGTTCAAACCATATTCCAATAATGGGGTTGGAAGCCGTGA 5280
GAGCTCAGTGGGTGGATCGATTGATCTCGAGGGAAAGAGAATTCAGGATTGGGGACATGACTACTGAGCAATTCACT 5360
GATGAGCACAGTAAAAATCGAGGTCAGGAGTTAACCAATGCTGCTGAACGTTATGAGGCAATCTACCCAAAGGCATAAAG 5440
AACTGACACTGCAACCTTCTTATGGCAGTAAAGAAAAGATTGAGTTTTTCTCTCTCTGCTGCTGAGCATGCCAAGTTGA 5520

GAAGAGCCAGGCCCTTTGGCAAATTTCTTTTGAACACTTTCCTCAAGAGGGTGCCTCTAAATAGTAGGCACAATGAAGCA 5600
ATGATGAGTGATGCAGTTCATGCATTTGAGGAAAAGAACTGTCTAAGAGCATGGCCACAATTGAGAACCATTTCAGGGAG 5680
ATCTTGTGAGGACTGGCCGGTTGATAAAGCTTTGATCTTCATGAAGTCCCAACTCTGCACAAAATTTGACAATCGTTTTTA 5760
GGAGTGCAAAAAGCTGGTCAAACCTCTTGCTTGCCTTCAACATTTCAGTCCATGTAGATTGCCCCCTTATATGAGGTACATT 5840
GAGGCCAAGGTTGTTGAAGTGTTCGCAAGAATCTTTACATCCATTCTGGAAAAAACATTGAGGATCTGGCAGCTTGGGT 5920
GACGGTGAATAAATTCACGGAATCTGCACTGAGTCTGATTACGAAGCCTTTGATGCTTCGCAGGATCATTTTTATTCTAG 6000
CTTTTGAAGCTTGAGGTTATGAAGTTTTTGGGACTGCCTCCAGATCTTATTGCAGATTACACGTTTCATCAAGACGCATCTT 6080
GGTTCAAAACTTGGCAATTTTGCATAATGCGGTTTCACTGGTGAAGTACTTTCCTTTTCAATACAATGGCTAACAT 6160
GCTATTCACCTTTCTTAGGTATGATCTTAATGGAAAGGAAGCGATCTGCTTCGCTGGTGTATGATATGTGCGCAATTC 6240
GATTGAAGGTACCAATGTTTCATTCCAAGTTTCTAGACAAAATTAAGTTGAAGGCCAAGGTACAATTCAGTCCACCCCA 6320
ACTTTCTGTGGCTGGGGTCTGTGTGAGCATGGTGTCTTCAAGAAACCAGATCTTGTCTTAGAGAGGCTACAAAATTGCCAG 6400
AGAAACACGGAACCTTGAAAATTCATTGATAATATGCTATTGAGGTTTCTGCGCTTACAAGATGGGTGAAAACCTTGA 6480
GCCTGTATCTCACTCCGCAAGAAGTTGATGCACACTACAACCTGTGTGAGATTTATCGTGCAGCACAATCATCTCTGAAA 6560
TCTAACATTAGAGATCTATTGAGGGTGAAGCCTCCTTGAGTGTAAATTAATAATGTGGTGTTTTTAAATGTAGCTTTAT 6640
TTGTGAATGCTTTGATTGTTCTTAAGCTTTGAAGATAGGCAATGCAGTCAATTCGTATGTTTCTTTTCAGGTTGAGTT 6720
AGATCTTTCATTGTGCTTTAGGGGTCTGTTAGTAAGCGTATTAGGTTAAGCTATTGAGTGTAAATAATGGAACTGTGCT 6800
CAGTTTGTAAACGAATTTGGCTTTGAGAGAAGTGTGAGCCTTTGAGTGACCAATTGTGTGCATGCTGTTCCCTGGTT 6880
CTGGAAAGACTACTTTGATAAAGCAGGCGTTACTCCGAAACCACAATATAGAAGCTGTTACTTTTGGAGTGCCAGAGAAA 6960
GCCAATATTCACGGGACATACATCAAGAAAGCCAGGCAAGGTCAAAGAGGAAGAGGGAATTACAGCATTTTGGACGAATA 7040
TTTATCTGGTGTAGTATCCACAGGGTTAACTGCTTGTCTCTGACCCCTTACCAAATCAGGGGACTGCTTGAGAGCTC 7120
ATTTTATAGGTGCTGCTCCCATCGCTTTGGCAGGCAGACGGTTCAGATCTTGAGGGACCTTGGCTATAACATTGCAAGC 7200
AGCAAAGAGGATATTGTTGAGAGGAAAAATTTTTTCAACTCATTGAGCCTGAAGGTGTATAAATTTGCTTGGAACAGAG 7280
TGTGGAGGACTTCCTAAAGTGGCATAGTGTGAGTACAAGCTGCCCTGTCAAGTTCGAGGTGCCACATTTGACGTCGTCA 7360
CATTCATTACGAAAAACCTCTAGAGGAGCTGGTTGGCCAGATTTGTTGTAGCTCTTACTCGTCATAAGGACAAGCTT 7440
GTGCTCGTGAGCAATTAGCATGCCTTTTGTCTCAACCCCGATTACTCAAAAAGTGTGTTCCAATAGCTGTTGGGGTTG 7520
CGTTGCAAGTGGTGTGTTTACGTTGACTAGGAGCACATTGCCACAGGTGGTGACAATTCATAATTTACCTCACGGA 7600
GGTAATTACCAGGACGGCACAAAAGGATAAGTTATTGTGACCACAAAGATTCCTTTCCAAGCAGCTCAATAATATCATC 7680
TGGGACTCCTATGATCATAGGCATAATCATTTTTCTTGATATTTGCGATCTATGTTTCCGAAAAGTGGGCTGGGTCTGGCA 7760
ATCGTGTGCTGCGTTTGTGCGTACCTGGTACTCCTTCTTGACAGCAACTTTACATAAGCAGTAATTCAAGCCAGTGCAC 7840
CATTGTGATTACGGGTGAGTCAAGTTTCTATCGTAGGTTGCGTTTATTCTGAGGCTTTTCATAGATTTGGTCAAAGGCCTTA 7920
AGCCTTATTACCACCATTAGGTCAGGGCGTATCTGTTAATATTATATAAGTTTGAGAGTGTTC AATTGTGTGTTAATT 8000
TCAAAAAGGTTTAAATCGCATTTCTAAGTTTTTAGTCATGGCTTCCAATGGATCTCAACCTCCATCTTCCGCACCAATGGT 8080
TTCAGTGGAGGAACTACAGCTCCAGTTTCAGCCCCAAACCCAGTGTAAATAAGTTCAGCCCCGTTAGTGTCTCCAGTAG 8160
CTAGCGAGCCAGTGATTTCTCAAGTCCAATCTTTAGTCCGATTGTTGGTGGTTTTGACCCGAATTTGCATGGGCGGTTA 8240
ACTAGTGAACAAATGAGGCAGGCTCAGGATGAGGCTGCAAGAAAGGGCTATGAAGAGGGCTCCCGCCCTAACCCAGCGCTT 8320
CACACCAAGCTCGGTTGCTTACAACAATATGCGCAGCATGAACTCAAATCCATTGAAACTGGCACTGCCTACAGTAATG 8400
CACCGCAAATGAGTATGGGACCTACCCAACATTTTCTGGGAGTGGTGTACCAGTGAACCAAATGCTCAAAGAGTTTTTC 8480

CCTCCACAATATGGAGTGAGTCCTTCTGTCCATGGTGCTGAGCTTGTTGAAAACCAGGCCAATGCTAGTGGCAATGCTGG 8560
AACTCCATTCACACTGAGCAACAGAGCACCAAGAAATGCCGCAGCAAACACTGGGGGTATGAGGAGACGTCTGGATTCCG 8640
TGGGTCTTAAAAATATTAAATATGAACCCAGGCAGGAGTTGTGCCAAGCAATCAGAAGATAAGGGCAGTTGGTGTGCT 8720
TTGATAGGAATGGGGATCCCCGAGCATCAGCTTACAGAAGTTGGGGTATATTTGGCAAGGCACTGCGCAGATGTTGGAGC 8800
CTCGGACAAGTCCACTTTGCTTGAACCTTTCCTGGTTCCGACATCACTTTGGAGGAGGTTGGAACGATGATCAAGCAA 8880
CCGAGGGGTGTACTCTGAGGCAGTATTGTGCCTTTTACGCAAAGCATGTCTGGAACCTCATGTGCAAACCTCAGAGTCCA 8960
CCTGCCAACTGGGTAGGTAAAGAATTCAAATTTGAAACCAGGTATGCGGCTTTTGACTTCTTCTTTGGAGTCGAGAGCAC 9040
TGCATCCCTAGAACCTGCTGATGGCCTCTTGAGGTTACCAACCAGGCTGAGAGAGTGGCCAACGCCACAAGCAAAGAAA 9120
TACAGATGTACCGCATCCGCTCAATGGAGGGTACCCAAGCTGTAACTTTGGCGAGGTCACTGGGGGAAAGGTTGGACCG 9200
AGGCCCGTTCTATCCATTAGGAAGTAATTAATAATCAATCAATTCCTTGCAATTTCAATTTTCAGTACTTATGCTTTTAG 9280
TAAAGTTGATCCAGCCTAACCGGGACGGCTGAGTGTGTTTCTTTTCATGCTTTAGCTTATTTTTGTTTTAACTAGATTT 9360
TC 9362

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Vortrag mit anschließender Veröffentlichung im Tagungsband

im Rahmen des 1. Nachwuchswissenschaftler- Forums des Julius Kühn- Institut in Quedlingburg vom 24.- 26.11.2008:

Arntjen, A.; Jelkmann, W. (2009) Herstellung eines infektiösen Voll- Längen cDNA Klons und Untersuchungen zur Variabilität des *Apple stem pitting virus*. Mitt. Julius Kühn- Institut 419: 52- 55

im Rahmen der 21st “International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Friut Crops” in Neustadt an der Weinstraße vom 05.- 10.07.2009:

Arntjen, A.; Jelkmann, W. (2010) Investigation of virus occurence in different tissues throughout the year and sequence variabilty of *Apple stem pitting virus*. Julius-Kühn- Archiv 427: 118- 121

im Rahmen der 22st “International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Friut Crops” in Rom vom 03. – 08.06.2012:

Arntjen, A.; Jelkmann W. (2012) Generation Of *In Vitro* RNA Transcripts And Infectious Full-Length cDNA Clones Of ASPV And ASGV. Giornale di Patologia delle Piante, Vol. 22 (3): 302

Posterpräsentationen

im Rahmen des 5th Joint meeting of the DPG working group: „Viruskrankheiten der Pflanzen“ and the “Nederlandse Kring voor Plantevirologie” in Hamburg vom 08.- 09.04.2009:

Sequencing of apple stem pitting isolates and generation of an infectious full- length cDNA clone

Arntjen, A.; Jelkmann, W.

im Rahmen der 21st “International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops” in Neustadt an der Weinstraße vom 05.- 10.07.2009:

Towards generation of an infectious full- length cDNA clone of ASPV

Arntjen, A.; Jelkmann, W.

im Rahmen der 22st “International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Friut Crops” in Rom vom 03. – 08.06.2012:

Investigations On The Occurrence Of Three Latent Apple Viruses Throughout The Year And Sequence Variability Of *Apple Stem Pitting Virus*
Arntjen, A.; Jelkmann, W.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jelkmann für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und die damit verbundene Betreuung und Diskussionsbereitschaft, sowie die hilfreichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Rausch für die Übernahme des Zweitgutachtens und seinem Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Maiss für die Bereitstellung der Plasmide und die stetige Hilfsbereitschaft und die wertvollen Tipps und Ratschläge.

Frau Dr. Annette Wensing für die Unterstützung während des Zusammenschreibens dieser Arbeit durch Korrekturlesen und hilfreiche Anregungen.

Mein Dank gilt Frau Constanze Berwarth für die exzellente Zusammenarbeit und ihr tatkräftiges Engagement.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Julius Kühn- Institut in Dossenheim möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und deren Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert haben.