

Mirko Hobert

Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz

Identifikation differentiell exprimierter
Gene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.)
nach BYDV-PAV Infektion anhand von
cDNA-AFLP



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt:
Mirko Hobert
Florian-Geyer-Str. 1
06484 Quedlinburg
Germany

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.jki.bund.de Bereich Veröffentlichungen.

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-930037-56-8

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2010.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.



Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

**Identifikation differentiell exprimierter Gene der Gerste
(*Hordeum vulgare* L.) nach BYDV-PAV Infektion
anhand von cDNA-AFLP**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor agriculturæ (Dr. agr.)

am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Dipl.-Ing. agr. Mirko Hobert
aus Hannover

Giessen 2009

Tag der Disputation: 14. Dezember 2009

Vorsitzender:	Prof. Dr. Günter Leithold
Gutachter:	Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt PD Dr. Frank Ordon
Prüfer:	Prof. Dr. Andreas Vilcinskas Prof. Dr. Bernd Honermeier

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	<i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV)	2
2.1.1	Vorkommen und Bedeutung	2
2.1.2	Symptome	2
2.1.3	Erreger der Gerstengelverzweigung	3
2.1.4	Blattlausübertragung	5
2.1.5	Nachweis von BYDV	7
2.2	Widerstandsfähigkeit gegen BYDV	8
2.2.1	BYDV-Toleranz von Gerste und anderen Getreidearten	8
2.2.2	Der Virustiter als Toleranzkriterium	10
2.2.3	Induzierte Resistenz	11
2.2.4	Gentechnischer Ansatz zur Erzeugung von BYDV-Resistenz	12
2.3	Molekulare Marker	14
2.4	Genexpressionsanalyse	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Pflanzenmaterial	18
3.2	Virusinfektion der Pflanzen	19
3.3	Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)	19
3.4	cDNA-AFLP	21
3.4.1	RNA-Extraktion	21
3.4.2	Gewinnung von mRNA	22
3.4.3	Synthese doppelsträngiger cDNA	22
3.4.4	cDNA-AFLP Analyse	23
3.5	Charakterisierung polymorpher Fragmente	27
3.5.1	Fragmentisolierung	27
3.5.2	Klonierung	30
3.5.3	Sequenzierung	33
3.5.4	Sequenzidentifikation	34
3.6	Chromosomale Zuordnung	35

3.7	Genetische Kartierung	36
3.7.1	Allelspezifische Sequenzierung	37
3.7.2	Untersuchung von STS	37
3.7.3	Entwicklung von CAPS-Markern	38
3.7.4	SNP-Detektion	39
3.7.5	Genetische Kartierung	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Überprüfung der BYDV-Infektion	40
4.2	Qualität der Gesamt-RNA	41
4.3	Differenzierende Fragmente im cDNA-AFLP	41
4.4	Charakterisierung polymorpher Fragmente	43
4.5	Chromosomale Lokalisierung	46
4.6	Allelspezifische Sequenzierung	48
4.6.1	Entwicklung von STS-Markern	48
4.6.2	Entwicklung von CAPS-Markern	50
4.6.3	SNP-Marker	50
4.6.4	Kartierung der Marker in der DH-Population 'Post' x 'Vixen'	53
4.6.5	Vergleich der Markerpositionen mit bekannten QTL	59
5	Diskussion	61
5.1	Untersuchung der Genexpression mit cDNA-AFLP	61
5.2	In BYDV-infizierten Pflanzen herunterregulierte Genfragmente	62
5.2.1	UDP-D-Glucuronatdecarboxylase	62
5.2.2	L-allo-Threonin Aldolase	63
5.2.3	Dihydroliipoamiddehydrogenase	64
5.2.4	Transketolase	65
5.2.5	Fucosyltransferase	66
5.3	In BYDV-infizierten Pflanzen heraufregulierte Sequenzen	66
5.4	Konstitutiv in 'Post' exprimierte Fragmente	68
5.4.1	SNARE-binding (Calcium-lipid-Bindeprotein)	68
5.4.2	Dihydrodipicolinatreduktase-like protein (CRR1)	69
5.4.3	Aspartatkinase / Homoserindehydrogenase	70
5.4.4	Glutamat-Rezeptor	71
5.4.5	Glutathionperoxidase	72

5.5	In der Linie DH21-136 exprimierte Sequenzen	73
5.5.1	Saccharosephosphatsynthase	73
5.5.2	Cysteinsynthase (O-acetylserin (thiol)-lyase)	75
5.5.3	<i>Light-harvesting</i> Komplex (Lichtsammelfalle)	76
5.6	In 'Vixen' konstitutiv exprimierte Sequenz (Xyloseisomerase)	76
5.7	Kartierung der Fragmente	76
5.8	Abschließende Überlegungen	78
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
8	Literatur	89
9	Anhang	108
10	Abkürzungen	115

1 Einleitung

Gerste (*Hordeum vulgare* L.), ist eine der bedeutendsten Getreidearten weltweit und die zweitwichtigste in Deutschland. Hierzulande liegt die Anbaufläche von Winter- und Sommergerste bei 1.933.000 ha (2007) und damit hinter Weizen (3.005.000 ha), aber vor Roggen (674.000 ha) und Triticale (381.000 ha) (BMELV, 2008). Zuchtziele der vorwiegend als Brau- und Futtergerste angebaute Getreideart sind Qualitätsverbesserungen und eine Steigerung und Sicherung der Erträge, wobei Verbesserungen der Winterhärte, der Standfestigkeit und eine hinreichende Resistenz gegenüber Schaderregern im Vordergrund stehen. Insbesondere pilzliche Schadorganismen wie *Drechslera teres*, *Rhynchosporium secalis*, *Blumeria graminis* oder *Puccinia hordei* werden in der Resistenzzüchtung bearbeitet. Aber auch die Züchtung virusresistenter Sorten gewinnt an Bedeutung, da keine geeigneten direkten Bekämpfungsmaßnahmen zur Verfügung stehen. Die bedeutendste Viruserkrankung an Wintergerste ist die Gelbmosaikvirose (*Barley yellow mosaic virus*, BaYMV und *Barley mild mosaic virus*, BaMMV, Gattung *Bymovirus*), welche durch den bodenbürtigen Pilz *Polymyxa graminis* übertragen wird (ORDON UND FRIEDT, 1993; FRIEDT et al., 1999). Unter den in Deutschland zugelassenen 76 Wintergerstensorten (2007) sind etwa zwei Drittel (53) gelbmosaikvirusresistente Sorten, darunter 51 resistent gegen BaYMV-1 und BaMMV und zwei zusätzlich gegenüber BaYMV-2. Diese Sorten sind mithin auch für eine Produktion auf Virus verseuchten Flächen geeignet (ANONYMUS, 2007).

Eine weitere wichtige Virose an Wintergerste ist die Gelbverzwergung (*Barley yellow dwarf Luteovirus*, BYDV), welche von Blattläusen übertragen wird, weltweit von Bedeutung ist und erhebliche Ertragsverluste verursacht. Im Gegensatz zu der großen Anzahl von Gelbmosaikvirus resistenten Sorten gibt es in Deutschland bisher keine zugelassene Sorte mit Resistenz gegenüber BYDV, und in Europa ist ausschließlich die französische Sorte 'Naturelle' als tolerant gegenüber BYDV zugelassen (HABEKUSS, pers. Mitt.). Toleranz bedeutet, im Unterschied zur Resistenz, dass die Pflanzen befallen werden, als Träger des Virus damit auch zu einer Verbreitung beitragen können, jedoch keine oder nur geringe Symptomausprägungen und Ertragseinbußen aufweisen. Mehrere Toleranzloci sind in Gerste gegenüber der Gelbverzwergung beschrieben und kartiert (BURNETT et al., 1995; SCHEURER et al., 2001; NIKS et al., 2004), dennoch sind bisher keine Gene bekannt, welche in die Toleranzreaktion der Pflanze involviert sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, differentiell nach einer BYDV-PAV Infektion exprimierte Gene zu identifizieren, von diesen Genen Marker abzuleiten und schließlich dieselben in die bestehende Karte der Population 'Post' x 'Vixen' (SCHEURER et al., 2001) zu integrieren.

2 Literaturübersicht

2.1 *Barley yellow dwarf virus* (BYDV)

2.1.1 Vorkommen und Bedeutung

Entdeckt wurde das *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) von OSWALD UND HOUSTON (1951) in Kalifornien als Ursache der Gelbverzwergungskrankheit von Gerste, Weizen und Hafer. Es folgten Beschreibungen über das Auftreten von BYDV in Neuseeland und Australien (SMITH, 1955, 1957). In Deutschland wurde das Virus erstmals 1958 erwähnt (VON RADEMACHER UND SCHWARZ, 1958). Durch kontinuierliche Ausbreitung und Ertragsverluste von 40 % (LISTER UND RANIERI, 1995) bis über 70 % in anfälligen Sorten (SUNESON UND RAMAGE, 1957) und in einigen Gegenden sogar bis zu 86 % (MILLER UND RASOCHOVÁ, 1997), ist die Gelbverzwergung eine der bedeutendsten Krankheiten an Gerste und anderen Gräsern weltweit. In einer Studie über 10 Jahre in Sachsen-Anhalt wurden Infektionsraten von regional bis zu 94 % Virus tragenden Pflanzen nachgewiesen (HABEKUSS et al., 2002), so dass in manchen Befallsjahren ganze Bestände umgebrochen werden mussten. Die Infektionsraten von BYDV in Gerste sind stark witterungsabhängig und direkt korreliert mit dem Auftreten der Virus übertragenden Vektoren. Aktuelle Befallszahlen in Wintergerste zeigen einen Anteil BYDV-infizierter Pflanzen von 24 % in 2007 und 20 % im Jahr 2008 (HABEKUSS, pers. Mitteilung). Der Wirtspflanzenkreis des *Barley yellow dwarf virus* umfasst neben Gerste, Weizen und Hafer praktisch alle Arten aus der Familie der *Poaceae* (IRWIN UND THRESH, 1990; D'ARCY, 1995). Als Neben- oder Zwischenwirte kommen viele Wildgräser in Betracht und auch Ausfallgetreide, vor allem auf Stilllegungsflächen, kann einen erheblichen Befallsdruck verursachen (HABEKUSS et al., 2002). Nahezu jährlich werden neue Beschreibungen über das Auftreten oder den Nachweis von BYDV weltweit veröffentlicht (z.B. NAJAR et al., 2000; PRIBEK et al., 2006; ROBERTSON UND FRENCH, 2007; ILBAGI et al., 2006, 2008). Durch eine BYDV-Infektion wird zusätzlich die Anfälligkeit gegenüber phytopathogenen Pilzen und abiotischem Stress wie Wassermangel oder Frost erhöht (DELSENERONE et al., 1987; HABER, 1995; HUTH, 1995). In Zukunft dürften insektenübertragbare Viren wie BYDV durch zunehmend längere Perioden mit höheren Temperaturen im Herbst und Winter vermehrt an Bedeutung gewinnen (HABEKUSS et al., 2009).

2.1.2 Symptome

Charakteristisch für einen BYDV-Befall sind „nesterartige Vergilbungen“ im Feldbestand, einhergehend mit einem deutlichen Zwergwuchs der Pflanzen in diesen Bereichen.

Die Blattlausvektoren fliegen in den Feldbestand ein und breiten sich lokal aus, so dass es zu dieser „Nesterbildung“ kommt. Die Symptome an der Gerstenpflanze äußern sich durch gelbliche Verfärbungen der Blätter. Bei Weizen sind auch rötliche Blattspitzen beschrieben worden, und bei Hafer kann sich ein BYDV-Befall durch eine Rotfärbung der gesamten Pflanze äußern (JENSEN UND D'ARCY, 1995) sowie ein deutlich verringertes Längenwachstum, welches neben einer Internodienverkürzung der oberirdischen Pflanzenteile auch das Wurzelwachstum betreffen kann (MILLER UND RASOCHOVÁ, 1997). Bei infizierten Pflanzen wird häufig eine verstärkte Bestockung beobachtet, wobei bis zum Ährenschieben eine verlängerte Entwicklungsdauer zu verzeichnen ist. Die Anzahl der Ähren und der gebildeten Körner ist reduziert, wobei die Symptomausprägungen allgemein stark von den Umweltbedingungen, dem Genotyp und dem Alter der Pflanze abhängig sind (D'ARCY, 1995), d.h. je früher in der Wachstumsphase eine Infektion stattfindet, desto stärker prägen sich die Symptome in der Pflanze aus (JENSEN UND D'ARCY, 1995).

Die Viruspartikel sind in der Pflanze auf das Phloem beschränkt (JENSEN UND D'ARCY, 1995) und erste Untersuchungen von ESAU (1957a, 1957b) zur Pathologie auf Zellebene nach BYDV-Infektion zeigten nekrotische Verschlüsse der Siebzellen und der angrenzenden Parenchymzellen durch Anreicherung undefinierter Komponenten. Das Cytoplasma der infizierten Zellen zeigt bei mikroskopischer Betrachtung ein Netzwerk feiner Fäden, die Kernkörperchen (Nuclei) werden zerstört, das Heterochromatin verklumpt und in den Nuclei werden Viruspartikel sichtbar (JENSEN, 1969; GILL UND CHONG, 1975). Diese Störung des Phloems und Desorganisation von Zellkompartimenten führt zu einer verringerten Translokation von Metaboliten und einer Anreicherung von löslichen Kohlehydraten und Stärke im Blatt, welche einerseits das Trockengewicht erhöhen und andererseits zu einer reduzierten Photosyntheserate und einem verringerten Chlorophyllgehalt führen (JENSEN, 1968, 1969). Eine Akkumulation von Kohlehydraten in BYDV-infizierter Gerste führt zu einem Rückgang der Kohlehydratsynthese und bewirkt eine vermehrte Bildung stickstoffhaltiger Komponenten (JENSEN UND D'ARCY, 1995). In der Wurzel geht der Anteil löslicher Kohlehydrate hingegen zurück. Zusätzlich zu den metabolischen Veränderungen nach einer BYDV-Infektion berichteten ORLOB UND ARNY (1961) von Änderungen der Enzymaktivität. In Virus-infiziertem Gewebe ist eine verminderte Katalaseaktivität zu verzeichnen, während die Aktivität von Peroxidase deutlich erhöht ist.

2.1.3 Erreger der Gerstengelbverzweigung

Die Gerstengelbverzweigung wird durch das *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) verursacht, welches zur Gattung *Luteovirus* in der Familie der *Luteoviridae* gehört (D'ARCY et al., 2000).

Literaturübersicht

Viren der *Luteoviridae* sind nicht mechanisch, sondern ausschließlich durch Blattläuse übertragbar. Die Viren zirkulieren in der Blattlaus, replizieren dort aber nicht, sondern können sich ausschließlich in der Wirtspflanze vermehren.

Die Viren stellen ikosaedrische Partikel von 25-30 nm Größe dar (ROCHOW UND BRAKKE, 1964; D'ARCY et al., 2000), die aus einem Haupt-Hüllprotein von ca. 22 kDA Größe bestehen und einer Nebenkomponekte von 52 kDA, welche das RNA-Genom umhüllen (D'ARCY et al., 2000). Die Viren besitzen eine einzelsträngige, positiv orientierte RNA (+ssRNA) mit einer Genomgröße von 5,7 kb und sechs offenen Leserahmen (ORFs), wobei die RNA keine Cap-Struktur und keinen Poly-A-tail besitzt. Die Cap-unabhängige Translation der viralen RNA übernimmt ein *Barley yellow dwarf* Translationselement (BTE) mit strukturellen Besonderheiten der RNA (Stamm-Schleife Strukturen) (ALLEN et al., 1999). Das BTE am 3'-Ende vermittelt eine effiziente Initiation der Translation durch Basenpaarungen über eine große Distanz mit der 5' untranslatierten Region (UTR), an der sich ein Startcodon (AUG) befindet, und interagiert mit den Cap-bindenden Translationsinitiationsfaktoren eIF4F und eIFiso4F der Pflanze (KNELLER et al., 2006). Dabei übernimmt insbesondere die Untereinheit eIF4G eine tragende Rolle bei der Initiation der Translation, indem es für die Bindung des BTE an die ribosomale Ableseeinheit verantwortlich ist (TREDER et al., 2008).

Bei der Infektion generiert das BYDV 3' coterminale subgenomische RNAs (sgRNA), und die virale genomische RNA dient als messenger RNA (mRNA) für ORF1 und ORF2, wobei ORF2 aus ORF1 durch „ribosomales Frameshifting“ an einer Erkennungssequenz, dem ‚shifted heptanucleotide‘ hervorgeht (Di et al., 1993) und beide zusammen als Fusionsprotein die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) codieren. Die Offenen Leserahmen (ORFs) 3-5 liegen auf einer subgenomischen RNA, wobei die Sequenz *downstream* von ORF5 bei der Cap-unabhängigen Translation eine wichtige Rolle spielt (BECKET et al., 2004). In allen Luteoviren werden ORF3 (Hüllprotein) und ORF4 durch lückenhaftes Ablesen der Sequenz translatiert, was bedeutet, dass einige Ribosomen nicht am ersten Startcodon der mRNA binden, sondern am folgenden AUG die Peptidsynthese beginnen (MILLER UND RASOCHOVÁ, 1997). ORF5 codiert das ‚Readthrough Protein‘ (WATERHOUSE et al., 1989; CHENG et al., 1994), und das aus dem „Durchlesen“ entstandene Peptid (ORF3 + ORF5) ist für die Blattlausübertragung entscheidend (Di et al., 1991). Ein weiteres „Gen“ (ORF6) ist auf der zweiten subgenomischen RNA lokalisiert, besitzt eine hochvariable Sequenz in verschiedenen PAV-Isolaten und ist von unbekannter Funktion (CHALHOUB et al., 1994; BECKET et al., 2004). Untersuchungen der Genomorganisation von BYDV haben gezeigt, dass das Genom am 3'-Ende mit spezifischer RNA-Faltung und dem Vorkommen einer Stamm-Schleife-Struktur viele Eigenschaften mit Viren der *Tombusviridae*-Familie gemein hat (MILLER et al., 2002; KOEV et al., 2002).

2.1.4 Blattlausübertragung

Das BYDV kann durch wenigstens 25 verschiedene Blattlausarten übertragen werden (HALBERT UND VOEGTLIN, 1995). Die verschiedenen Virusstämme und -isolate werden dabei nicht von allen Aphiden gleichermaßen übertragen (ROCHOW, 1958; WATSON UND MULLIGAN, 1960). Die spezifischen Beziehungen zwischen BYDV-Stämmen und verschiedenen Blattlausarten wurden von ROCHOW (1969) erstmals klassifiziert: Isolate, die vorwiegend von *Sitobion* (früher: *Macrosiphon*) *avenae* (Fabricius) übertragen werden, wurden als BYDV-MAV benannt, welche die vor allem von *Rhopalosiphum padi* (L.) übertragen werden, BYDV-RPV (heute: CYDV, s.u.) und solche, die von beiden Blattlausarten übertragen werden, als BYDV-PAV. Weitere Isolate werden von *Rhopalosiphum maydis* (Fitch) (BYDV-RMV), *Schizaphis graminum* (Rondani) (BYDV-SGV) oder beiden *R. padi* und *S. graminum* (BYDV-GPV, einem CYDV-ähnlichem Serotyp [WANG et al. 1998]) übertragen. Serologische Untersuchungen bestätigten die Vektorspezifität und führten zu einer Unterscheidung zwischen den heute gültigen Isolaten BYDV-PAV und BYDV-MAV, wobei BYDV-PAV der bedeutendste Serotyp in Westeuropa ist und hier offenbar die massivsten Symptome verursacht (SIGNORET UND MAROQUIN, 1990; HUTH, 1992). Der ehemalige Serotyp BYDV-RPV, wird heute nach Sequenzuntersuchungen als eine eigene Art, nämlich *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) angesehen und gehört zum Genus *Polerovirus*. Die Serotypen SGV und RMV haben von den Luteo- und Poloroviren unterschiedliche Aminosäuresequenzen (DOMIER et al., 1994) und werden bis auf weiteres keiner Gattung zugeordnet (MAYO UND D'ARCY, 1999). Darüber hinaus sind weitere Varianten von Serotypen beschrieben, z.B. BYDV-PAS (MAYO, 2002), eine Variante des BYDV-PAV, die in New York erstmals beschrieben wurde (CHAY et al., 1996) und in Alaska der vorherrschende Serotyp ist (ROBERTSON UND FRENCH, 2007). Eine weitere Einteilung in Isolate eines Serotyps wurde auch von MASTARI et al. (1998) vorgenommen, die eine deutliche Verteilung nach der geographischen Herkunft der Isolate eines Serotyps zeigen konnten. Darüber hinaus hat der Wirtsorganismus (*Hordeum vulgare* bzw. *Lolium multiflorum*) ebenfalls einen großen Einfluss auf die Selektion von Isolaten und die Diversität von BYDV-PAV (MASTARI et al., 1998). Nach MILLER et al. (2002) gibt es keinen Zweifel an der Existenz weiterer Isolate mit Präferenzen für spezielle Blattlausvektoren.

Die Vektorspezifität von BYDV kommt durch eine Interaktion des viralen Hüllproteins mit den Membranoberflächen der akzessorischen Speicheldrüse (ASG, *accessory salivary gland*) der Blattlaus zustande (GILDOW UND ROCHOW, 1980), wobei schon das Plasmalemma des Dickdarms als erste Übertragungsbarriere fungiert und einige Isolate so nicht in das Hämocel gelangen können (POWER UND GRAY, 1995).

Darüber hinaus können Blattlausvektoren, die allein nur bestimmte Isolate übertragen, bei einer Mischinfektion der Pflanze unter Umständen auch andere BYDV-Isolate übertragen, indem es zwischen den Viren zu einer heterologen Enkapsidierung kommt.

Literaturübersicht

Dabei kann ein Proteincapsid Untereinheiten von mehreren Viren enthalten, oder das sogenannte Helfer-Virus verpackt die genomische RNA in sein Proteincapsid. Diese Transcapsidierung ist bei weiter entfernt verwandten Isolaten stärker verbreitet als bei eng verwandten (WEN UND LISTER, 1991). Durch Mischinfektionen mit anderen Viren kann ebenfalls die Limitierung des BYDV auf das Phloemgewebe aufgehoben werden und das Virus auch in Nachbarzellen oder das Xylem eindringen (JENSEN UND D'ARCY, 1995).

Die Virusübertragung lässt sich in drei Phasen einteilen: i) Aufnahme des Virus in die Blattlaus, ii) latente Phase (LP), in der das Virus in der Blattlaus zirkuliert, und iii) Inokulation des Virus und Übertragung in die Pflanze. Die Aufnahme des Virus erfolgt mit dem Phloemsaft, wobei eine längere Verweildauer (IAP, *inoculation access period*) der Blattlaus von mehreren Stunden bzw. Tagen, abhängig von Virusisolat und Blattlausart, nötig ist (POWER et al., 1991). Der weitere Transport der Viren durch den Darm erfolgt unspezifisch; erst das Basalplasmalemma des Dickdarms stellt die erste Übertragungsbarriere dar, und nicht übertragbare Viren werden wieder ausgeschieden (POWER UND GRAY, 1995). Viren, für welche Blattläuse als Vektoren dienen, können das Basalplasmalemma und die Basalmembran des Dickdarms passieren und zirkulieren in der Hämolymphe der Blattlaus, wo sie an ein Chaperonin (SymL, „Symbionin“) eines symbiontischen Bakteriums der Gattung *Buchnera* binden, um einen proteolytischen Verdau zu verhindern (FILICHKIN et al., 1997; VAN DEN HEUVEL et al., 1997). In die akzessorische Speicheldrüse (ASG) gelangen die Viren durch die extrazelluläre Basalmembran und das Basalplasmalemma der ASG, von der das Virus in weitere Wirtspflanzen übertragen werden kann (GILDOW, 1999). Diese zweite Barriere ist, abhängig vom jeweiligen Blattlausgenotyp, selektiv für das spezifische Luteovirus (PFEIFFER et al., 1997). Vermutlich existiert eine Virus-spezifische Erkennungsstelle, die mit dem Hüllprotein einiger Luteoviren interagiert und die Passage der Viren durch die Basalmembran und das Basalplasmalemma der ASG reguliert (LI et al., 2001). Die Zeit in der das Virus in der Blattlaus zirkuliert stellt die latente Phase dar, die bis zu einem Tag dauern kann und von der Spezifität der Blattlaus als Vektor, der Viruskonzentration in der Wirtspflanze, der Temperatur und weiteren Umweltfaktoren abhängig ist (POWER UND GRAY, 1995), wobei insbesondere die Temperatur einen großen Einfluss auf die Effizienz der Virusübertragung hat (GRAY et al., 1991; POWER UND GRAY, 1995; SMYRNIODIS et al., 2001; HABEKUSS et al., 2004). BURROWS et al. (2007) zeigten anhand der genetischen Analyse einer Kreuzung von Vektor- und Nicht-Vektor-Genotypen von *Schizaphis graminum*, dass die Übertragungseffizienz von BYDV-SGV ein komplexes Merkmal darstellt, an dem vermutlich mehrere Gene beteiligt sind.

2.1.5 Nachweis von BYDV

Da die Symptome einer BYDV-Infektion von Pflanzen mit anderen biotischen und auch abiotischen Faktoren wie z.B. Stickstoffmangel verwechselt werden können (D'ARCY, 1995), sind verlässliche Methoden für die Virusdetektion sehr wichtig.

Für die Entwicklung solcher Methoden waren Übertragungsversuche grundlegend, bei denen gesunde Blattläuse auf symptomtragende Pflanzen gesetzt und nach einer entsprechenden Latenzzeit auf gesunde Pflanzen überführt wurden (ROCHOW, 1959). Die Methodik wurde in den darauffolgenden Jahren erweitert, indem zunächst die Läuse durch Membranen mit Virus-tragendem Pflanzensaft gefüttert wurden (ROCHOW, 1960) oder den Läusen mit Hilfe einer Kanüle der Saft infizierter Pflanzen und Läuse direkt injiziert wurde (MUELLER UND ROCHOW, 1961). Die spezifischen Symptomausprägungen nach der Übertragung an zuvor gesunden Pflanzen gelten als Nachweis für das Virus.

Die Entwicklung von serologischen Verfahren zum Nachweis von Pflanzenviren, wie Agglutinations- und Geldiffusionstests führte zu großen Zeit- und Kosten-Einsparungen (TORRANCE UND JONES, 1981). Nach PALIWAL (1977, 1982) kann mittels immunelektronenmikroskopischer Methoden eine serologische Charakterisierung bzw. Identifizierung der Viruspartikel in infizierten Pflanzen und Blattläusen erfolgen. Eine weitere zuverlässige Methode für den Virusnachweis konnte mit der Einführung des ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) für die Pflanzenanalytik von CLARK UND ADAMS (1977) realisiert werden, der seitdem als DAS-ELISA (*Double-Antibody-Sandwich ELISA*) vor allem für Routineuntersuchungen genutzt wird. Mit spezifischen Antisera können die verschiedenen Serotypen des BYDV sehr gut unterschieden werden (ROCHOW UND CARMICHAEL, 1979). Als Modifikation des ELISA, der in Mikrotiterplatten durchgeführt wird, findet auch der TBIA (*Tissue-blot Immunoassay*) Verwendung, bei dem die Viren für den Nachweis auf einer Nitrocellulosemembran fixiert werden.

Nach der Entwicklung von Nukleinsäuretechniken für die Diagnose werden die serologischen Techniken zunehmend durch Techniken auf Basis von Nukleinsäure-Hybridisierungen oder der PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ergänzt bzw. ersetzt (GALLITELLI, 2004). OWENS UND DIENER (1981) konnten zeigen, dass Untersuchungen auf Nukleinsäurebasis auch zur Detektion von pflanzenpathogenen Viren und Viroiden verwendet werden können. ARUNDEL et al. (1988) konnten anhand spezifischer Hybridisierungsreaktionen mit radioaktiv markierter cDNA, die komplementär zur RNA von BYDV-PAV war, die Konzentration von BYDV im Pflanzengewebe bestimmen. Spezielle Primer für die Identifikation von Luteoviren anhand der PCR wurden z.B. von ROBERTSON et al. (1991) entwickelt.

Anhand von Multiplexreaktionen können inzwischen auch Gemische von BYDV und CYDV mit RT-PCR (*Reverse Transkription PCR*), bei der das RNA-Genom der Viren zunächst in DNA „übersetzt“ wird, detektiert werden (MALMSTROM UND SHU, 2004), und selbst Gemische von acht verschiedenen Viren (unter anderem BYDV und CYDV) unterschieden werden (DEB UND ANDERSON, 2008).

Für eine Bestimmung der Virusmenge in der Pflanze kann die Methode der Real-time PCR, bei der die amplifizierte DNA-Menge direkt gemessen werden kann, verwendet werden. BALAJI et al. (2003) konnten zeigen, dass für die Quantifizierung von BYDV in Hafer diese Methode eine verlässliche und, im Vergleich zum ELISA, sensitivere Detektionsmethode darstellt.

2.2 Widerstandsfähigkeit gegen BYDV

2.2.1 BYDV-Toleranz von Gerste und anderen Getreidearten

Wegen der ausschließlichen Übertragung des Virus durch Blattläuse ist zur Verhinderung von Ertragsverlusten eine chemische Bekämpfung durch Vernichtung der Vektoren möglich, da vor allem im Herbst natürliche Gegenspieler und Parasitoide keine effektive Kontrolle gegenüber den Vektoren und einer Virusinfektion erlauben (VAN WAETERMEULEN, 2004). Eine Applikation von Insektiziden, um die Blattlausvektoren von BYDV zu bekämpfen, brachte signifikante Ertragserhöhungen in England und Australien (PLUMB UND JOHNSTONE, 1995). Empfohlen wird eine späte Aussaat von Wintergetreide, um die Expositionszeit mit migrierenden Blattläusen zu verkürzen und somit den Anteil infizierter Pflanzen und die Infektionsstärke zu minimieren (PLUMB UND JOHNSTONE, 1995; MCKIRDY UND JONES, 1997). Die beste Möglichkeit bei einem gegebenen BYDV-Befallsdruck trotzdem Gerste ertragreich und ökonomisch zu produzieren, liegt jedoch grundsätzlich im Anbau resistenter bzw. toleranter Sorten.

COOPER UND JONES (1983) definierten die Pflanzenreaktion auf einen Virusbefall als „immun“, wenn auch nach wiederholter Exposition keine Viren in der Pflanze nachweisbar sind, im Gegensatz zu Pflanzen die Viruspartikel beinhalten und als „infizierbar“ bezeichnet werden. In diesem Zusammenhang werden die Bezeichnungen „anfällig“ und „resistent“ als Gegensätze verwendet, wobei unabhängig davon die Reaktion einer Pflanze auf ein Virus „sensitiv“ oder „tolerant“ sein kann. Bei einer sensitiven Reaktion der Pflanze auf einen Virusbefall sind sehr starke Symptomausprägungen und Ertragseinbußen zu verzeichnen, während bei einer toleranten Pflanzenreaktion wenige bis keine Symptome bzw. vor allem Leistungsminderungen zu erkennen sind (KLINKOWSKI, 1967).

Eine deutliche Korrelation zwischen Virustiter der Pflanze und der Toleranzausprägung existiert nach COOPER UND JONES (1983) und HUTH (1998, 1999) nicht, ein Phänomen, das in Kap. 2.2.2 noch ausführlicher besprochen wird.

Als erstes Resistenzgen gegenüber BYDV wurde das rezessive Gen *yd1* beschrieben, welches von SUNESON (1955) in der kalifornischen Sorte 'Rojó' nachgewiesen wurde. Aufgrund der geringen Wirksamkeit dieses Gens wurde dies jedoch in der Gerstenzüchtung wenig verwendet (KEGLER UND FRIEDT, 1993). Ein weiteres Gen für Toleranz gegenüber BYDV, das dominante Gen *Ryd2* wurde von RASMUSSEN UND SCHALLER (1959) in vier äthiopischen Landrassen nach künstlicher Infektion im Freiland entdeckt. Insbesondere die Wuchshöhe wurde als Maß für eine Bewertung der Toleranz verwendet. Das *Yd2*-Gen konnte von SCHALLER et al. (1963) in weiteren äthiopischen Gersten nachgewiesen und in Spaltungsanalysen mit mehreren, bereits kartierten, morphologischen und Resistenzmarkern auf Chromosom 3 lokalisiert werden (SCHALLER et al., 1964). Nach SCHALLER (1984) wird die Wirksamkeit des *Ryd2*-Gens vom Virusisolat, von Umwelteinflüssen und dem genetischen Hintergrund der Pflanze beeinflusst. Einflüsse von hoher Temperatur, Trockenheit oder des Genotyps auf die Ausprägung der Toleranz wurden auch von ŠÍP et al. (2004) beschrieben. Darüberhinaus wurden der Kornertrag und die Malzqualität in Abhängigkeit von dem *Ryd2*-Gen untersucht, aber es konnten keine negativen Auswirkungen von *Ryd2* beobachtet werden. Mehrere Autoren vermuten multiple Allelie am *Ryd2* Locus (DAMSTEEGT UND BRUEHL, 1964; SCHALLER et al., 1964; CATHERALL UND HAYES, 1966; CHALHOUB et al., 1995).

Ryd2 ist die weltweit am häufigsten verwendete Quelle für BYDV-Toleranz (BURNETT et al., 1995). Sie wurde in zahlreiche Gerstensorten integriert, wie z.B. in die Sorte 'Vixen' (PARRY UND HABGOOD, 1986). LARKIN et al. (1991) verglichen die Hochleistungssorte 'Shannon' mit äthiopischen Sorten und konnten zeigen, dass das *Ryd2*-Gen in den äthiopischen Herkünften wesentlich wirksamer ist. Des Weiteren sind andere Toleranzreaktionen von Gerstensorten gegenüber BYDV, wie z.B. der Sorte 'Post' beschrieben (GRAFTON et al., 1982), die nicht äthiopischer Abstammung sind und deren Toleranz-Quelle unbekannt ist. Im Jahre 1980 wurden vom Polytechnischen Institut in Virginia (USA) mehrere Sorten mit BYDV-Toleranz veröffentlicht, die nicht Träger des *Ryd2*-Gens sind (BURNETT et al., 1995), und auch OVESNÁ et al. (2000) konnten in genetischen Analysen zeigen, dass es über *Ryd2* hinaus weitere Minorgene für Toleranz gegenüber BYDV gibt. In QTL (Quantitative trait loci) Analysen anhand einer Kreuzungspopulation von 'Shyri' x 'Galena' auf Toleranz gegenüber BYDV-MAV und BYDV-PAV konnten TOOJINDA et al. (2000) mehrere Loci bezüglich einer Reduktion der Pflanzenhöhe und der Bestockung auf den Chromosomen 1H, 3H, 4H und 7H identifizieren. SCHEURER et al. (2001) fanden in QTL-Untersuchungen anhand einer DH-Population der Kreuzung 'Post' x 'Vixen' nach BYDV-Infektion unter anderem zwei QTL für den relativen Kornertrag pro Pflanze, die zusammen ca. 47 % der phänotypischen Varianz erklären.

Sie kartieren auf Chromosom 2HL bzw. auf Chromosom 3HL in der Region, in der auch das *Ryd2* Gen lokalisiert ist. In einer Studie der Kreuzung 'Post' x 'Nixe' wurde ein QTL im gleichen Markerintervall auf Chromosom 2HL lokalisiert, so dass davon auszugehen ist, dass diese chromosomale Region vermutlich von Bedeutung für die Toleranzreaktion der Sorte 'Post' gegenüber BYDV ist.

Im Rahmen einer QTL-Analyse für den relativen Kornertrag pro Pflanze in der Kreuzung 'MOB3561' x 'Asorbia' konnten in den Regionen um *Ryd2* und auf Chromosom 2H ebenfalls zwei QTL identifiziert werden, die zusammen 79,1 % der phänotypischen Varianz erklären (FRIEDT et al., 2001). In einer Kartierungspopulation mit rekombinanten Inzuchtlinien (RILs) der Kreuzung 'L94' x 'Vada' entdeckten NIKS et al. (2004) das dominante Gen *Ryd3*, welches Toleranz gegenüber BYDV vermittelt, ebenfalls äthiopischen Ursprungs und auf Chromosom 6H lokalisiert ist. Die molekularen Marker sind in Kapitel 2.3 beschrieben.

In Weizen (*Triticum aestivum* L.) sind zwei Toleranzgene gegenüber BYDV beschrieben worden: *Bdv1*, aus der Sorte 'Frontana', welches auf Chromosom 7DS lokalisiert ist, und mit einer Altersresistenz gegenüber Weizenbraunrost gekoppelt ist (SINGH, 1993) sowie *Bdv2*, welches ursprünglich aus *Thinopyrum intermedium* (Host) stammt, durch Introgression in *T. aestivum* eingeführt wurde und auf Chromosom 7DL lokalisiert ist (BANKS et al., 1995; ZHANG et al., 2001). SPIELMEYER et al. (2007) beschrieben multiple Resistenzen gegenüber verschiedenen Pathogenen (unter anderem die Resistenz *Lr34/Yr18* gegenüber *Puccinia tritica* und *P. striiformis*) am gleichen Locus auf Chromosom 7D. Die Position des *Bdv1* Gens in Weizen, leicht gekoppelt mit *Lr34* (s.o.), sowie eines weiteren QTL für Vergilbung in der Population 'Frontana' x 'INIA 66' auf Chromosom 7D in Weizen (AYALA et al., 2002) und der QTLs für BYDV-MAV/PAV-Toleranz und Braunrostresistenz auf Chromosom 7H in Gerste (TOOJINDA et al., 2000) deuten auf Homoeologie hin.

In Hafer (*Avena sativa* L.) kartiert ein QTL für BYDV-Toleranz in der Sorte 'Ogle' auf Chromosom OM1 (ZHU et al., 2003).

2.2.2 Der Virustiter als Toleranzkriterium

Zahlreiche Autoren ermittelten den Virustiter anhand des ELISA im Hinblick auf die Toleranzreaktion von Genotypen mit *Ryd2*. SKARIA et al. (1985) untersuchten Spross- und Wurzelproben von in Klimakammern kultivierten Gerstegenotypen mit und ohne *Ryd2*. Träger des *Ryd2* zeigten eine signifikante Reduktion des Virustiters in Bezug auf den BYDV-Serotyp PAV, jedoch nicht für die Serotypen MAV und RPV. Im Freiland konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Australische Isolate von BYDV-PAV und RPV, sowie ein Gemisch aus beiden, wurden von LARKIN et al. (1991) an hoch toleranten äthiopischen Gersten und den Sorten 'Shannon' (*Ryd2*⁺) und 'Proctor' (*Ryd2*⁻) getestet.

Der geringste Virustiter zeigte sich bei den Gersten äthiopischer Abstammung, eine moderate Viruskonzentration in der Sorte 'Shannon' und die höchsten Werte in 'Proctor'. Die gleichen Sorten wurden von BANKS et al. (1992) mit drei australischen RPV-Isolaten untersucht, mit dem Ergebnis, dass in beiden Sorten ähnliche Virustiter gefunden wurden. RANIERI et al. (1993) ermittelten die Virustiter in unterschiedlichen Gerstenlinien (*Ryd2*⁺, *Ryd2*⁻) nach einer Infektion mit vier verschiedenen mexikanischen BYDV-Serotypen. Die Linie 'CM67' (*Ryd2*⁺) zeigte nach Infektion mit BYDV-PAV einen signifikant geringeren ELISA-Wert im Sprossextrakt als die Sorte 'California Mariout' (*Ryd2*⁻).

Für die Serotypen MAV, RPV und RMV konnten im Spross keine signifikant verschiedenen Virustiter gefunden werden. HENRY UND VIVAR (1998) inokulierten 66 Linien mit BYDV, darunter anfällige und resistente Kontrollen wie 'Atlas 57' (anfällig) und 'Atlas 68' (tolerant). Viele der getesteten Linien zeigten im Feld reduzierte oder keine Symptome, jedoch moderate Virustiter, so dass diese Ergebnisse den Schluss zulassen, dass es sich bei der Reaktion auf BYDV um eine Toleranz handelt. Nach HUTH (1995) besteht keine Beziehung zwischen ELISA-Werten und der Toleranzreaktion der Pflanze. Die Ausprägung einer Toleranz wird vielmehr durch Umweltfaktoren und die Aggressivität des Virusisolates bestimmt (HUTH, 2001).

Eine Beziehung zwischen dem Virustiter und der Toleranzreaktion konnte von SCHEURER et al. (2000) in Gefäßversuchen mit vier verschiedenen DH-Populationen nicht festgestellt werden. Untersuchungen von HABEKUSS (pers. Mitt.) in zahlreichen Gerstensorten und Kreuzungsnachkommen, in denen die beschriebenen Toleranzloci *Ryd2*, *Ryd3* bzw. ein QTL von 'Post' auf 2H jeweils alleine vorhanden waren, zeigten nach Infektion mit einem BYDV-PAV-Isolat aus Aschersleben keine signifikant verschiedenen Virustiter zwischen toleranten und anfälligen Pflanzen. In aktuellen Untersuchungen von Kreuzungsnachkommen, in denen die unterschiedlichen Toleranzloci (*Ryd2*, *Ryd3* und 2H-QTL von 'Post') kombiniert wurden, zeigte sich bei einer Kombination von *Ryd2* und *Ryd3* eine deutliche Verringerung des Virustiters in BYDV-infizierten Pflanzen. Der QTL aus 'Post' hatte dabei keine weitere positive Wirkung und jeder Toleranzlocus für sich allein zeigte in der Studie ebenfalls keine Reduktion des Virustiters (HABEKUSS et al., 2009).

2.2.3 Induzierte Resistenz

Pflanzen werden, gemessen an der immensen Anzahl bekannter Schaderreger, nur von wenigen parasitischen Arten befallen. Gegenüber der Mehrzahl ist eine Pflanze widerstandsfähig oder wird nicht befallen. Bei Pilzen wurden die Begriffe 'Nichtwirt-Resistenz' oder 'Basisresistenz' geprägt (PRELL UND DAY, 2001).

Resistenzfaktoren können aus phytopathologischer Sicht dabei präinfektionell (physikalische oder biochemische Barrieren) oder postinfektionell [Elicitoren, Enzyme, PR-(,Pathogenesis Related') Proteine, Phenole, Phytoalexine] sein. Neben einer möglicherweise genetisch fixierten Resistenz bzw. Toleranz kann die Nutzung von Induzierter Resistenz (IR) als Alternative zum Schutz vor Pathogenbefall genutzt werden, wobei die IR zu den postinfektionellen Abwehrmechanismen der Pflanze zählt und bereits in einer Vielzahl höherer Pflanzen beobachtet werden konnte (STICHER et al., 1997).

Als erste endogene Signalsubstanz nach einer Resistenzinduktion (systemisch induzierte Resistenz, sIR) wurde die Salicylsäure beschrieben, deren Konzentration in mit *Tobacco mosaic virus* (TMV) befallenen, resistenten Tabakpflanzen ansteigt (MALAMY et al., 1990).

Nach MURPHY et al. (1999) kann zwischen zwei verschiedenen Signalwegen unterschieden werden: PR-Proteine, welche effektiv gegen Pilze und Bakterien wirken und einer viruspezifischen Reaktion, welche die Replikation des Virus oder den Langstreckentransport unterbinden kann. Viele IR-Reaktionen sind nur in dikotylen Pflanzen beschrieben worden.

Eine systemisch induzierte Resistenz in Gerste gegenüber dem *Brome mosaic virus* (BMV) zeigte, dass applizierte Kulturfiltrate von Pilzen bzw. Bakterien zu einem verringerten Virusgehalt und geringerer Symptomausprägung bei einer anschließenden Infektion mit BMV führten (MAISS, 1987).

Versuche zur chemisch induzierten Resistenz mit 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA), einem synthetischen Analogon der Salicylsäure, zeigten im Durchschnitt der analysierten Genotypen eine Verringerung des Virustiters durch DCINA-Behandlung, jedoch keine signifikanten Effekte auf den relativen Kornertrag pro Pflanze nach einer *Barley yellow dwarf virus* Infektion in Gerste (WEISKORN et al., 2004).

2.2.4 Gentechnischer Ansatz zur Erzeugung von BYDV-Resistenz

Die Methoden zur Inkorporation von Genen in Pflanzen teilen sich in direkte, wie z.B. Elektroporation, Biolistik, PEG (Polyethylenglycol) vermittelte Transformation und indirekte, wie z.B. Agrobakterium vermittelte Transformation, wobei auch andere Bakterien und Viren für einen Gentransfer genutzt werden können (CHUNG et al., 2006). Die erste Anwendung gentechnischer Verfahren zur Erzeugung von Virusresistenz war die künstliche Expression von Hüllprotein in Tabakpflanzen, um den Befall mit *Tobacco mosaic virus* (TMV) zu vermindern (POWELL-ABEL et al., 1986). Der Resistenzgrad kann dabei von kompletter Immunität der Pflanze bis zu einer Verzögerung der Symptomausprägung reichen. In einigen Fällen wirkt die Resistenz gegen unterschiedliche Stämme des Virus von dem das Hüllprotein stammt, andererseits kann die Wirksamkeit auch nahe verwandte Viruspezies umfassen (LOMONOSSOFF, 1995).

Trotz zahlreicher Studien sind die molekularen Mechanismen, die zu einer Hüllprotein vermittelten Resistenz (*Coat protein mediated resistance*, CPMR) führen, nicht genau bekannt (PRINS et al., 2008).

Im Gegensatz zur CPMR werden bei der Replikase-vermittelten Resistenz Gene verwendet, welche für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase kodieren. GOLEMBOWSKI et al. (1990) berichteten von einer Inhibierung der Virusreplikation und einer Virusstamm-spezifischen Resistenz bei transformierten Tabakpflanzen. Die Methode der Replikase-vermittelten Resistenz ist auch für weitere Viren beschrieben worden (PRINS et al., 2008).

Eine breitere Widerstandsfähigkeit als bei einer Hüllprotein- oder Replikase-vermittelten Resistenz kann in transgenen Pflanzen durch die Expression von nichtfunktionalen oder veränderten Movementproteinen erreicht werden (PRINS et al., 2008). Die Resistenz beschränkt sich dabei nicht nur auf das Virus von dem die Movementproteinsequenz abgeleitet wurde (TMV), sondern umfasst auch taxonomisch entfernte Viren, indem die Plasmodesmata modifiziert werden und der Virustransport gehemmt wird (COOPER et al., 1995).

Eine weitere, zur Etablierung von Virusresistenz genutzte Methode um eine Expression der viralen RNA oder DNA in der Pflanze zu verhindern, ist das *Post transcriptional gene silencing* (PTGS) (PLASTERK UND KETTING, 2000), welches auch natürlicherweise vorkommt und durch einen Virusbefall in der Pflanze ausgelöst werden kann (*Virus induced gene silencing*, VIGS) (ANANDALAKSHMI et al., 1998). Die Stilllegung (*Silencing*) der entsprechenden Gene basiert dabei auf Sequenzhomologie und ist ein grundlegender Regulationsmechanismus in vielen Organismen (BINGHAM, 1997), wobei sich der Phänotyp in einem reduzierten Level der spezifischen mRNA äußert (ANANDALAKSHMI et al., 1998). Die Anwesenheit von Mehrfachkopien der transgenen, genomischen Sequenz vermittelt dabei Resistenz gegenüber der Infektion mit cytoplasmatisch replizierenden Viren. Sequenzhomologie kann zum einen durch die Expression Virus-spezifischer antisense-RNA erreicht werden, was zu doppelsträngigen Sequenzabschnitten und silencing führt, oder über ein Hairpinkonstrukt, welches direkt doppelsträngige RNA für das PTGS (s.u.) bereitstellt. Eine Erweiterung der Nutzung von Hairpin-RNA ist die Einfügung eines Introns in das Hairpinkonstrukt, welches einen Verstärkungseffekt der Stilllegung der entsprechenden Gene bewirkt (WESLEY et al., 2001).

Das PTGS wird ausgelöst von doppelsträngiger RNA (dsRNA), wie sie auch während der Virusreplikation zustande kommt, und diese muss identisch mit der zu degradierenden RNA über ca. 23 Nukleotide (nt) Länge sein (HARRISON UND ROBINSON, 2005). HAMILTON UND BOULCOMBE (1999) entdeckten, dass kurze RNA-Moleküle (siRNA, *small interfering RNA*) mit einer Länge von 21 nt bis 25 nt am Silencing beteiligt sind.

Die kürzeren Moleküle sind dabei für das PTGS verantwortlich, während längere Moleküle als Kandidaten für ein sequenzspezifisches Silencing-Signal fungieren, das sich systemisch in der Pflanze ausbreitet (HAMILTON et al., 2002). Die kurzen siRNAs werden aus dsRNA von einer Endonuklease (DICER) geschnitten und als ssRNA in einen Nuklease enthaltenden Komplex (RISC) eingefügt, der weitere pflanzenspezifische Proteine enthält, die dabei helfen den Komplex an die komplementäre mRNA oder virale ssRNA zu leiten, welche dann verdaut wird (HARRISON UND ROBINSON, 2005). Die RNA-Heterodimere dirigieren dabei nicht nur die direkte Degradierung von dsRNA sondern auch die DNA-Methylierung im Zellkern (Silencing von Transposablen Elementen) und fungieren durch den Transport von Zelle zu Zelle als systemisches Signal (WATERHOUSE et al., 2001).

Bei der Gerste sind einige BYDV-Resistenzen, die auf gentechnischem Wege erzeugt wurden beschrieben worden. McGRATH et al. (1997) erzeugten resistente Gerstenpflanzen, indem sie durch Partikelbeschuss die Hüllproteinsequenz des BYDV-PAV unter Einfluß eines Blumenkohlmosaikvirus (CaMV, *Cauliflower mosaic virus*) 35S Promotors erfolgreich in das Genom der anfälligen Sorte 'Golden Promise' integrierten.

Ebenfalls in der Gerstensorte 'Golden Promise' konnten WANG et al. (2000) eine Immunität gegenüber BYDV-PAV generieren: Hier wurde ein Konstrukt mit einem Inverted-Repeat aus der Polymerasesequenz des BYDV in Verbindung mit einer Polyubiquitinpromotorsequenz aus Mais und der Transkriptionsterminationssequenz aus *Agrobacterium tumefaciens* erfolgreich in Pflanzen exprimiert und führte zu einer Hairpin-dsRNA sowie letztendlich zu PTGS.

2.3 Molekulare Marker

Nach BECKER (1993) versteht man unter einem molekularen Marker ein DNA-Segment, das selbst keine Beziehung zu dem jeweiligen Zuchtziel hat aber mit dem interessierenden Merkmal gekoppelt vererbt wird. Vor der Entdeckung von molekularen Markern wurden biochemische, zytologische oder morphologische Marker für die Bestimmung von genetischen Distanzen verwendet (TANKSLEY, 1983). Besonders morphologische Marker können jedoch in hohem Maße umweltabhängig und züchterisch unerwünscht sein, weshalb sich molekulare Marker, die auf Unterschieden in der DNA-Sequenz beruhen und bei der Verwendung von nicht-codierenden Sequenzabschnitten keinen direkten Einfluss auf den Phänotyp der Pflanze haben, heutzutage durchgesetzt haben. Mit der Verwendung von codominanten Markern können Genotypen bezüglich ihrer Zygotie unterschieden werden (TANKSLEY, 1993), und die große Anzahl an molekularen Markern ermöglicht die Erstellung von genetischen Kopplungskarten mit hoher Markerdichte.

Die ersten Marker auf Nukleinsäurebasis waren die RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN et al., 1980). Die Entwicklung der PCR (*Polymerase Chain Reaction*) von SAIKI (1985) lieferte die Basis für weitere effektive Markersysteme, wie z.B. SSRs (*Simple Sequence Repeats*; TAUTZ, 1989), RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*; WILLIAMS et al., 1990), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; ZABEAU UND VOS, 1993), CAPSs (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*; PARSONS UND HEFLICH, 1997) oder eine direkte Detektion von SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (SYVÄNEN et al., 1990).

Mit der Entwicklung molekularer Marker für die genannten BYDV-Toleranzen, insbesondere die *Ryd2*-Toleranz, ist die Züchtung BYDV-toleranter Gerstensorten einfacher geworden.

Der erste Marker für eine indirekte Selektion auf *Ryd2* wurde von HOLLOWAY UND HEATH (1992) entwickelt. Sie entdeckten zwei Polypeptide mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten, welche eine Differenzierung zwischen Trägern von *Ryd2* und anfälligen Genotypen ermöglichten. Für eine Charakterisierung von BYDV-resistenten und anfälligen Genotypen wurde ein Western-Blot etabliert, der eine Unterscheidung ohne aufwändige Inokulationsversuche mit Blattläusen ermöglicht. Auf Basis einer Population der Kreuzung 'Shannon' (*Ryd2*⁺) x 'Proctor' (*Ryd2*⁻) und einer 26,7 cM umfassenden Karte der Genomregion um den *Ryd2*-Locus wurde das Gen von COLLINS et al. (1996) auf Chromosom 3H kartiert. In diesem Zusammenhang konnten zwei RFLP-Marker identifiziert werden, welche mit *Ryd2* cosegregieren. PALTRIDGE et al. (1998) entwickelten mit AFLP-Analysen einen codominanten PCR-Marker, YLM, ca. 0,7 cM vom *Ryd2*-Locus entfernt. Die Effektivität von YLM wurde von JEFFERIES et al. (2003) in einem Marker-gestützten Introgressionsprogramm evaluiert und bestätigt. Ausgehend von den von HOLLOWAY UND HEATH (1992) entdeckten Polypeptiden mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten konnten FORD et al. (1998) durch cDNA-Analyse zeigen, dass diese eine hohe Homologie zu der Untereinheit E der vakulären H⁺-ATPase aufweisen und dass der Unterschied in der Aminosäuresequenz auf einem einzigen SNP beruht.

Mit einem allelspezifischen Primerpaar für eine PCR-Amplifikation mit anschließendem Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym *Nla*III wurde ein eng gekoppelter codominanter CAPS Marker, Ylp, entwickelt. OVESNÁ et al. (2000) untersuchten 24 Sommer- und Wintergerstensorten mit unterschiedlicher Toleranz gegenüber BYDV anhand der diagnostischen Marker YLM und Ylp. Für Ylp stimmten die Resistenztests im Feld mit den genetischen Untersuchungen überein. Der YLM-Marker korrelierte mit den Ergebnissen der Feldexperimente lediglich für Sommergerste, jedoch nicht für Wintergerste. Für *Ryd3*, die BYDV-Toleranz aus 'L94' konnten NIKS et al. (2004) gleich mehrere SSR-Marker identifizieren, welche mit dem Toleranzlocus cosegregieren.

Schließlich stehen für die von SCHEURER et al. (2001) entdeckten QTL teilweise einfach zu handhabende Marker zur Verfügung (z.B. Bmac067 und Ylp auf Chromosom 3HL), während für weitere QTL lediglich AFLP-Marker bekannt sind. Entsprechende Marker für BYDV-Toleranz sind auch aus den Arbeiten von TOOJINDA et al. (2000) bekannt.

2.4 Genexpressionsanalyse

Für Genexpressionsanalysen sind unterschiedliche Techniken beschrieben worden. Zum einen wurde die AFLP-Technik (Vos et al., 1995), welche in der Pflanzenzüchtung relativ große Verbreitung gefunden hat und den RFLP-Ansatz (BOTSTEIN et al., 1980) mit der PCR-Technologie (SAIKI, 1985) verbindet, von BACHEM et al. (1996) auf die Verwendung von cDNA als Template in der AFLP-Reaktion ausgeweitet. Die cDNA wird zunächst mit einem statistisch selten schneidenden Enzym (z.B. *EcoRI*) und einem statistisch häufig schneidenden Enzym (z.B. *MseI*) verdaut. Anschließend werden an die Enden Adapter ligiert, die als Primerbindungsstellen für die nachfolgenden PCR-Amplifikationen dienen. Durch den Einsatz von selektiven Basen am 3'-Terminus der Primer kann die Anzahl der amplifizierten Fragmente stark eingeschränkt werden. BACHEM et al. (1996) führten mit dieser Methode Untersuchungen zur differentiellen Genexpression bei der Kartoffel durch. Mithilfe des cDNA-AFLP können exprimierte Gene als Fragmente in Polyacrylamidgelen dargestellt werden, und eine gewisse Differenzierung von quantitativen Unterschieden ist möglich.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Expressionsunterschieden ist die Methode der substraktiven Hybridisierung (LEE et al., 1991). Hierfür wird die isolierte mRNA als cDNA (Tester) mit der jeweiligen mRNA der Kontrolle hybridisiert und damit identische mRNAs herausgefiltert, so dass in der folgenden Auftrennung über eine Gelmatrix lediglich Unterschiede des Transkriptom von Tester und Kontrolle dargestellt werden. Entscheidend ist, dass die zu hybridisierenden Proben sehr nahe verwandt sind, um eine möglichst schnelle und effiziente Eliminierung von identischen mRNAs zu erreichen (LEE et al., 1991). Die Methode des *Differential Display* nutzt hingegen die PCR zur Darstellung differentiell exprimierter Gene (LIANG UND PARDEE, 1992). Hierbei werden Primer verwendet, die am Poly(A)tail der isolierten mRNA binden und zusätzlich zwei selektive Basen am 3'-Ende beinhalten. Für die Amplifikation des 5'-Endes werden kurze Primer von 10 Nukleotiden Länge verwendet, welche zufällig binden. Es können Fragmente bis zu 500 bp Länge erreicht werden, die sich in Polyacrylamidgelen darstellen lassen (LIANG UND PARDEE, 1992).

Des Weiteren können für die Analyse von Expressionsunterschieden Microarrays verwendet werden. Diese bestehen aus einer Glasmatrix (Chip), an die auf kleinstem Raum eine große Zahl unterschiedlicher Nukleinsäureproben bekannter Sequenz gebunden sind (SCHENA et al., 1995).

Isolierte RNA oder cDNA wird enzymatisch markiert, komplementäre Nukleinsäuren hybridisieren spezifisch am Array und können über Fluoreszenzdetektion quantitativ ausgewertet werden (LEMIEUX et al., 1998). Ein bedeutender Vorteil der Microarrays ist der hohe Probendurchsatz durch die gleichzeitige Analyse vieler ESTs (*expressed sequence tag*), wie es von TOMMASINI et al. (2008) in einer Untersuchung des Gerstetranskriptoms bei Trockenstress durchgeführt wurde. Für Gerste steht u.a. ein kommerziell erhältlicher Microarray (*Barley1 Affymetrix Microarray*) zur Verfügung (CLOSE et al., 2004).

Im Gegensatz zu Hybridisierungen auf Microarrays ist im cDNA-AFLP eine geringe Menge an RNA als Ausgangsmaterial erforderlich, und durch die Ligation von Adaptern an die verdauten cDNA-Fragmente kann eine spezifische PCR durchgeführt werden, die zu einer guten Reproduzierbarkeit und weniger Falschpositiven führt, als bei dem mRNA *Differential Display* Ansatz (LIANG UND PARDEE, 1992).

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

Das verwendete Pflanzenmaterial bestand aus doppelhaploiden (DH) Gerstenlinien (*Hordeum vulgare* L.) der Kreuzung 'Post' x 'Vixen', die durch Antherenkultur im Resistenzlabor der Saaten-Union, Hovedissen, erstellt wurden (vgl. SCHEURER, 2000).

Die englische Sorte 'Vixen' war die erste in Europa zugelassene Varietät, welche das BYDV-Toleranz vermittelnde Gen *Ryd2* enthält (PARRY UND HABGOOD, 1986). Die Sorte 'Post' ist eine Entwicklung des CIMMYT (*Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo*), Mexiko, und ist ebenfalls tolerant gegenüber BYDV. SCHEURER et al. (2001) zeigten durch QTL-Analysen, dass diese Toleranz auf Chromosom 2H lokalisiert ist, im Gegensatz zum

Tab. 3.1: Für die cDNA-AFLP Analysen ausgewählte Gerstengenotypen

Sorte/Linie	Genotyp	
	<i>Ryd2</i>	QTL auf 2H
Post	-	+
DH21-9	-	+
Vixen	+	-
DH21-50	+	-
DH21-136	+	+
Nixe	-	-
DH21-60	-	-

dominanten Gen *Ryd2* aus äthiopischen Landsorten, welches auf Chromosom 3H kartiert.

Von sieben verschiedenen Linien und Sorten wurden jeweils 36 Körner ausgesät. Ausgewählt wurden die Sorten und DH-Linien nach der bekannten Allelkonstitution (SCHEURER, 2000), d.h. dem Vorhandensein oder der Abwesenheit des *Ryd2* Gens bzw. des QTL auf Chromosom 2H (Tab. 3.1).

Die Körner der DH-Linien ('Post' x 'Vixen') sowie der Elternlinien und der als anfällig beschriebenen

Sorte 'Nixe' wurden in Aussaat-schalen mit Einheitserde Typ P (Einheitserde- und Humuswerke, Sinntal-Jossa) in einem klimatisierten Kulturraum bei einer Temperatur von 18°C, einer relativen Luftfeuchte von 70 % und einer Beleuchtung von 10 kLux für 16 h angezogen. Die Kulturdauer nach der Virusinfektion (s.u.) bis zur Entwicklung des dritten Blattes betrug weitere 3,5 Wochen. Das voll entwickelte dritte Blatt der Gerstenpflanzen wurde geerntet. Dabei wurde die eine Hälfte mit der Blattspitze für den DAS-ELISA (siehe unten) direkt in einen Mörser überführt und die übrige Blatthälfte für eine RNA-Extraktion sofort in einem 2 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff (-196°C) tiefgefroren. Die Lagerung des Blattmaterials erfolgte in einem Gefrierschrank bei -80°C.

3.2 Virusinfektion der Pflanzen

Die Virusinfektion erfolgte indirekt mit Hilfe von Vektoren. Verwendet wurde das Virusisolat BYDV-PAV-ASL1 (Aschersleben 1), wofür die Haferblattlaus (*Rhopalosiphum padi*) als Vektor diente. Von jeder Linie bzw. Sorte wurde jeweils die eine Hälfte des Pflanzenmaterials (18 Pflanzen) mit Virus tragenden Blattläusen besiedelt. Pro Pflanze wurden im Einblattstadium 10 ungeflügelte adulte Tiere aufgesetzt. Die übrigen 18 Pflanzen dienten als nicht infizierte Kontrolle. 24 h nach der Besiedlung wurden die Blattläuse durch eine Behandlung aller Pflanzen mit Pirimor (Syngenta agro, Maintal), einem spezifischen Insektizid gegen Blattläuse mit dem Wirkstoff Pirimicarb, abgetötet.

3.3 *Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (DAS-ELISA)

Zur Bestimmung des Virustiters in dem Blattmaterial wurde ein DAS-ELISA in Anlehnung an CLARK UND ADAMS (1977) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden pro Probe 0,1 ml Beschichtungspuffer (Tab. 3.2) in 96er Testplatten aus Polystyrol (HBS, Mikrolon der Firma Greiner) gefüllt. Die im Puffer in einer Konzentration von 1:200 gelösten, für BYDV spezifischen Immunglobuline der Klasse G (IgG BYDV[87]ASL v.2.7.96/22.1.03) lagerten sich nach Inkubation für 4 h bei 37°C an die Innenwände der Plattenvertiefung an. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Spülen mit Waschpuffer (Tab. 3.2) entfernt. Je Pflanze wurden ca. 100 mg Blattmaterial unter Zugabe von 900 µl Extraktionspuffer (Tab. 3.2) und 50 mg Seesand in einem Mörser homogenisiert. Von diesem Saft wurden 100 µl in die beschichtete Platte überführt und abgedeckt über Nacht bei 4°C inkubiert, wobei die Viruspartikel im Pflanzenpresssaft einen festen Komplex mit den spezifischen Antikörpern eingehen. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschpuffer, um die nicht gebundenen Viruspartikel zu entfernen, erfolgte die Konjugatzugabe. Das Konjugat (BYDV[87]ASL v.30.8.00/1.11.02) ist ein enzymmarkierter (alkalische Phosphatase) Antikörper, der in einer Konzentration von 1:5000 (v/v) im Konjugatpuffer (Tab. 3.2) gelöst wurde und von dem 0,1 ml in die ELISA-Platte pipettiert wurde.

Die Platten wurden für 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend 3x gewaschen, um nicht gebundene Enzymkomplexe zu entfernen. Abschließend wurden 200 µl Substrat (Paranitrophenylphosphat, p-NPP, Serva) zugegeben, welches kurz vor der Verwendung in Substratpuffer (Tab. 3.2) im Verhältnis 1: 1000 (w/v) gelöst wurde.

Material und Methoden

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln, wobei das p-NPP von der alkalischen Phosphatase gespalten wird und gelbes Nitrophenol entsteht, welches quantitativ über die optische Dichte, bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Photometer (Opsys MR der Fa. Thermo) bestimmt wurde. Höhere Messwerte stehen dabei für mehr Enzymmoleküle, die in dem Komplex von Antikörper-Virus-enzymkonjugierter Antikörper gebunden sind; d.h. das Messergebnis steht im Verhältnis zur Virusmenge in der Probe. Die Extinktion wurde nach Substratzugabe in dreißigminütigem Abstand bis zum Erreichen konstanter Messwerte nach 60 min bestimmt.

Tab. 3.2: Reagenzien und Lösungen für DAS-ELISA

Reagenz (Hersteller)	Konz. in Lsg.
Beschichtungspuffer (pH 9.6)	
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃ (Roth, Karlsruhe)	15 mM
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃ (Roth)	35 mM
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
PBS (pH 7.4)	
Natriumchlorid, NaCl (Roth)	137 mM
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄ (Roth)	1,5 mM
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O (Roth)	7,1 mM
Kaliumchlorid, KCl (Roth)	2,68 mM
H ₂ O _{dest}	ad 6 l
Waschpuffer (pH 7.4)	
PBS (s.o.)	5 l
Tween-20 (Serva, Heidelberg)	0,01 % (v/v)
Extraktionspuffer	
PBS (s.o.)	100 ml
Polyvinylpyrrolidone 25, (C ₆ H ₉ NO) _n (Serva)	2 % (w/v)
Trockenmilch (Roth)	0,2 % (w/v)
Tween-20 (Serva)	0,00005 % (v/v)
Substratpuffer (pH 9.8)	
Diethanolamin, C ₄ H ₁₁ NO ₂ (Roth)	9,5 % (v/v)
Magnesiumchlorid-hexahydrat, MgCl ₂ ·6 H ₂ O (Roth)	1 mM
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
Substratpuffer (s. o.)	20 ml
Paranitrophenylphosphat (p-NPP, Serva)	1:1000 (w/v)
Alle Lösungen wurden mit destilliertem Wasser (H ₂ O _{dest} , VE-Wasser) hergestellt.	

3.4 cDNA-AFLP

3.4.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA (tRNA) der Blattproben erfolgte modifiziert nach einer Methode von CHOMCZYNSKI UND SACCHI (1987). Die bei -80°C gefrorenen Blattstücke wurden in flüssigem Stickstoff vermahlen und in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt. Es wurden ca. 150 mg Blattmaterial pro Probe verwendet, wobei das pulverisierte Pflanzenmaterial nach Volumen und nicht nach Gewicht abgemessen wurde. Dieses wurde sofort mit 800 μl Lösung D (siehe Tab. 3.3) versetzt und kräftig durchmischt. Es folgte die Zugabe von 80 μl 2 M Natriumcitrat, 800 μl Phenol und 160 μl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v), wobei nach jeder Zugabe kurz geschüttelt wurde. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurde für 20 min bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 800 μl Isopropanol vermischt. Nach einer Inkubation von 20 min bei -20°C wurde für 15 min bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μl Lösung D gelöst. Ungelöste Bestandteile wurden durch eine weitere Zentrifugation für 5 min bei RT und 10.000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und für 15 min bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet wurde 1 ml Ethanol (75 %, v/v) hinzugefügt und geschüttelt. Es wurde für 5 min bei RT und 10.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die RNA wurde kurz getrocknet, mit 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ (Reinstwasseranlage: Aquintus LS TI, membraPure GmbH, Bodenheim) versetzt, für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend bei -80°C tiefgefroren. Die Qualität der RNA wurde auf einem Formaldehyd-Agarosegel (Tab. 3.3) überprüft. Dafür wurden 2 μl RNA mit 10 μl RNA-Ladepuffer (Tab. 3.3) vermischt, bei 85°C 10 min denaturiert, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x MOPS (Tab. 3.3) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90 V für 40 min.

Tab. 3.3: Lösungen und Reagenzien für die RNA-Extraktion

Reagenz (Hersteller)	Konz. / Anteil
Lösung D	
Guanidinium-thiocyanat, $\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{CHNS}$ (Fluka, Buchs, CH)	4 M
Natriumdihydrogencitrat, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$ (Fluka), pH 7.0	25 mM
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz, $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{NNaO}_3$ (Fluka)	0,5 % (w/v)
2-Mercaptoethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ (Serva, Heidelberg)	0,1 M
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	ad 100 ml
Formaldehyd-Agarosegel	
Agarose Standard (Applichem, Darmstadt)	1,2 % (w/v)
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ (Roth)	1 M
Formaldehyd 37 %, CH_2O (Fluka)	17,8 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	ad 50 ml
Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)	
Chloroform/Trichlormethan, CHCl_3 (Roth)	96 % (v/v)
Isoamylalkohol/3-Methyl-1-butanol, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ (Roth)	4 % (v/v)
Phenol, in Wasser gesättigt (Roti-Aqua-Phenol, Roth)	100 %
Natriumdihydrogencitrat, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$ (Fluka), pH 4.3	2 M
Isopropanol/2-Propanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ (Roth)	100 %
Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (Roth)	75 % (v/v)
MOPS, $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ (Roth)	1x (w/v)
RNA-Ladepuffer	
MOPS (5x [w/v]), $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ (Roth)	10 % (v/v)
Formaldehyd 37 %, CH_2O (Fluka)	17,5 % (v/v)
Formamid deionisiert, CH_3NO (Roth)	50 % (v/v)
Ethidiumbromidlösung (EtBr), $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$ (Roth)	22,5 % (v/v)
Für alle Lösungen und Verdünnungen wurde Reinstwasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$) verwendet (Reinstwasseranlage: Aquintus LS TI, membraPure GmbH, Bodenheim).	

3.4.2 Gewinnung von mRNA

Die selektive Isolierung von mRNA (poly A⁺ RNA) aus Gesamt-RNA wurde mit Dynabeads der Firma Dynal (Invitrogen, CA, USA) nach Protokoll 0201 durchgeführt. 96 µl tRNA wurden zuvor mit 4 µl RNAsecure Reagent [25x (Tab. 3.4)] versetzt und für 10 min bei 60°C erwärmt. Die isolierte mRNA wurde in 10 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

3.4.3 Synthese doppelsträngiger cDNA

Ausgehend von der mRNA wurde doppelsträngige cDNA synthetisiert.

Basierend auf der Methode von OKAYAMA UND BERG (1982) erfolgte die Erststrangsynthese mit Random Hexameren und Oligo dT(18) Primern (Reagenzien s. Tab. 3.4). Zu 8 µl mRNA wurden 1 µl Random Hexamer Mix (2 µg·µl⁻¹), 1 µl Oligo dT(18) Primer (300 ng·µl⁻¹) und 2 µl RNAsecure Reagent (1x) hinzugefügt, 5 min bei 75°C inkubiert und auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 4 µl Puffer der Reversen Transkriptase (5x), 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl SUPERase.In (20 U·µl⁻¹). Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde 1 µl RevertAid H⁺ Reverse Transkriptase (200 U·µl⁻¹) hinzugefügt und für 10 min bei RT, anschließend 1 h bei 45°C und danach 10 min bei 65°C inkubiert.

Für die Zweitstrangsynthese wurden den 20 µl der Erststrangreaktion 10 µl *Escherichia coli* DNA Polymerase Puffer (10x), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 65,4 µl H₂O_{reinst}, 2,5 µl *E. coli* DNA Polymerase I (10 U·µl⁻¹) und 0,1 µl RNase H (5 U·µl⁻¹) hinzugegeben. Es folgten Inkubationen für 3 h bei 14°C und 10 min bei 65°C. Abschließend wurden 11 µl *E. coli* DNA Ligase Puffer (10x) und 1 µl *E. coli* DNA Ligase (10 U·µl⁻¹) zugefügt und über Nacht (ÜN) bei 14°C inkubiert.

Tab. 3.4: Reagenzien für die mRNA-Aufreinigung und cDNA-Synthese

Reagenz (Hersteller)	Konzentration
RNAsecure Reagent (Ambion, Applied Biosystems, Warrington, UK)	25x
Random Hexamer Mix (Roche, Grenzach)	2 µg·µl ⁻¹
Oligo dT(18) Primer (Operon, Köln)	300 ng·µl ⁻¹
Puffer für Reverse Transkriptase (Fermentas, St.Leon-Rot)	5x
RevertAid H ⁺ Reverse Transkriptase (Fermentas)	200 U·µl ⁻¹
dNTP-Mix (Fermentas)	10 mM
SUPERase.In (Ambion)	20 U·µl ⁻¹
<i>E. coli</i> DNA Polymerase Puffer (Fermentas)	10x
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I (Fermentas)	10 U·µl ⁻¹
RNase H (Fermentas)	5 U·µl ⁻¹
Puffer für <i>E. coli</i> DNA Ligase [New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.]	10x
<i>E. coli</i> DNA Ligase (NEB)	10 U·µl ⁻¹
Für alle Lösungen und Verdünnungen wurde Reinstwasser (H ₂ O _{reinst}) verwendet.	

3.4.4 cDNA-AFLP Analyse

Die AFLP (Amplified fragment length polymorphism) Analyse wurde nach Vos et al. (1995) unter Verwendung des AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen, CA, USA) durchgeführt. Die hier angewandte Methode der cDNA-AFLPs wurde erstmals von BACHEM et al. (1996) beschrieben. Ca. 150 ng der extrahierten cDNA (die isolierte Gesamtmenge) wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (5'-G/AATTC-3') und *MseI* (5'-T/TAA-3') nach Angaben des Herstellers verdaut und die im Kit enthaltenen Adapter ligiert.

Material und Methoden

Es wurde eine 1:10 Verdünnung des Ligationsansatzes in TE-Puffer (Tab. 3.22) für die weiteren Prä-Amplifikationsschritte verwendet, wobei sowohl die +0 Prä-Amplifikation, als auch die +1 Prä-Amplifikation für die weitere Verwendung 1:10 in TE-Puffer verdünnt wurden. Pro Genotyp wurden jeweils 5 µl der jeweiligen 1:10 Verdünnung in der folgenden Reaktion eingesetzt. Zunächst wurde eine +0 Prä-Amplifikation mit nicht-selektiven AFLP Primern (E-00 und M-00) durchgeführt, welche komplementär zu den Adaptersequenzen sind, um unspezifischen Hintergrund bei der späteren Auftrennung in Polyacrylamidgelen zu reduzieren (SCHIEMANN, 1999). Es folgten eine +1 Prä-Amplifikation mit Primern mit einer zusätzlichen selektiven Base am 3'-Ende (*EcoRI*+1 [E01-E04] und *MseI*+1 [M01-M04]) und die +2 Amplifikationen mit zwei selektiven Basen an den 3'-Enden der Primer. Insgesamt wurden 256 *EcoRI*+2/*MseI*+2 Primerkombinationen analysiert (E11-E26 bzw. M11-M26 nach der Nomenklatur von Keygene N.V., Wageningen, NL), wobei jeweils der *EcoRI*-Primer mit dem Farbstoff Cy5 (Indodicarbocyanin) markiert war. Die +1 Amplifikationen wurden in „Bulks“ von jeweils drei Genotypen der gleichen Sorte/DH-Linie zusammengestellt, um einzelpflanzenspezifische Unterschiede zu minimieren. Es wurden jeweils 3 Pflanzen der gleichen Sorte/Linie (siehe Tab. 3.1) getrennt aufgearbeitet und die +1 AFLP-DNA dieser 3 Pflanzen gemeinsam in den +2 Amplifikationen verwendet (z.B. 3x 'Post' oder 3x DH21-9). Die Primersequenzen sind in Tab. 3.5 und Tab. 3.8 aufgeführt, die Reaktionsansätze in den Tabellen 3.6 und 3.9 und die Amplifikationsprogramme sind in Tab. 3.7 und Tab. 3.10 dargestellt. Alle PCR-Amplifikationen dieser Arbeit wurden im Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems) durchgeführt.

Tab. 3.5: Primersequenzen für die +0/+1 Präamplifikationen (Fett: selektive Nukleotide)

Primer (Nomenklatur: Keygene N.V.)	Sequenz
<i>EcoRI</i> +0	5'-GAC TGG GTA CCA ATT C-3'
<i>MseI</i> +0	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'
<i>EcoRI</i> +1 (E01-E04)	5'-GAC TGG GTA CCA ATT C A/ T/ C/ G -3'
<i>MseI</i> +1 (M01-M04)	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A A/ T/ C/ G -3'

Tab. 3.6: Zusammensetzung des +0/+1-Präamplifikationsansatzes

Reagenz (Konz., Hersteller)	Endkonzentration
Puffer (10x, Qiagen)	1x
MgCl ₂ in Puffer (15 mM, Qiagen)	1,5 mM
dNTPs (10mM, Fermentas)	0,2 mM
<i>EcoRI</i> -Primer +0 (50 ng·μl ⁻¹)	75 ng
<i>MseI</i> -Primer +0 (50 ng·μl ⁻¹)	75 ng
Taq Polymerase (5 U·μl ⁻¹ , Qiagen)	1 U
H ₂ O _{reinst}	ad 45 μl

Tab. 3.7: Thermocyclerprogramm für die +0/+1-Präamplifikation

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min	
94°C	30 sek	} 20
56°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Tab. 3.8: Primersequenzen für die +2 selektive Amplifikation

Primer (Nomenklatur: Keygene N.V.)	+2 selektive Basen (XX wird pro Primer ersetzt durch)			
<i>EcoRI</i> +2 (E11-E26)	AA	TA	CA	GA
5'-[Cy5]-GAC TGG GTA CCA ATT C-XX-3'	AT	TT	CT	GT
<i>MseI</i> +2 (M11-M26)	AC	TC	CC	GC
5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-XX-3'	AG	TG	CG	GG

Durch die Kombinationsmöglichkeit von jeweils 16 unterschiedlichen *EcoRI*+2 Primern und 16 verschiedenen *MseI*+2 Primern ergeben sich insgesamt 256 *EcoRI*+2/*MseI*+2 PCR-Kombinationen.

Tab. 3.9: Zusammensetzung des +2 Amplifikationsansatzes

Reagenz (Konz., Hersteller)	Endkonzentration
Puffer (10x, Qiagen)	1x
MgCl ₂ (25 mM, Qiagen)	2,5 mM (davon 1,5 mM aus 10x Puffer)
dNTPs (10mM, Fermentas)	0,2 mM
<i>EcoRI</i> -Primer +0 (50 ng·μl ⁻¹)	10 ng
<i>MseI</i> -Primer +0 (50 ng·μl ⁻¹)	30 ng
Taq Polymerase (5 U·μl ⁻¹ , Qiagen)	0,2 U
H ₂ O _{reinst}	ad 15 μl

Tab. 3.10: Thermocyclerprogramm für die +2 Amplifikation

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min	
94°C	30 sek	12 (-0,7°C-Zyklus ⁻¹)
65°C	30 sek	
72°C	1 min	
94°C	30 sek	22
56°C	30 sek	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Die Auftrennung der AFLP-Fragmente erfolgte mit den automatischen Sequenziergeräten ALFexpress (Pharmacia Biotech) und 4300 DNA-Analyzer (Li-Cor Biosciences). Für den ALFexpress wurden 2 µl PCR-Produkt in 3 µl Ladepuffer (5 mg Blue Dextran 2000 [Pharmacia Biotech AB] in 1 ml deionisiertem Formamid [Roth]) verdünnt, 2 Minuten bei 95°C denaturiert und auf die Gelmatrix (ReproGel-High Resolution [GE Healthcare]) mit einer Trennstrecke von 200 mm bei einer Stärke von 0,3 mm geladen. Die Fragmente wurden für 6 h 40 min in 1x TBE-Puffer (Tab. 3.11) bei 1500 V, 60 mA, 30 W bei 50°C aufgetrennt und fluoreszenzmarkiert bei 632,8 nm detektiert. Im Li-Cor 4300 DNA-Analyzer wurden 25 cm lange LongRanger Gele (Tab. 3.12) mit einer Stärke von 0,25 mm verwendet. Nach einem Vorlauf für 30 min (1500 V, 40 mA, 40 W, 48°C) wurden 0,5 µl PCR-Produkt mit 0,5 µl Ladepuffer (Tab. 3.13) versetzt, 3 min bei 94°C denaturiert und 5 h 30 min (1500 V, 40 mA, 40 W, 48°C) in 1x TBE LongRun (Tab. 3.14) elektrophoretisch getrennt mit gleichzeitiger Detektion der Fluoreszenz bei 685 nm.

Tab. 3.11: 10x TBE-Puffer für ALFpress

Reagenz	Konz. in Lsg.
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth)	1 M
Borsäure, H ₃ BO ₃ (Roth)	830 mM
Ethylendiamintetraessigsäure-Dihydrat (EDTA), C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (Roth)	10 mM
H ₂ O _{reinst}	ad 2 l

Tab. 3.12: Zusammensetzung des LongRanger Polyacrylamidgels

Reagenz	Konz. in Lsg.
Polyacrylamid-Gellösung 8 %	
LongRanger Gel Solution 50 % (Cambrex Bio Science, Rockland, CA)	8 % (v/v)
Harnstoff, CH ₄ N ₂ O (Roth)	6993 mM
10x TBE LongRun (Tab 3.13)	1x
H ₂ O _{reinst}	ad 200 ml
Polyacrylamidgel (25 cm, 0,25 mm)	
Gellösung 8 % LongRanger	20 ml
Tetramethylethylendiamin (TEMED), C ₆ H ₁₆ N ₂ (Roth)	0,1 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 %ig, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (Roth)	1 % (v/v)

Tab. 3.13: Zusammensetzung des Ladepuffers

Reagenz	Konz. in Lsg.
Formamid deionisiert, CH ₃ NO (Roth)	95 % (v/v)
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (Roth)	10 mM
Parafuchsin, C ₁₉ H ₁₇ N ₃ HCl (Fluka)	0,1 % (w/v)
Bromphenolblau Na-Salz, C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ Na (Roth)	0,01 % (w/v)
H ₂ O _{reinst}	ad 10 ml

Tab. 3.14: Zusammensetzung des 10x TBE LongRun Puffers

Reagenz	Konz. in Lsg.
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth)	1340 mM
Borsäure, H ₃ BO ₃ (Roth)	450 mM
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (Roth)	25 mM
H ₂ O _{reinst}	ad 2 l

3.5 Charakterisierung polymorpher Fragmente

3.5.1 Fragmentisolierung

Die cDNA-AFLP Gele wurden visuell anhand folgender Kriterien auf Polymorphismen untersucht:

- Fragmente, die ausschließlich in infizierten Pflanzen vorkommen
- Fragmente, die nur in nicht infizierten Pflanzen zu sehen sind
- Fragmente, die allein in der Sorte 'Post' (QTL auf 2H) vorhanden sind
- Fragmente, die nur in der Sorte 'Vixen' (*Ryd2*) vorkommen

Material und Methoden

- Fragmente, die ausschließlich bei der DH-Linie 21-136 (*Ryd2* und QTL auf 2H) erscheinen, unter der Annahme, dass die Kombination von *Ryd2* und des QTL auf 2H aufgrund von Wechselwirkungen möglicherweise ein anderes Transkriptmuster zeigt.

Um die relevanten polymorphen Fragmente isolieren zu können, wurden die entsprechenden AFLP-Reaktionen (3 µl PCR-Produkt) mit 3 µl Ladepuffer (Tab. 3.15) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Das Polyacrylamidgel (Tab. 3.16 [Länge 50 cm, Stärke 0,4 mm]) wurde in der vertikalen Apparatur Sequi-Cell GT (Biorad) mit 1x TBE Puffer (Tab. 3.16) bei 100 W, 60 min auf 50°C vorgeheizt. Die denaturierten Proben wurden für 10 min bei 40 W und 50°C und weitere 90 min bei 100 W und 50°C elektrophoretisch aufgetrennt. Die Färbung der Fragmente erfolgte mit Silbernitrat nach CARLOS et al. (1994). Für die Silberfärbung wurden die Gele 10 min in Fixierlösung (Tab. 3.17) leicht geschwenkt, nach Waschen in H₂O_{dest} 30 min in Färbelösung (Tab. 3.17) getaucht und abschließend in Entwicklerlösung (Tab. 3.17) die Fragmente sichtbar gemacht. Gestoppt wurde die Entwicklungsreaktion mit 10 %iger (v/v) Essigsäure. Die Fragmente wurden nach dem Trocknen des Gels mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils in 25 µl TE-Puffer (Tab. 3.22) gelöst.

Tab. 3.15: Zusammensetzung des Ladepuffers

Reagenz	Konz. in Lsg.
Formamid deionisiert, CH ₃ NO (Roth)	95 % (v/v)
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (Roth)	10 mM
Xylencyanol, C ₂₅ H ₂₇ N ₂ NaO ₆ S ₂ (Roth)	0,025 % (w/v)
Bromphenolblau Na-Salz, C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ Na (Roth)	0,025 % (w/v)
H ₂ O _{reinst}	ad 20 ml

Tab. 3.16: Zusammensetzung der Puffer und des Polyacrylamidgels

Reagenz	Konz. in Lsg.
10x TBE (als Elektrophoresepuffer 1x)	
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth)	891 mM
Borsäure, H ₃ BO ₃ (Roth)	889 mM
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (Roth)	25 mM
H ₂ O _{reinst}	ad 1 l
Harnstofflösung	
Urea, CH ₄ N ₂ O (Roth)	8,4 M
10x TBE (s. o.)	11,2 % (v/v)
H ₂ O _{reinst}	ad 500 ml
Polyacrylamidgel (50 cm, 0,2 mm) 70 ml	
Harnstofflösung	85,5 % (v/v)
Rotiphorese Gel 30, Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Roth)	14,23 % (v/v)
TEMED, C ₆ H ₁₆ N ₂ (Roth)	0,07 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 30 %ig, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (Roth)	0,2 % (v/v)

Tab. 3.17: Lösungen zur Färbung und Entwicklung

Reagenz	Konz. in Lsg.
Fixierlösung/Stopplösung	
Essigsäure, C ₂ H ₄ O ₂ (Roth)	10 % (v/v)
H ₂ O _{reinst}	ad 2 l
Färbelösung	
Silbernitrat, AgNO ₃ (Roth)	5,89 mM
Formaldehyd, CH ₂ O (Roth)	0,05 % (v/v)
H ₂ O _{reinst}	ad 2 l
Entwicklerlösung (< 10°C)	
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃ (Roth)	283 mM
Natriumthiosulfat, Na ₂ S ₂ O ₃ (Sigma)	63 mM
Formaldehyd, CH ₂ O (Roth)	0,05 % (v/v)
H ₂ O _{reinst}	ad 2 l

5 µl der gelösten Fragmente wurden mit den spezifischen +2 AFLP-Primern und den Bedingungen der +2 AFLP Reaktion reamplifiziert (Tab. 3.9 und Tab. 3.10). Die PCR-Produkte wurden mit 3 µl Ladepuffer (Tab. 3.18) versetzt und auf ein 1 %iges Agarosegel (Seakem LE, BioWhittaker Molecular App., Rockland, USA) mit 0,5 µg·ml⁻¹ Ethidiumbromid (EtBr, Tab. 3.18) geladen.

Material und Methoden

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in modifiziertem 1x TAE-Puffer mit geringer EDTA-Konzentration (Tab. 3.18) für 10 min bei 80 V und weitere 50 min bei 100 V. Die Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und über eine Säule (Montage Gel Extraction Kit, Millipore) nach Anleitung des Herstellers aus dem Agarosegel gereinigt.

Tab. 3.18: Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Reagenz (Hersteller)	Konz. in Lsg.
Ladepuffer	
Glycerin wasserfrei, C ₃ H ₈ O ₃ (Roth)	40 % (v/v)
Bromphenolblau Na-Salz, C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ Na (Roth)	0,025 % (w/v)
Xylencyanol, C ₂₅ H ₂₇ N ₂ NaO ₆ S ₂ (Roth)	0,025 % (w/v)
OrangeG, C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂ (Roth)	0,025 % (w/v)
H ₂ O _{reinst}	ad 10 ml
Ethidiumbromidlösung (EtBr), C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br (Roth)	10 mg·ml ⁻¹
50x TAE (als Elektrophoresepuffer 1x)	
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth)	2 M
Eisessig, C ₂ H ₄ O ₂ (Roth)	1 M
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (Roth)	5 mM
H ₂ O _{reinst}	ad 1 l

3.5.2 Klonierung

Die gereinigten Fragmente wurden in einer T/A-Klonierung in den pCR 2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) eingefügt und in die im Kit enthaltenen chemisch kompetenten Zellen (OneShot, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers kloniert. Anschließend wurden pro Klonierungsansatz 125 µl Komplexnährmedium SOB (HANAHAN, 1983) zugegeben (siehe Tab. 3.19) und die Zellen 1 h bei 37°C und 280 rpm geschüttelt. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurden die transformierten *E. coli* Zellen auf zwei Kulturschalen (Cellstar, Greiner bio-one) mit LB (Luria Miller)-Medium (Tab. 3.19) aufgetragen (je Ansatz 50 µl und 100 µl) und über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert. Je kloniertes Fragment wurden 10 weiße Kolonien ausgewählt und in einer PCR-Reaktion (Tab. 3.20 und Tab. 3.21) wurde der Klonierungserfolg überprüft. Hierfür wurden die Kolonien einzeln mit sterilen Zahnstochern vom Kulturmedium abgenommen und in den PCR-Ansatz getaucht. Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1%igen Agarosegel (Low EEO, Applichem) mit 0,5 µg·ml⁻¹ EtBr (Tab. 3.18) geladen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TBE-Puffer (Tab. 3.16) für 10 min bei 80 V und weitere 50 min bei 100 V. Klone mit der gewünschten Insertion wurden in sterile Kulturröhrchen (13 ml, Sarstedt) mit 3 ml flüssigem LB-Medium (Tab. 3.19) überführt und ÜN bei 37°C und 180 rpm kultiviert.

Tab. 3.19 Zusammensetzung der Kulturmedien

Reagenz (Hersteller)	Konz. / Anteil
SOB (steril)	
Bacto Trypton (Difco)	2 % (w/v)
Hefeextrakt, Servabacter (Serva)	0,5 % (w/v)
Natriumchlorid, NaCl (Roth)	10 mM
Kaliumchlorid, KCl (Roth)	2,5 mM
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, MgCl ₂ ·6H ₂ O (Roth)	10 mM
Magnesiumsulfat-Monohydrat, MgSO ₄ ·H ₂ O (Roth)	10 mM
LB-Agar	
LB (Luria-Miller)-Medium (Roth)	2,5 % (w/v)
Agar Kobe (Roth)	1,5 % (w/v)
Kanamycinlösung (50 mg·ml ⁻¹)	0,1 % (v/v)
X-Gal Lösung (40 mg·ml ⁻¹)	0,15 % (v/v)
Kanamycinlösung (steril)	
Kanamycin Monosulfat, C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ H ₂ SO ₄ ·H ₂ O (Duchefa Biochemie)	50 mg
H ₂ O _{reinst}	ad 1 ml
X-Gal Lösung	
X-Gal, C ₁₄ H ₁₅ BrClNO ₆ (Fermentas)	40 mg
Dimethylsulfoxid (DMSO), C ₂ H ₆ OS (Duchefa Biochemie)	ad 1 ml

Tab. 3.20 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Kolonie-PCR)

Reagenz (Konz., Hersteller)	Endkonzentration
Puffer CI (10x, Qiagen [enthält Ladepuffer])	1x
MgCl ₂ in Puffer (15 mM, Qiagen)	1,5 mM
dNTPs (10 mM, Fermentas)	0,2 mM
M13-fw (-20) Primer (10 µM, Invitrogen)	0,16 µM
M13-rv Primer (10 µM, Invitrogen)	0,16 µM
Taq Polymerase (5 U·µl ⁻¹ , Qiagen)	1 U
H ₂ O _{reinst}	ad 30 µl

Tab. 3.21 Thermocyclerprogramm für die Kolonie-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min	
94°C	30 sek	} 35
56°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Zur Isolierung der Plasmide aus den Bakterien wurde die alkalische Lyse, modifiziert nach BIRNBOIM UND DOLY (1979) durchgeführt. 1,5 ml der Flüssigkultur wurden 1 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. 100 µl Puffer A (Tab. 3.22) wurden zugefügt, geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer B (Tab. 3.22) wurde für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend 150 µl Puffer C (Tab. 3.22) zugegeben und erneut für 5 min auf Eis gekühlt. Die Proben wurden für 2 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 5 µl RNase A (10 mg·ml⁻¹, Qiagen) überführt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C und 40 rpm wurde die DNA mit 1 ml Ethanol (96 %) für 5 min auf Eis gefällt und anschließend für 2 min bei 13000 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, 1 ml 70 %iges Ethanol zugefügt und für 3 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 13000 g wurde der Überstand entfernt, das Pellet bei RT getrocknet und die Plasmid-DNA für 1 h in 25 µl TE-Puffer (Tab. 3.22) gelöst. Die gelöste Menge an Plasmid-DNA wurde im Spektralphotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies) bestimmt und mit TE-Puffer (Tab. 3.22), unter zu Hilfenahme des Biomek-Pipettierroboters (Beckman Coulter, Krefeld) auf eine DNA-Konzentration von 200 ng·µl⁻¹ verdünnt.

Tab. 3.22: Puffer und Lösungen für die alkalische Lyse

Reagenz (Hersteller)	Konz. in Lsg.
0,1 M Tris-HCl (pH 8.0)	
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth)	100 mM
pH einstellen mit Salzsäure, HCl (Roth)	
H ₂ O _{reinst}	ad 500 ml
0,5 M EDTA (pH 8.0)	
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (Roth)	500 mM
pH einstellen mit NaOH (Roth)	
H ₂ O _{reinst}	ad 500 ml
0,2 M NaOH	
Natriumhydroxid, NaOH (Roth)	0,2 M
H ₂ O _{reinst}	ad 1 l
SDS-Lösung	
Sodiumdodecylsulfat Na-Salz, SDS C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S-Na (Serva)	10 % (w/v)
H ₂ O _{reinst}	ad 100 ml
Puffer A (steril)	
Glucose, C ₆ H ₁₂ O ₆ (Roth)	55 mM
Tris-HCl, 0,1 M (s. o.)	25 mM
EDTA, 0,5 M (s. o.)	10 mM
H ₂ O _{reinst}	ad 250 ml
Puffer B	
NaOH 0,2 M (s. o.)	0,2 M
SDS-Lösung (10 %)	1 % (w/v)
Puffer C (pH 4.8)	
Essigsäure, C ₂ H ₄ O ₂ (Roth)	29,2 % (v/v)
pH einstellen mit Kaliumhydroxid, KOH (VEB-Laborchemie Apolda)	
H ₂ O _{reinst}	ad 100 ml
TE-Puffer (pH 8.0, steril)	
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth)	10 mM
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (Roth)	1 mM
H ₂ O _{reinst}	ad 50 ml

3.5.3 Sequenzierung

Die Sequenzierungs-PCR wurde in einer MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) mit dem BigDye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in einer Verdünnung von 1:8 durchgeführt (Tab. 3.23).

Material und Methoden

Als Primer für die Sequenzierung wurden M13 Forward (-20) bzw. M13 Reverse (Invitrogen), passend zum pCR 2.1-TOPO-Vektor verwendet. Die PCR-Bedingungen sind Tab. 3.24 zu entnehmen.

Tab. 3.23: Zusammensetzung der Sequenzierungs-PCR

Reagenz (Konz., Hersteller)	Endkonzentration
BigDye Terminator Cycle v1.1 (Applied Biosystems)	1x
Terminator Puffer (5x, Applied Biosystems)	3,5x
M13-fw (-20) Primer oder M13-rv Primer (10 μ M, Invitrogen)	0,16 μ M
H ₂ O _{HPLCgrade} (Roth)	ad 19 μ l
Plasmid-DNA (200 ng· μ l ⁻¹)	200 ng

Tab. 3.24: BigDye Programm für die Sequenzierungs-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen
96°C	1 min	
96°C	10 sek	} 35
50°C	5 sek	
60°C	4 min	
4°C	∞	

Die in der Sequenzierungs-PCR amplifizierten Fragmente wurden durch Fällung gereinigt. Dazu wurden zur fertigen PCR-Reaktion (20 μ l) 5 μ l EDTA (125 mM) und 60 μ l Ethanol (96 %) hinzugefügt und gemischt, 15 min bei RT inkubiert und anschließend für 30 min bei 4°C und 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos entfernt und es wurden 60 μ l Ethanol (70 %) zugegeben. Nach kurzem Mischen folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 2500 g. Der Überstand wurde restlos entfernt und das Pellet in 15 μ l HiDi (Formamidpuffer, Applied Biosystems) gelöst. Die Sequenzdetektion erfolgte im Kapillarsequenziergerät 3130xl (Applied Biosystems) mit der Methode Seq_KB_E, wobei die Auftrennung im Polymer Pop7 (Applied Biosystems) durchgeführt wurde. Pro kloniertem AFLP-Fragment wurden sechs unabhängige Klone jeweils vorwärts und rückwärts sequenziert.

3.5.4 Sequenzidentifikation

Die erhaltenen Sequenzen wurden im Programm Chromas 1.33 (Technelysium) dargestellt und anhand der Chromatogramme eine Qualitätsbestimmung der Sequenzen durchgeführt. Die Sequenzen des Vektors wurden entfernt und die Sequenzinformation der Fragmente zur weiteren Analyse in die Datenbank des Programms Vector NTI Advance 10.3.0 (Invitrogen) importiert.

Klone der gleichen Fragmentherkunft, sowie die jeweiligen Daten der zwei Sequenzierungsrichtungen (vorwärts bzw. rückwärts) wurden hinsichtlich identischer Sequenzabschnitte mit der Funktion des paarweisen Vergleichs untersucht (Align X).

Alle unterschiedlichen Sequenzen wurden mit der Nukleotid-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnical Research, NCBI QBLAST Server) und mit der EST-(Expressed Sequence Tags) Datenbank des NCBI verglichen. Es wurden die Algorithmen BLASTN, MEGABLAST und TBLASTX verwendet (ALTSCHUL et al., 1997). Eine Suche über die aktuellen Microarray-EST-Annotations-Datenbanken für Gerste erfolgte mit HarVEST barley v.1.68 (CLOSE et al., 2004; CLOSE, 2005). Darüber hinaus wurde mit Genevestigator (HRUZ et al., 2008) die Microarray-Datenbank der ETH (Eidgenössische Technische Hochschule) Zürich, CH auf mögliche Übereinstimmungen und Funktionsbeschreibungen mit den ermittelten Sequenzen verglichen.

3.6 Chromosomale Zuordnung

Von den Sequenzen wurden mit dem Programm Primer3 (ROZEN UND SKALETSKY, 2000) Primer abgeleitet, um eine Amplifikation auf genomischer DNA von Gerstenpflanzen durchführen zu können. Die Primer wurden von der Firma Operon (Köln) synthetisiert. Mit Hilfe von Weizen-Gerste-Additionslinien sollten die Sequenzen zunächst bestimmten Gerstechromosomen bzw –chromosomenarmen zugeordnet werden. Die Additionslinien bestehen aus Linien der Sommerweizensorte 'Chinese Spring', die jeweils einzelne Chromosomen bzw. Chromosomenarme der Sommergerstensorte 'Betzes' enthalten (ISLAM et al., 1981).

Die Primer wurden zunächst auf den Gerstensorten 'Betzes', 'Post' und 'Vixen' und der Sommerweizensorte 'Chinese Spring' amplifiziert. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tab. 3.25 dargestellt, das PCR-Programm für die Amplifikationen in Tab. 3.26, wobei die Annealingtemperatur für jede Primerkombination in der PCR optimiert wurde (siehe Tab. 7.2, Anhang). Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend auf ein 2 %iges Agarosegel (Low EEO, Applichem) mit 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ EtBr (Tab. 3.18) geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TBE-Puffer (Tab. 3.16) für 10 min bei 60 V und weitere 110 min bei 100 V. Erfolgreiche Amplifikationen, die differenzierende Fragmente zwischen 'Chinese Spring' und 'Betzes' erkennen ließen, wurden auf den Introgressionslinien nach den oben beschriebenen Protokollen wiederholt. Unterschiedliche Fragmente zwischen 'Post' und 'Vixen' wurden auf ihre Markertauglichkeit hin optimiert (s. 3.7.2).

Tab. 3.25 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Reagenz (Konz., Hersteller)	Endkonzentration
Puffer (10x, Qiagen)	1x
MgCl ₂ (25 mM, Qiagen)	1,25 mM
dNTPs (10 mM, Fermentas)	0,2 mM
Primer fw	0,25 μM
Primer rv	0,25 μM
Taq Polymerase (5 U·μl ⁻¹ , Qiagen)	0,5 U
H ₂ O _{reinst}	ad 9 μl

Tab. 3.26 Temperaturverlauf der PCR-Amplifikationen

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	8 min	
95°C	20 sek	} 12 (-0,7°C·Zyklus ⁻¹)*
62°C*	30 sek	
72°C	30 sek	
95°C	20 sek	} 23
60°C*	30 sek	
72°C	30 sek	
72°C	10 min	
4°C	∞	
*Bedingungen wurden für jede Primerkombination auf die jeweilige Annealingtemperatur abgestimmt.		

3.7 Genetische Kartierung

Um sequenzspezifische Unterschiede zwischen den Sorten 'Post' und 'Vixen' detektieren zu können, wurde eine allelspezifische Sequenzierung durchgeführt, und einige Fragmente wurden in der Kartierungspopulation 'Post' x 'Vixen' (SCHEURER et al., 2001) als STS (*Sequence Tagged Site*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) oder als SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) kartiert.

3.7.1 Allelspezifische Sequenzierung

Um Unterschiede auf Sequenzebene zwischen den Sorten 'Post' und 'Vixen' bezüglich der sequenzierten AFLP-Regionen untersuchen zu können, wurden die Primer (Tab. 7.2) auf genomischer DNA der Sorten 'Post' und 'Vixen' amplifiziert (Tab. 3.25, Tab 3.26) und die PCR-Produkte anschließend mit 3 µl Ladepuffer (Tab. 3.18) versetzt und auf ein 1 %iges Agarosegel (Seakem LE, BioWhittaker Molecular App., Rockland, USA) mit 0,5 µg·ml⁻¹ Ethidiumbromid (EtBr, Tab. 3.18) geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in modifiziertem 1x TAE-Puffer mit geringer EDTA-Konzentration (Tab. 3.18) für 10 min bei 80 V und weitere 50 min bei 100 V. Die Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und über eine Säule (Montàge Gel Extraction Kit, Millipore) nach Anleitung des Herstellers aus dem Agarosegel gereinigt. Die Klonierung und Sequenzierung der Fragmente erfolgte analog zu Kap. 3.5.3, 3.5.4 und 3.5.5.

3.7.2 Untersuchung von STS

Für die Amplifikation eines Sequenzbereiches der die Sorten 'Post' und 'Vixen' durch ein Indel (Insertion/Deletion) differenziert, wurden erneut Primer unter Verwendung von Primer3 (ROZEN UND SKALETSKY, 2000) abgeleitet, wobei der Vorwärtsprimer nach SCHUELKE (2000) am 5'-Ende um eine komplementäre M13-Sequenz erweitert wurde. Diese ermöglichte später die Bindung eines, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5, markierten M13-Primers, um eine Detektion im automatischen Fragmentanalysegerät zu ermöglichen. Die verwendeten Primer sind Tab. 7.3 im Anhang zu entnehmen. Eine Übersicht über den PCR-Ansatz und die Temperaturbedingungen bei der Amplifikation geben Tab. 3.27 und Tab. 3.28. Die erfolgreiche Amplifikation wurde für einen Teil der Proben auf einem Agarosegel überprüft (1 % Agarose [Low EEO], 0,5 µg·ml⁻¹ EtBr [Tab. 3.17], 1x TBE [Tab. 3.16], 60 min 100 V). 1 µl Probe wurde mit 28,7 µl deionisiertem Formamid (Roth) und 0,3 µl Standard 600 (Beckman Coulter, Krefeld) vermischt, mit Mineralöl (Beckman Coulter) überschichtet und im Fragmentanalysegerät CEQ 8000 (Beckman Coulter) mit der Methode Frag-4 detektiert.

Tab. 3.27: PCR-Ansatz für die STS-Amplifikation

Reagenz (Konz., Hersteller)	Endkonzentration
Puffer (10x, Qiagen)	1x
MgCl ₂ in Puffer (25 mM, Qiagen)	1,25 mM
dNTPs (10 mM, Fermentas)	0,2 mM
Primer fw (10 µM)	0,25 µM
Primer rv (10 µM)	0,25 µM
Taq Polymerase (5 U·µl ⁻¹ , Qiagen)	0,5 U
H ₂ O _{reinst}	ad 9 µl

Tab. 3.28: Temperaturverlauf der STS-Amplifikation

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min	
94°C	30 sek	} 12 (-0,7°C-Zyklus ⁻¹)
68°C	30 sek	
72°C	30 sek	
94°C	30 sek	} 35
60°C	30 sek	
72°C	30 sek	
72°C	10 min	
4°C	∞	

3.7.3 Entwicklung von CAPS-Markern

Die bekannten Sequenzen wurden mit dem Programm Vector NTI dargestellt und auf Restriktionsschnittstellen mit einer Auswahl an vorhandenen Enzymen untersucht. Die PCR wurde mit den beschriebenen Primern (Tab. 7.4) in einem Ansatz von 20 µl unter oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. 10 µl des PCR-Produktes wurden mit 7,6 µl H₂O_{reinst}, 2,0 µl des jeweiligen Enzympuffers (10x) und 2 U (Units) Enzym vermischt und nach Angaben des Enzymherstellers 1 h inkubiert (37°C bzw. 55°C). Anschließend wurden 4 µl Ladepuffer (Tab. 3.18) zugefügt und die Fragmente wurden im 1,5 %igen Agarosegel (Low EEO) mit 0,5 µg·ml⁻¹ EtBr in 1x TBE-Puffer (Tab. 3.16) für 70 min bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt.

3.7.4 SNP-Detektion

Für Sequenzen, die einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) zwischen den Sorten ‚Post‘ und ‚Vixen‘ aufwiesen, ohne dass dadurch eine Restriktionsschnittstelle betroffen war, wurden erneut Primer für eine Pyrosequenzierung abgeleitet. Dies erfolgte mit dem Programm PSQ Assay Design 1.0.6 (Biotage AB, Uppsala, Schweden). Es wurden jeweils zwei Primer erstellt, welche den gewünschten Sequenzabschnitt amplifizieren, wovon einer mit Biotin markiert wurde sowie ein dritter Primer, der als Sequenzierprimer verwendet wurde (Tab. 7.5). Die Amplifikation erfolgte bei 55°C (Tab. 3.29), wobei der PCR-Ansatz exakt nach den Empfehlungen der Firma Biotage erstellt wurde. Die PCR wurde zunächst auf einem Agarosegel (1,5 % Agarose [Low EEO], 0,5 µg·ml⁻¹ EtBr, 1x TBE [Tab. 3.16], 210 min 80 V) auf ihren Erfolg hin überprüft (10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Loading [Tab. 3.18]), bevor die weitere Aufreinigung und Vorbereitung für die Pyrosequenzierung (Pyro Gold Reagents, Biotage) nach Angaben des Herstellers erfolgte. Die Proben der Elternsorten und der DH21-Linien wurden im Gerät Pyro Mark ID (Biotage) analysiert und die Pyrogramme mit der Gerätesoftware Pyro Mark ID 1.0 ausgewertet.

Tab. 3.29: Amplifikationsbedingungen für die SNP-Analyse

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	5 min	
95°C	15 sek	} 45
55°C	30 sek	
72°C	15 sek	
72°C	5 min	
4°C	∞	

3.7.5 Genetische Kartierung

Die Kartierung der einzelnen Marker in der DH21-Population der Kreuzung ‚Post‘ x ‚Vixen‘ wurde mit der Software JoinMap 4.0 (Kyazma B.V., Wageningen, NL) unter Nutzung der Haldane-Transformation (HALDANE, 1919, Rekombinationsfrequenz <0.4, LOD >3.00) durchgeführt. Die Kartierung erfolgte durch Integration der abgeleiteten Marker in die bestehende Kartierungspopulation von SCHEURER et al. (2001).

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der BYDV-Infektion

Die mit Hilfe von *Rhopalosiphum padi* BYDV-infizierten Pflanzen wurden im DAS-ELISA auf ihren Virustiter überprüft. Es zeigte sich deutlich, dass Pflanzen mit erfolgreicher Infektion sehr hohe Extinktionswerte aufwiesen und in Pflanzen der nicht infizierten Kontrollvariante kein Virus nachzuweisen war. Für die weiteren Arbeiten wurden nur Pflanzen verwendet, die in der infizierten Variante sehr hohe Virustiter enthielten, um zu gewährleisten, dass es keinen Unterschied im Virusgehalt von toleranten und anfälligen Genotypen im Versuch gab. Pflanzen der nicht infizierten Kontrolle wurden ausschließlich ohne nachweisbaren Virusgehalt ausgewählt (Extinktion 405 nm: <0.05). In Tabelle 4.1 sind die Genotypen aufgelistet, welche für die weiteren cDNA-AFLP Versuche verwendet wurden.

Tab. 4.1: ELISA-Werte im Preßsaft der mit Hilfe von *R. padi* BYDV-infizierten Pflanzen.

infizierte Pflanzen			nicht infizierte Kontrollen		
Probe-Nr.	Sorte/Linie	ELISA-Wert (Extinktion 405 nm)	Probe-Nr.	Sorte/Linie	ELISA-Wert (Extinktion 405 nm)
1	Post	2.499	22	Post	0.014
2	Post	2.528	23	Post	0.019
3	Post	2.535	24	Post	0.009
4	DH21-9	2.508	25	DH21-9	0.008
5	DH21-9	2.510	26	DH21-9	0.008
6	DH21-9	2.520	27	DH21-9	0.008
7	Vixen	2.463	28	Vixen	0.018
8	Vixen	2.457	29	Vixen	0.021
9	Vixen	2.459	30	Vixen	0.005
10	DH21-50	2.518	31	DH21-50	0.009
11	DH21-50	2.527	32	DH21-50	0.013
12	DH21-50	2.545	33	DH21-50	0.011
13	DH21-136	2.545	34	DH21-136	0.010
14	DH21-136	2.558	35	DH21-136	0.008
15	DH21-136	2.560	36	DH21-136	0.013
16	Nixe	2.502	37	Nixe	0.014
17	Nixe	2.523	38	Nixe	0.020
18	Nixe	2.502	39	Nixe	0.026
19	DH21-60	2.512	40	DH21-60	0.023
20	DH21-60	2.392	41	DH21-60	0.024
21	DH21-60	2.474	42	DH21-60	0.026

Für die folgenden Versuche wurden Mischungen von je drei Proben (z.B. Nr. 1-3) verwendet.

4.2 Qualität der Gesamt-RNA

Die extrahierte Gesamt-RNA wurde in einem denaturierenden Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Qualität der extrahierten RNA zu überprüfen. In Abbildung 4.1 ist ein Teil der RNA-Proben im denaturierten Agarosegel dargestellt.

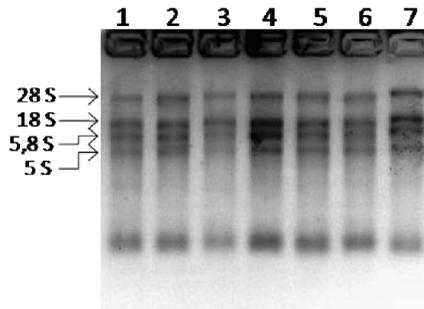


Abb. 4.1: Auftrennung der Gesamt-RNA. 1-7 Gerstengenotypen (Sorten und DH-Linien), 5S-28S ribosomale RNA-Fragmente (S= Svedberg-Konstante)

Es sind deutlich die vier Fragmente ribosomaler RNA zu erkennen, so dass Artefakte durch einen Abbau der RNA ausgeschlossen werden können. Die Gesamt-RNA zeigte eine gute Qualität für die weitere Verwendung zur selektiven Aufreinigung von mRNA und dem darauf folgenden Einsatz für die cDNA-AFLP-Reaktionen.

4.3 Differenzierende Fragmente im cDNA-AFLP

Für die Darstellung der differentiellen Genexpression wurden insgesamt alle möglichen 256 *EcoRI*+2/*MseI*+2 Primerkombinationen analysiert und in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Abbildung 4.2 zeigt ein Fragmentbild eines Polyacrylamidgels, erstellt mit dem Fragmentanalysegerät ALFexpress. Es wurden, nach den in 3.5.1 erläuterten Kriterien, 18 differenzierende AFLP-Kombinationen identifiziert, die erneut im Polyacrylamidgel mit anschließender Silbernitratfärbung aufgetrennt wurden um die Fragmente isolieren zu können. Einen Ausschnitt aus einem mit Silbernitrat gefärbten Polyacrylamidgel zeigt Abb. 4.3.

Ergebnisse

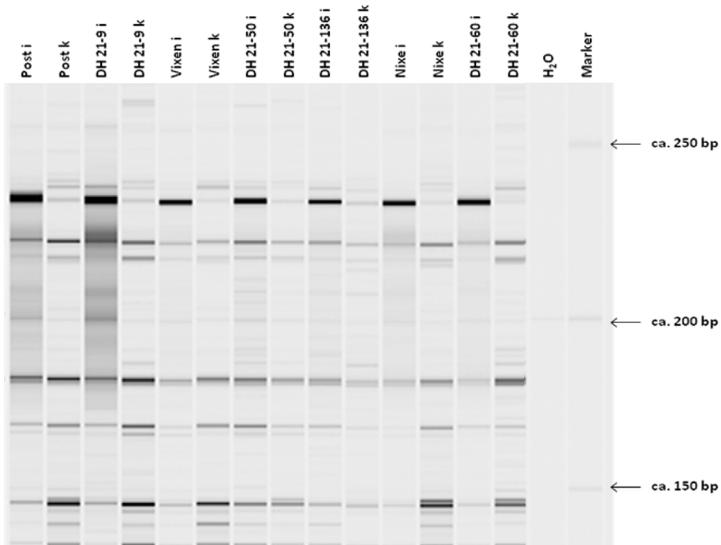


Abb. 4.2: Polyacrylamidgel der cDNA-AFLP-Kombination E14/M14 mit internem Größenstandard (200 bp). Zu erkennen sind die stärker exprimierten Fragmente in den infizierten Varianten (Bulks) bei ca. 240 bp. I= infiziert, k= nicht infizierte Kontrolle.

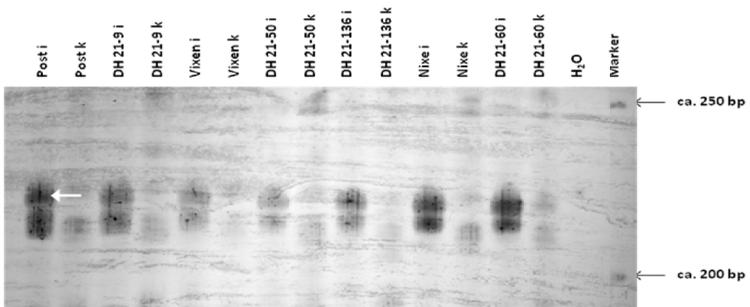


Abb. 4.3: Polyacrylamidgel mit Silbernitratfärbung der cDNA-AFLP-Kombination E14/M14. Das markierte Fragment (Pfeil) wurde isoliert und charakterisiert. I= infiziert, k= nicht infizierte Kontrolle.

4.4 Charakterisierung polymorpher Fragmente

Aus 18 identifizierten AFLP-Kombinationen wurden, nach erneuter Auftrennung im Polyacrylamidgel mit anschließender Silbernitratfärbung, insgesamt 45 differenzierende Fragmente isoliert, die kloniert und sequenziert wurden. Einen Überblick über Homologien zu bekannten Sequenzen der Datenbank des NCBI zeigt Abb. 4.4.

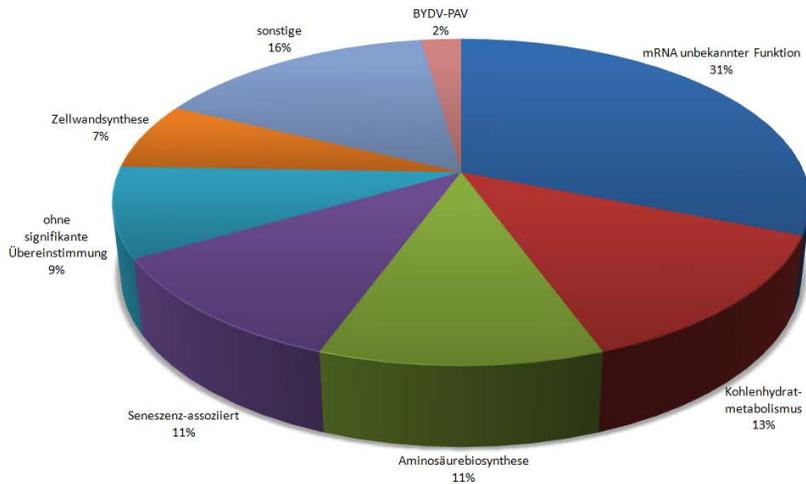


Abb. 4.4: Gruppierung der Fragmente des cDNA-AFLP gemäß Homologieabgleich (BLASTN).

Die Abbildung 4.4 zeigt die Verteilung der erhaltenen Sequenzen nach BLASTN (megablast) mit der EST-Datenbank (est_others). Nach BLASTX mit der Protein-Datenbank (non redundant protein sequences) wurden weitere Informationen über mögliche Zugehörigkeiten oder Funktionen der Sequenzen erhalten, welche in der folgenden Tabelle 4.2 aufgelistet sind. Die Sequenzen der einzelnen Fragmente sind in Tab. 9.1 (Anhang) dargestellt.

Tab. 4.2: Recherchierte Sequenzidentitäten der cDNA-AFLP-Fragmente

cDNA-AFLP PK	Fragment-Klon Code	Länge (bp)	Identitäten (BLASTN, est_others) Erwartungswert E (Sequenzabdeckung, max. Identität in %)	UniGene Nr., Übereinstimmung (%)	Homologie BLASTX, Erwartungswert E
Herunterreguliert in BYDV infizierten Pflanzen					
E12/M15	A4-3	442	BY867953 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-159 (85,100)	Hv.942 UDP-D-glucuronate decarboxylase (UXS1) <i>H. vulgare</i>	AAT80326.1 UDP-D-glucuronate decarboxylase [<i>H. vulgare</i>] 2e-35
E12/M15	A5-4	451	FD524127 <i>H. vulgare</i> mRNA 0.0 (94,99)	Hv.2469 Transcribed locus, weakly similar to XP_001005109.2 hypothetical protein [<i>M. musculus</i>]	ACF81682.1 unknown [Z. mays] 5e-38
E24/M25	L7-2	163	CA022826 <i>H. vulgare</i> mRNA 3e-79 (100, 100)	Hv.12526 similar to NP_181006.1 transketolase <i>A. thaliana</i> (88)	NP_001067285 Os12g0616900 [<i>Oryza sativa</i>] 9e-19
E24/M25	L8-3	303	EX576886 <i>H. vulgare</i> mRNA 1e-156 (100, 100)	Hv.23839 Putative glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase ,(core3ft gene) (core3ft)	CAE46648 putative glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase [<i>Hordeum vulgare</i>] 3e-51
E17/M13	N5-1	397	BY865661 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-164 (82, 98)	Hv.19497 moderately similar to NP_195824.1 unknown protein <i>A. thaliana</i> (74)	
E17/M13	N5-5	408	CJ949056 <i>T. aestivum</i> mRNA 1e-177 (83, 100)	Ta.20889 weakly similar to NP_680687.2 unknown protein <i>A. thaliana</i> (46)	ABO20854 hypothetical protein [<i>Lilium longiflorum</i>] 2e-25
E20/M23	O1-2	179	DN183119 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-82 (99, 98)	Hv.17978 moderately similar to NP_001031001.2 THA1 (THREONINE ALDOLASE 1); aldehyde-lyase <i>A. thaliana</i> (72)	ABB72802 L-allo-threonine aldolase-related protein [<i>Solanum tuberosum</i>] 2e-20
E20/M23	O2-3	448	BJ544643 <i>H. vulgare</i> mRNA 0.0 (83, 100)	Hv.901 moderately similar to NP_175237.1 dihydroliopyl dehydrogenase <i>A. thaliana</i> (83)	AAN23154 dihydroliopyamide dehydrogenase precursor [<i>Lycopersicon esculentum</i>] 2e-56
Heraufreguliert in BYDV infizierten Pflanzen					
E11/M14	C9-6	398	BI779847.2 <i>H. vulgare</i> mRNA 0.0 (95,99)	Hv.19491 similar to NP_001056646.1 <i>O. sativa</i> (81)	NP_001056646.1 putative protein Os06g0124900 [<i>O. sativa</i>] 2e-14
E25/M24	D12-16	316	CJ788498 <i>T. aestivum</i> mRNA 1e-136 (84,100)	Ta.62724	AAR25995 putative senescence-associated protein [<i>Pyrus communis</i>] 1e-44
E25/M24	D15-2	404	BF617738 <i>H. vulgare</i> mRNA 4e-137 (66,100)	Hv.22773 Transcribed locus, strongly similar to NP_114296.1 ribosomal protein S3 [<i>Triticum aestivum</i>]	AAR25995 putative senescence-associated protein [<i>Pyrus communis</i>] 3e-39
E25/M24	D17-15	411	BF617738 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-135 (65,99)	Hv.22773 Transcribed locus, strongly similar to NP_114296.1 ribosomal protein S3 [<i>Triticum aestivum</i>]	AAR25995 putative senescence-associated protein [<i>Pyrus communis</i>] 5e-44
E25/M25	D18-24	256	AL500265 <i>H. vulgare</i> mRNA 5e-129 (100,99)	Hv.1190 similar to NP_001041976.1 Os01g0139200 <i>O. sativa</i> (72)	
E25/M25	D19-17	257	BY840932 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-88 (70,100)	Hv.9117 similar to NP_190651.1 PSBO-2/PSBO2; oxygen evolving <i>A. thaliana</i> (87)	AAR25995 putative senescence-associated protein [<i>Pyrus communis</i>] 2e-09
E25/M25	D22-20	318	CJ884267 <i>T. aestivum</i> mRNA 1e-140 (100,95)	Ta.51244 similar to NP_001056502.1 Os05g0593300 <i>O. sativa</i> (54)	BAD03041.1 unknown protein [<i>Oryza sativa</i>] 5e-41
E11/M14	F2-1	501	CJ962651 <i>T. aestivum</i> mRNA 0.0 (100, 99)	Ta.54048 moderately similar to NP_566426.1 ATCHIB (BASIC CHITINASE); chitinase <i>A. thaliana</i> (62)	XP_001895031 hypothetical protein BM1_17870 [<i>Brugia malayi</i>] 5e-18
E14/M14	G3-2	200	BE427473 <i>T. aestivum</i> mRNA 2e-73 (97, 91)	BLASTN: DQ079612 BYDV-PAV cds 1e-99	AAK77215 readthrough domain [Barley yellow dwarf virus - PAV] 2e-32

Tab. 4.2 Fortsetzung

cDNA-AFLP PK	Fragment-Klon Code	Länge (bp)	Identitäten (BLASTN, est_others) Erwartungswert E (Sequenzabdeckung, max. Identität in %)	UniGene Nr., Übereinstimmung (%)	Homologie BLASTX (E)
Konstitutiv exprimiert in 'Post'					
E11/M16	C2-2	191	BJ476336 <i>H. vulgare</i> mRNA 1e-94 (100,100)	Hv.24858 Transcribed locus	
E25/M24	D1-4	125	EX578953 <i>T. aestivum</i> mRNA 3e-60 (100,100)	Hv.22773 Transcribed locus, strongly similar to NP_114296.1 ribosomal protein S3 [<i>Triticum aestivum</i>]	XP_001852902.1 GLP_748_1200_211 [<i>Culex quinquefasciatus</i>] 2e-09
E25/M24	D2-6	122	FD526988 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-54 (99,99)	Hv.3068 moderate similar to NP_563985 GOS11 (GOLGI SNARE 11); SNARE binding <i>A. thaliana</i> (72)	NP_001061900.1 Os08g0440000 [<i>O. sativa</i>] 4e-11
E25/M24	D8-12	122	no significant similarity		
E25/M24	D8-15	122	BJ228529 <i>T. aestivum</i> mRNA 7e-25 (53,100)	Ta.33315 CRR1 (CHLORORESPIRATION REDUCTION) dihydrodipicolinate reductase <i>A. thaliana</i> (73)	
E14/M17	E4-4	375	FD523214 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-160 (93, 100)	Hv.23263 similar to NP_191867 ATGPX5 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 5); glutathione peroxidase <i>A. thaliana</i> (71)	CAB59895.1 glutathione peroxidase-like protein GPX54Hv [<i>Hordeum vulgare</i>] 1e-19
E14/M17	E9-8	131	no significant similarity		
E12/M21	H2-4	472	BG418533 <i>H. vulgare</i> mRNA 0.0 (100, 99)	Hv.3261 moderately similar to NP_566326.1 unkn. prot. <i>A. thaliana</i> (61)	EAZ40927 hypothetical protein Osl_024410 [<i>Oryza sativa</i>] 9e-59
E16/M25	K5-4	364	no significant similarity		
E24/M25	L5-3	118	FD528092 <i>H. vulgare</i> mRNA 7e-54 (100, 100)	Hv.18751 moderately similar to NP_178001.2 transferase, transferring glycosyl groups <i>A. thaliana</i> (73)	EAY95346 hypothetical protein Osl_016579 [<i>Oryza sativa</i>] 5e-04
E16/M14	M1-3	117	CD900671 <i>T. aestivum</i> mRNA 4e-42 (100, 94)	Ta.1702 moderately similar to NP_174978.1 glutamate receptor 3.3 <i>A. thaliana</i> (60)	Q7XP59 Glutamate receptor 3.1 precursor (Ligand-gated ion channel 3.1) 2e-08
E16/M14	M1-4	122	BQ762954 <i>H. vulgare</i> mRNA 5e-26 (81, 89)	Hv.200 MLA7 <i>H. vulgare</i> CC-NBS-LRR	AAQ55540 MLA7 [<i>Hordeum vulgare</i>] 2e-16
E14/M24	P1-5	317	DT702852 <i>Festuca arundinacea</i> mRNA 6e-55 (66, 85)		NP_001061356 Os08g0246300 [<i>Oryza sativa</i>] 2e-15
E14/M24	P3-1	189	BJ546059 <i>H. vulgare</i> mRNA 1e-64 (74, 99)	Hv.21696 moderately similar to XP_001699712.1 homoserine dehydrogenase <i>C. reinhardtii</i> (63)	BAA11417 aspartate kinase-homoserine dehydrogenase [<i>Oryza sativa</i>] 8e-10
E14/M24	P3-2	186	CJ800979 <i>T. aestivum</i> mRNA 2e-76 (99, 95)	Ta.54964 moderately similar to NP_567974.1 bZIP transcription factor family protein <i>A. thaliana</i> (56)	AAL79736 putative transcription factor [<i>Oryza sativa</i>] 5e-19
E14/M25	Q1-1	447	CB869969 <i>H. vulgare</i> mRNA 0.0 (95, 100)		XP_001895031 hypothetical protein BM1_17870 [<i>Brugia malayi</i>] 4e-18
E23/M12	R1-4	74	EG382185 <i>Leymus cinereus</i> mRNA 2e-22 (97, 94)		
E23/M12	R2-1	74	EG382185 <i>Leymus cinereus</i> mRNA 4e-24 (97, 95)		
E13/M12	S1-7	252	CB864481 <i>H. vulgare</i> mRNA 9e-127 (100, 99)	Hv.11848 moderately similar to NP_001067304.1 Os12g0621700 [<i>Oryza sativa</i>] (76)	

Tab. 4.2 Fortsetzung

cDNA-AFLP PK	Fragment-Klon Code	Länge (bp)	Identitäten (BLASTN, est_others) Erwartungswert E (Sequenzabdeckung, max. Identität in %)	UniGene Nr., Übereinstimmung (%)	Homologie BLASTX (E)
Konstitutiv exprimiert in `Vixen`					
E16/M26	J2-5	258	EY274913 <i>H. vulgare</i> mRNA 8e-68 (56, 99)		YP_002000495 RuBisCO large subunit [<i>Brachypodium distachyon</i>] 1e-11
E16/M25	K1-7	106	CB883432 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-44 (100, 98)	Hv.20839 moderately similar to NP_568861.3 xylose isomerase <i>A. thaliana</i> (82)	CAA64544 xylose isomerase [<i>Hordeum vulgare</i>] 6e-13
E20/M23	O3-1	257	CJ686844 <i>T. aestivum</i> mRNA 7e-123 (100, 98)	Ta.42096 weakly similar to NP_001068077.1 Os11g0550900 [<i>Oryza sativa</i>] (57)	NP_001068077 Os11g0550900 [<i>Oryza sativa</i>] 2e-09
E13/M12	S3-3	279	CK566993 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-142 (100, 100)		
Konstitutiv exprimiert in DH21-136					
E25/M25	D24-25	373	CJ702517 <i>T. aestivum</i> mRNA 4e-82 (56, 93)	Ta.21072 moderately similar to NP_001060734.1 Os07g0693900 <i>O. sativa</i> (85)	EAZ41195.1 hypothetical protein Osl_024678 [<i>Oryza sativa</i>] 3e-29
E11/M14	F1-1	208	BY843215 <i>H. vulgare</i> mRNA 9e-81 (81, 99)	Hv.22969 light harvesting complex LHCA3*1; chlorophyll binding <i>A. thaliana</i> (82)	
E11/M14	F1-4	213	CA015292 <i>H. vulgare</i> mRNA 2e-103 (100, 99)	Ta.4256 sucrose-phosphate synthase/ transferase, transferring glycosyl groups <i>A. thaliana</i> (74)	AAQ15106.1 AF347064 sucrose-phosphate synthase 2 [<i>Triticum aestivum</i>] 5e-31
E11/M14	F6-1	540	DN184854 <i>H. vulgare</i> mRNA 0.0 (100, 99)	Hv.23068 moderately similar to NP_193224.1 OASA1 <i>A. thaliana</i> (85) OASA1 (O-ACETYL SERINE (THIOL) LYASE (OAS-TL) ISOFORM A1)	P38076 Cysteine synthase (O-acetylserine sulphydrylase) (CSase A) (O-acetylserine (Thiol)-lyase) (OAS-TL A) [<i>T. aestivum</i>] 1e-47

Von 45 differenzierenden Fragmenten waren acht in infizierten Pflanzen herunterreguliert und neun heraufreguliert; 19 Fragmente wurden konstitutiv in `Post`, vier Fragmente konstitutiv in `Vixen` und vier Fragmente konstitutiv in der DH-Linie 21-136 exprimiert. Ein Fragment, welches jedoch nicht näher zugeordnet werden konnte, wurde nur in der anfälligen Sorte `Nixe` gefunden.

Die Größe der isolierten cDNA-Fragmente variierte zwischen 74 bp und 540 bp, wobei ca. 36 % kleiner als 200 bp waren und 29 % über 400 bp Größe hatten. Ca. 7 % der Fragmente hatten keine homologen Sequenzen mit der EST-Datenbank. Ein Fragment (G3-2), identifiziert in infizierten Genotypen, enthielt 200 bp der Sequenz des BYDV.

4.5 Chromosomale Lokalisierung

Von Sequenzen ausgewählter Fragmente wurden Primer abgeleitet und auf Weizen-Gerste Additionslinien (ISLAM et al., 1981) amplifiziert, um die Sequenzen den Gerstenchromosomen zuzuordnen zu können.

In Abbildung 4.5 ist beispielhaft eine Auftrennung von Amplifikationsprodukten in einem 2%igen Agarosegel dargestellt. Deutlich amplifizieren die Primer (S3-3r) ein ca. 300 bp großes Fragment des Gerstenchromosoms 4H. Die Ergebnisse der verschiedenen Marker nach Amplifikation auf den Additionslinien finden sich in der Tabelle 4.3.

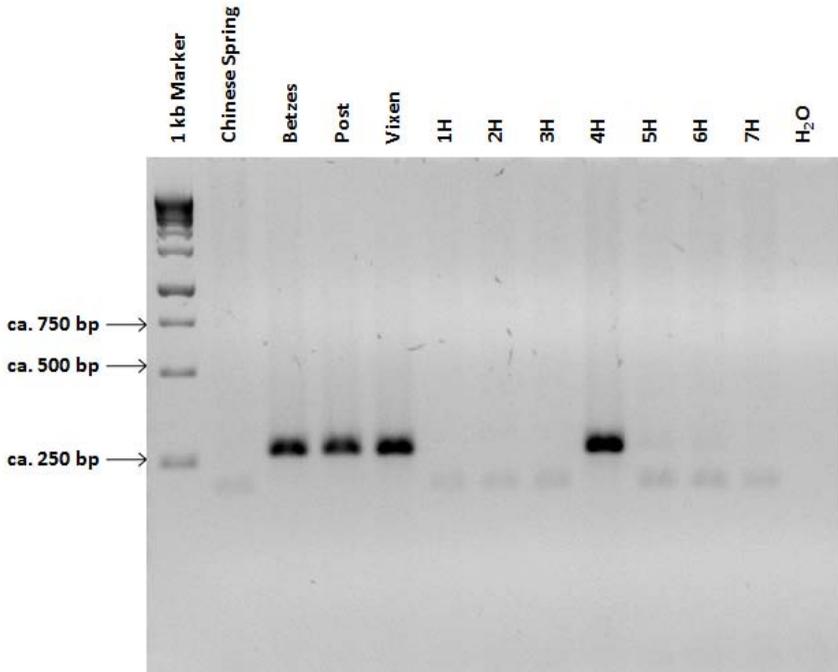


Abb. 4.5: Chromosomale Lokalisierung des Fragmentes S3-3r auf dem Gerstechromosom 4H; 1H – 7H: Additionslinien der Sommerweizensorte ‘Chinese Spring’ mit dem jeweiligen Chromosom aus der Gerstensorte ‘Betzes’.

Tab. 4.3: Ergebnisse der Amplifikationen auf den Additionslinien 1H bis 7H

Fragment (Primerkombination)	Chromosom	Fragment (Primerkombination)	Chromosom
C2-2f	2H,3H,5H,6H	M1-3f	2H
K5-4f	6H	O2-3f	1H
K12D08	7H	O3-1f	3H,6H
K15D08	2H,4H,7H	P1-5f	3H
K24D18	3H,5H	S3-3r	4H
L7-2f	4H	UdpD	4H
L8-3f	1H		

Nicht alle Marker haben Unterschiede zwischen den Additionslinien gezeigt. Dargestellt sind daher lediglich die Ergebnisse mit deutlichen Unterschieden in der Fragmentgröße oder Amplifikatintensität zwischen den Additionslinien.

4.6 Allelspezifische Sequenzierung

Um Unterschiede auf Sequenzebene zwischen den Sorten 'Post' und 'Vixen' bezüglich der sequenzierten cDNA-AFLP-Regionen untersuchen zu können, wurde genomische DNA der Sorten 'Post' und 'Vixen' mit den abgeleiteten Primern (Tab. 9.2) amplifiziert. Von Sequenzen, die Unterschiede in der Nukleotidabfolge zwischen den Sorten enthielten, wurden erneut Primer für die verschiedenen Markeranwendungen abgeleitet (STS für eine fluoreszenzgestützte Fragmentanalyse oder Pyrosequencing-Primer für eine direkte Detektion von SNPs).

4.6.1 Entwicklung von STS-Markern

Von der Sequenz A4-3 (442 bp) der cDNA-AFLP Kombination E12/M15, die in BYDV infizierten Pflanzen herunterreguliert war, wurden Primer abgeleitet (UdpD) und diese auf genomischer DNA amplifiziert. Die Sequenz zeigte in Datenbankvergleichen eine signifikante Homologie zu einer UDP-D-Glucuronatdecarboxylase. Die Ergebnisse der Amplifikationen mit genomischer DNA ergaben aufgrund von Introns in der genomischen Sequenz zum Teil größere Fragmente (längere Sequenzen), als die der sequenzierten cDNA. Die Abbildung 4.6 zeigt die mit den UdpD-Primern auf genomischer DNA amplifizierte Sequenz, welche im Fragmentanalysegerät fluoreszenzmarkiert detektiert wurde. Die dargestellte Sequenz enthält die Insertion von drei Basen (AAC) aus der Sorte 'Post', welche in den Sorten 'Vixen' und 'Nixe' sowie in der Sequenz AY677177 aus der Nucleotid-Datenbank des NCBI fehlt und als Marker verwendet wurde. Anhand des Alignments mit der mRNA-Sequenz ist deutlich zu erkennen, dass die Lage des Forward-Primers bei der Amplifikation von genomischer DNA in einem Intron liegt. Die genauen Primersequenzen für den STS Marker können der Tabelle 9.3 (Anhang) entnommen werden.

UdpD_`Post`	(1)	GTGCATGACGATTCTGGATGGTATAATAACATGTGTTATTTTATTTTAC
UdpD_DH21-136	(1)	GTGCATGACGATTCTGGATGGTATAATAACATGTGTTATTTTATTTTAC
UdpD_`Vixen`	(1)	GTGCATGACGATTCTGGATGGTATAATAACATGTGTTATTTTATTTTAC
AY677177_mRNA	(0)	-----
UdpD_`Post`	(51)	AGTTGATCAACCCAGAGGTGACAGTGACGATGACTGAGAACACTCCTGAT
UdpD_DH21-136	(51)	AGTTGATCAACCCAGAGGTGACAGTGACGATGACTGAGAACACTCCTGAT
UdpD_`Vixen`	(51)	AGTTGATCAACCCAGAGGTGACAGTGACGATGACTGAGAACACTCCTGAT
AY677177_mRNA	(1)	AGTTGATCAACCCAGAGGTGACAGTGACGATGACTGAGAACACTCCTGAT
UdpD_`Post`	(101)	GACCCTCGCCAGAGGAAGCCTGACATCACAAGGCCAAAGGAGGTTCCTGA
UdpD_DH21-136	(101)	GACCCTCGCCAGAGGAAGCCTGACATCACAAGGCCAAAGGAGGTTCCTGA
UdpD_`Vixen`	(101)	GACCCTCGCCAGAGGAAGCCTGACATCACAAGGCCAAAGGAGGTTCCTGA
AY677177_mRNA	(51)	GACCCTCGCCAGAGGAAGCCTGACATCACAAGGCCAAAGGAGGTTCCTGA
UdpD_`Post`	(151)	CTGGGAGCCCAAGGTCGTCTACGTGACGGCTTGGTGCTCATGGAGGACG
UdpD_DH21-136	(151)	CTGGGAGCCCAAGGTCGTCTACGTGACGGCTTGGTGCTCATGGAGGACG
UdpD_`Vixen`	(151)	CTGGGAGCCCAAGGTCGTCTACGTGACGGCTTGGTGCTCATGGAGGACG
AY677177_mRNA	(101)	CTGGGAGCCCAAGGTCGTCTACGTGACGGCTTGGTGCTCATGGAGGACG
UdpD_`Post`	(201)	ACTTCCGGGAGCGTTTGGCAGTGCCCAAGAAGGCCAAGGCCTAAGGCCAC
UdpD_DH21-136	(201)	ACTTCCGGGAGCGTTTGGCAGTGCCCAAGAAGGCCAAGGCCTAAGGCCAC
UdpD_`Vixen`	(201)	ACTTCCGGGAGCGTTTGGCAGTGCCCAAGAAGGCCAAGGCCTAAGGCCAC
AY677177_mRNA	(151)	ACTTCCGGGAGCGTTTGGCAGTGCCCAAGAAGGCCAAGGCCTAAGGCCAC
UdpD_`Post`	(251)	TTCCCTGCGTTTGGCGTACA ACA TCACCAATTGGCCAGAGCATACTCATA
UdpD_DH21-136	(251)	TTCCCTGCGTTTGGCGTACA ACA TCACCAATTGGCCAGAGCATACTCATA
UdpD_`Vixen`	(251)	TTCCCTGCGTTTGGCGTACA---TCACCAATTGGCCAGAGCATACTCATA
AY677177_mRNA	(201)	TTCCCTGCGTTTGGCGTACA---TCACCAATTGGCCAGAGCATACTCATA
UdpD_`Post`	(301)	GTTGGGTGGGTTCGT
UdpD_DH21-136	(301)	GTTGGGTGGGTTCGT
UdpD_`Vixen`	(298)	GTTGGGTGGGTTCGT
AY677177_mRNA	(248)	GTTGGGTGGGTTCGT

Abb. 4.6: Alignment der Sequenzen von genomischer DNA der Sorten `Post` und `Vixen` und der DH21-Linie 136, amplifiziert mit den Primern UdpD-Insert. Fett hervorgehoben ist das Indel, welches als STS-Marker verwendet wurde. Zum Vergleich die mRNA-Sequenz von UdpD aus der Datenbank.

Der Sequenzunterschied zwischen den Sorten `Post` und `Vixen` aufgrund des Indels konnte erfolgreich als STS-Marker in der DH-21-Population der Kreuzung `Post` x `Vixen` kartiert werden (Abb. 4.15). Darüber hinaus konnten weitere Marker als CAPS oder SNPs kartiert werden (s.u.).

4.6.2 Entwicklung von CAPS-Markern

Die bekannten Sequenzen wurden mit dem Programm Vector NTI dargestellt und auf Restriktionsschnittstellen mit einer Auswahl an vorhandenen Enzymen untersucht. Ein CAPS-Marker konnte von der Sequenz, welche auf genomischer DNA mit dem Primerpaar F6-1f erstellt wurde, abgeleitet werden. Die ursprüngliche Sequenz F6-1 der cDNA-AFLP Kombination E11/M14 wurde aus der Linie DH21-136 isoliert und hat eine hohe Homologie zu einer Cysteinsynthase. In der Sorte 'Vixen' wurde eine Restriktionsschnittstelle des Enzyms *TaqI* identifiziert, welche nicht in der Sequenz der Sorte 'Post' vorliegt (Abb. 4.7). Der Unterschied konnte erfolgreich als CAPS-Marker (Tab. 9.4) in der DH21-Population der Kreuzung 'Post' x 'Vixen' kartiert werden (Abb. 4.16).

F6-1f_`Post´	(1)	GACGTAATTCAAATCGCCAGAAGGCCAACACAGAGTATTCCCCATTGCT
F6-1f_`Vixen´	(1)	GACGTAATTCAAATCGCCAGAAGGCCAACACAGAGTATTCCCCATTGCT
F6-1f_`Post´	(51)	ACACAAAGTGGGACTCAAACCTTGCAAGGGCTTAAATGTCAGACCAACACT
F6-1f_`Vixen´	(51)	ACACAAAGTGGGACTCAAACCTTGCAAGGGCTTAAATGTCAGACCAACACT
F6-1f_`Post´	(101)	AGCAGGGACACCAAAGCTTTTATTTCTGTAGAGGGGCTCCTATGAACGG
F6-1f_`Vixen´	(101)	AGCAGGGACAGCAAAGCTTTTATTTCTGTAGAGGGGCTCCTTTGAACGG
F6-1f_`Post´	(151)	AGGGATTTGACTTTGGAAAACAGCTTTGCGCGCT TCG AGGAGTCTCGGGGG
F6-1f_`Vixen´	(151)	AGGGATTTGGCTTCGAAAACAGCTTTGCGCGCT TCG AGGAGTCTCGGGGA
F6-1f_`Post´	(201)	TCACTCCACCACCATGCTCTCGGCCTCCTTCTTGATGGAGTGGAAGAGCA
F6-1f_`Vixen´	(201)	TCACTCCACCACCATGCTCTCGGCCTCCTTCTTGATAGAGTGGAAGAGCA
F6-1f_`Post´	(251)	CCGACGAAAGGTAGCGCTCTCCGAAGCTTGGGAATACAACCTACACAGGA
F6-1f_`Vixen´	(251)	CCGACGAAAGGTAGCGCTCTCCGAAGCTTGGGAATACAACCTACACAGGA

Abb. 4.7: Alignment der ersten 300 bp der Sequenzen von genomischer DNA der Sorten 'Post' und 'Vixen', amplifiziert mit dem Primer F6-1f. Fett hervorgehoben ist die Restriktionsschnittstelle des Enzyms *TaqI* (5'-T[^]CGA-3') an Position 185, welche in 'Post' fehlt und als CAPS-Marker verwendet wurde.

4.6.3 SNP-Marker

Die Sequenzen der auf genomischer DNA der Sorten amplifizierten Fragmente (allelspezifische Sequenzierung) wurden in Vector NTI mit dem Programm AlignX vergleichend dargestellt. Für Sequenzen, die einen Polymorphismus zwischen den Sorten 'Post' und 'Vixen' in Form eines SNP erkennen ließen, wurden erneut Primer für eine Pyrosequenzierung abgeleitet.

Die Primersequenzen und Annealingtemperaturen können der Tabelle 9.5 (Anhang) entnommen werden. Im Folgenden sind die Alignments der allelspezifischen Sequenzierung nach Primern (Markern) getrennt dargestellt.

Die SNP-Marker wurden erfolgreich in der DH-21-Population der Kreuzung 'Post' x 'Vixen' kartiert (s. Abb. 4.13 bis 4.18).

N5-1f_`Post´	(1)	TGGAGGAAGAACAGCATGTAAAGGATGTAACAAAGTATTCTGATCTAGA
N5-1f_`Vixen´	(1)	TGGAGGAAGAACAGCATGTAAAGGATGTAACAAAGTATTCTGATCTAGA
N5-1f_`Post´	(51)	CAAAGCATATGTTGTTTGTGATACGCCTGCTTCATGTTCTGTCTCAAC
N5-1f_`Vixen´	(51)	CAAAGCATATGTTGTTTGTGATACGCCTGCTTCATGTTCT C GTCTCAAC
N5-1f_`Post´	(101)	CTCGAACCATCTGGAAA
N5-1f_`Vixen´	(101)	CTCGAACCATCTGGAAA

Abb. 4.8: Alignment der Sequenzen von genomischer DNA der Sorten 'Post' und 'Vixen', amplifiziert mit den Primern N5-1f. Fett hervorgehoben ist der SNP (T/C) an Position 92, welcher als Marker verwendet wurde.

Die Primerkombination N5-1f wurde von der 397 bp langen (in BLAST-Vergleichen unbekannt) Sequenz der cDNA-AFLP Kombination E17/M13 abgeleitet, welche in BYDV infizierten Pflanzen herunterreguliert war.

Bei der Pyrosequenzierung wurde der SNP (T/C) von N5-1f als A/G detektiert, da der Plusstrang biotinmarkiert wurde (s. Tab. 7.5) und somit der komplementäre Strang mit dem Sequenzierungsprimer vervollständigt wurde (Abb. 4.13).

K24D18_`Post´	(1)	AGTCGATGGCAAACATTGGATGGT A TGATTGGGCAGCTGTGCATTCGGGA
K24D18_`Vixen´	(1)	AGTCGATGGCAAACATTGGATGGT G TGATTGGGCAGCTGTGCATTCGGGA
K24D18_`Post´	(51)	TCAAATCAAG
K24D18_`Vixen´	(51)	TCAAATCAAG

Abb. 4.9: Alignment der Sequenzen von genomischer DNA der Sorten 'Post' und 'Vixen', amplifiziert mit den Primern K24D18. Der SNP (A/G) an Position 25 wurde als Marker verwendet.

Mit der cDNA-AFLP Kombination E25/M25 konnte die 256 bp lange Sequenz D18-24 erhalten werden, welche in BYDV infizierten Pflanzen heraufreguliert war.

Die Primerkombination K24D18 wurde von dieser Sequenz abgeleitet, für die keine nähere Funktionsbeschreibung in den Datenbanken gefunden wurde.

Die Pyrosequenzierungsreaktion des SNP (A/G) von K24D18 detektierte, auf Grund der Biotinmarkierung des Plusstranges, die komplementären Nukleotide T/C (Abb. 4.14).

Ergebnisse

```
S1_7f_`Post´      (1) AATGCTGGAACATGGTATGTAGTTCCTAGCCCGTGCAGGGGCATGGGTTG
S1_7f_`Vixen´    (1) AATGCTGGAACATGGTATGTAGTTCCTAGCCCGTGCAGGGGCATGGGCTG

S1_7f_`Post´     (51) ATGCCTAGTTTAAACTAACTATAAAATCAAGTTCATCGACTATACATGATT
S1_7f_`Vixen´   (51) ATGCATAGTTTAAACTAACTATAAAATCAAGTTCATCGACTATACATGATT

S1_7f_`Post´     (101) GGGA
S1_7f_`Vixen´   (101) GGGA
```

Abb. 4.10: Alignment der Sequenzen von genomischer DNA der Sorten `Post´ und `Vixen´, amplifiziert mit den Primern S1-7f. Fett hervorgehoben sind die SNPs an Position 48 (T/C) bzw. 55 (C/A), welche als Marker verwendet wurden.

Die Primer S1-7f liegen in der 252 bp langen Sequenz S1-7 der cDNA-AFLP Kombination E13/M12, isoliert aus `Post´. Eine mögliche Funktionsbeschreibung für die Sequenz ist nicht verfügbar.

```
K5_4f_`Post´     (1) GTGCTATACTCTCCATGGGTGTCTAGGCCTATCCGAGCGCGTTGCGCAAC
K5_4f_`Vixen´   (1) GTGCTATACTCTCCATGGGTGTCTAGACCTATCCGAGCGCGTTGCGCAAC

K5_4f_`Post´     (51) ATCCATAGAGCTAGCGTCTTCCATCTTCTG
K5_4f_`Vixen´   (51) ATCCATAGAGCTAGCGTCTTCCATCTTCTG
```

Abb. 4.11: Alignment der Sequenzen von genomischer DNA der Sorten `Post´ und `Vixen´, amplifiziert mit den Primern K5-4f. Fett hervorgehoben ist der SNP an Position 27 (G/A), welcher als Marker verwendet wurde.

Die Primerkombination wurde von der 364 bp langen Sequenz K5-4 abgeleitet, welche mit der cDNA-AFLP Kombination E16/M25 erhalten wurde, keine signifikante Übereinstimmung in Datenbankvergleichen zeigte und aus der Sorte `Post´ isoliert wurde.

K12D08_`Post´	(1)	GTCATATGTTGGATTGGTGTAGCCAAA A CACTGCTTCTGTTGAAGTGTC
K12D08_`Vixen´	(1)	GTCATATGTTGGATTGGTGTAGCCAAA G CACTGCTTCTGTTGAAGTGTC
K12D08_`Post´	(51)	TCGCGCTCTTTT
K12D08_`Vixen´	(51)	TCGCGCTCTTTT

Abb. 4.12: Alignment der Sequenzen von genomischer DNA der Sorten `Post´ und `Vixen´, amplifiziert mit den Primern K12D08. Der SNP (A/G) an Position 28, wurde als Marker verwendet.

Die Sequenz D8-12, isoliert aus `Post´ von der cDNA-AFLP Kombination E25/M24 ist der Ursprung der abgeleiteten Primerkombination K12D08. In Datenbankvergleichen zeigte die 122 bp lange Sequenz D8-12 keine signifikanten Übereinstimmungen.

4.6.4 Kartierung der Marker in der DH-Population `Post´ x `Vixen´

Die Kartierung der einzelnen Marker erfolgte durch Integration der abgeleiteten Marker in die bestehende Kartierungspopulation (DH21-Population der Kreuzung `Post´ x `Vixen´) von SCHEURER et al. (2001). Die von den genannten Autoren publizierte Reihenfolge der Marker auf den einzelnen Chromosomen wurde bei der Kartierung vorgegeben, so dass lediglich die erstellten Marker neu integriert wurden. Im Folgenden ist die Kartierung der abgeleiteten Marker nach Chromosomen getrennt dargestellt.

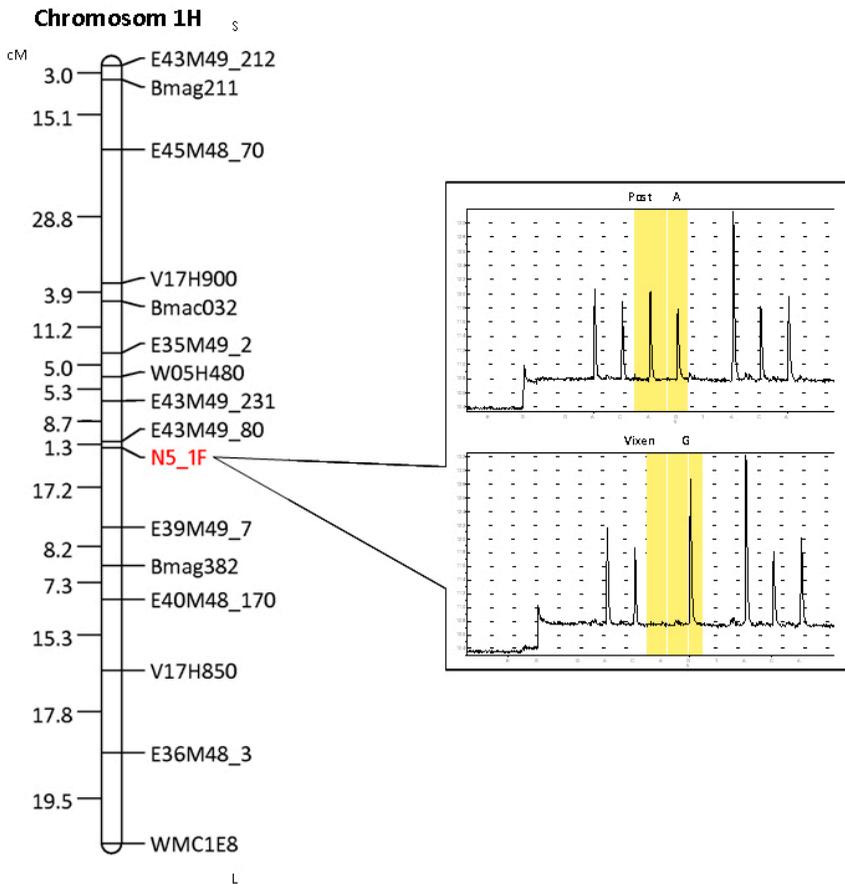


Abb. 4.13: Position des SNP-Markers N5_1F (Pyrogramme der Elternsorten 'Post' [A] und 'Vixen' [G] auf Chromosom 1H.

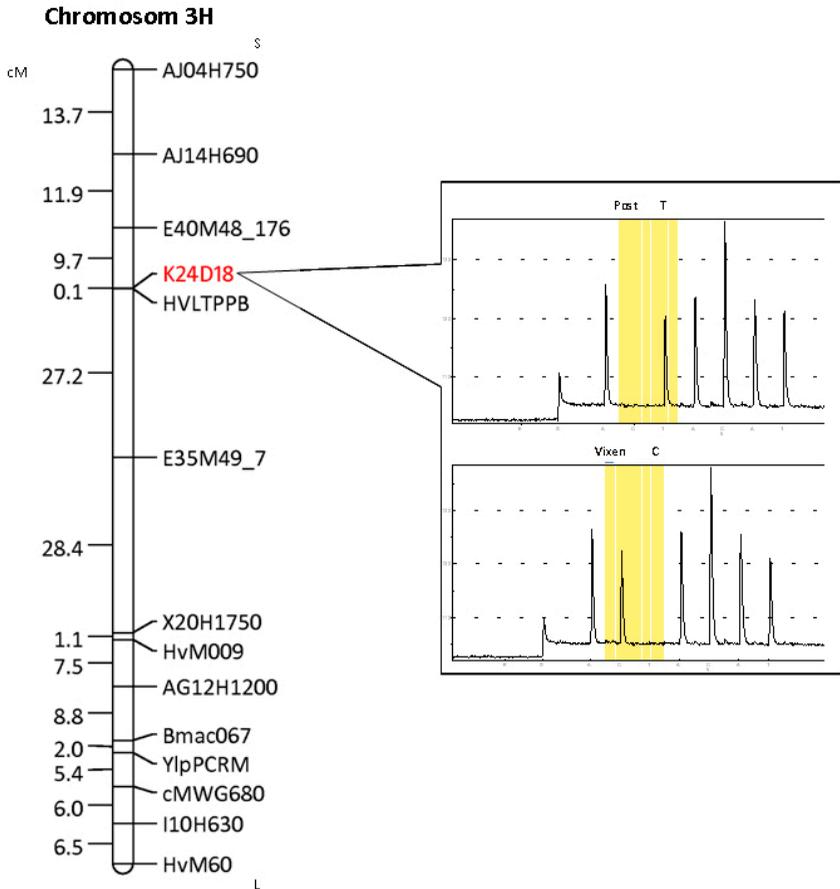


Abb. 4.14: Lage des SNP-Markers K24D18 (Pyrogramme der Elternsorten 'Post' [T] und 'Vixen' [C] auf Chromosom 3H.

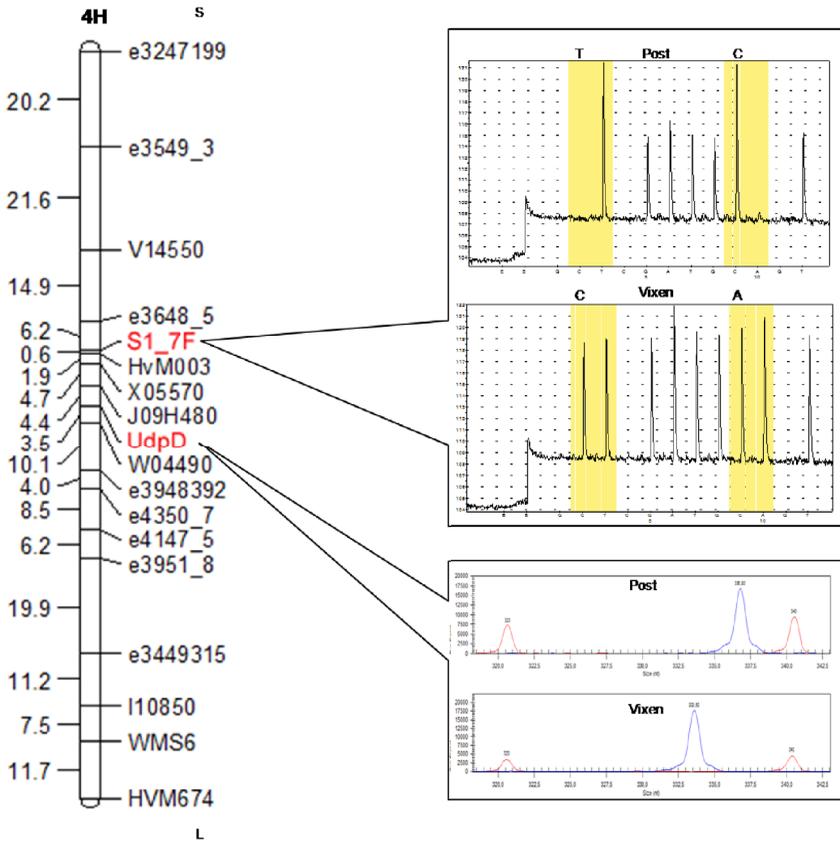


Abb. 4.15: Position der SNP-Marker S1_7F (Pyrogramme der Elternsorten 'Post' [T_C] und 'Vixen' [C_A]) und STS-Marker UdpD (Elektropherogramme von 'Post' [336 bp] und 'Vixen' [333 bp]) auf Chromosom 4H.

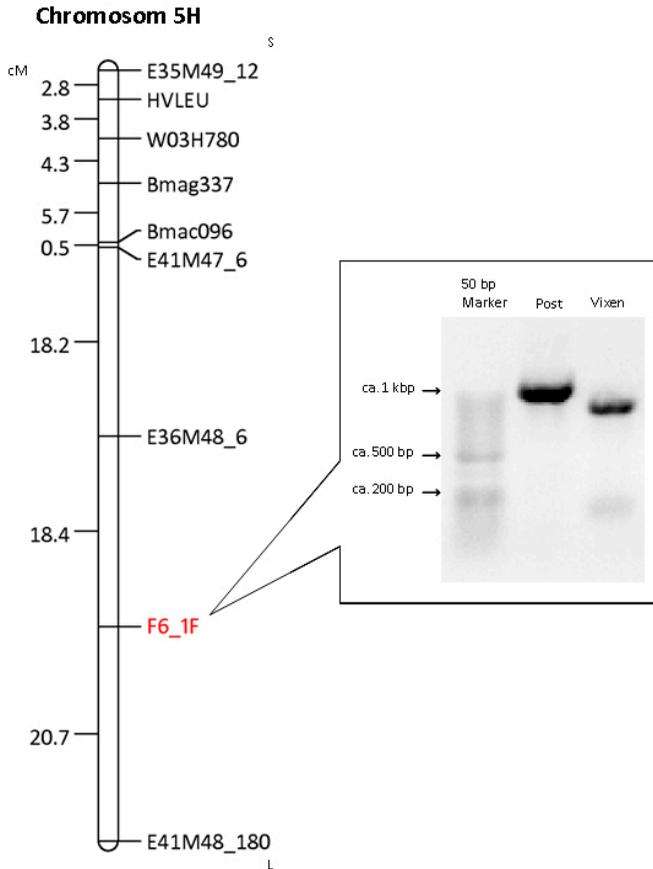


Abb. 4.16: Position des CAPS-Markers F6_1F (Fragmente der Elternsorten 'Post' [ca. 1100 bp] und 'Vixen' [ca. 900 bp] nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *TaqI*) auf Chromosom 5H.

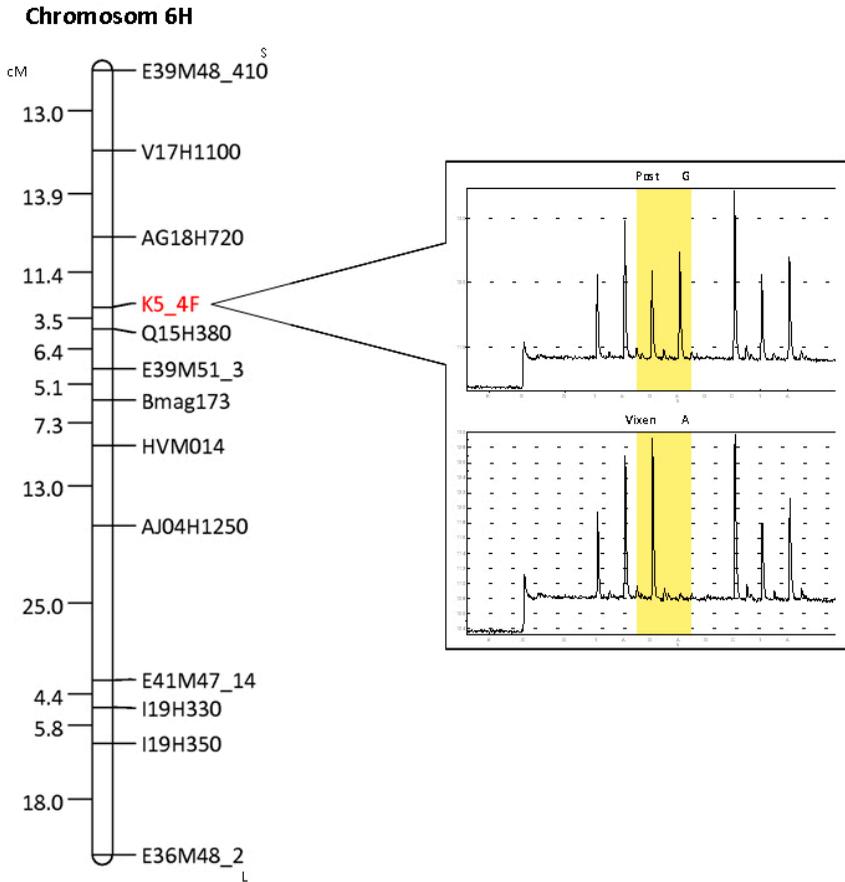


Abb. 4.17: Position des SNP-Markers K5_4F (Pyrogramme der Elternsorten 'Post' [G] und 'Vixen' [A] auf Chromosom 6H.

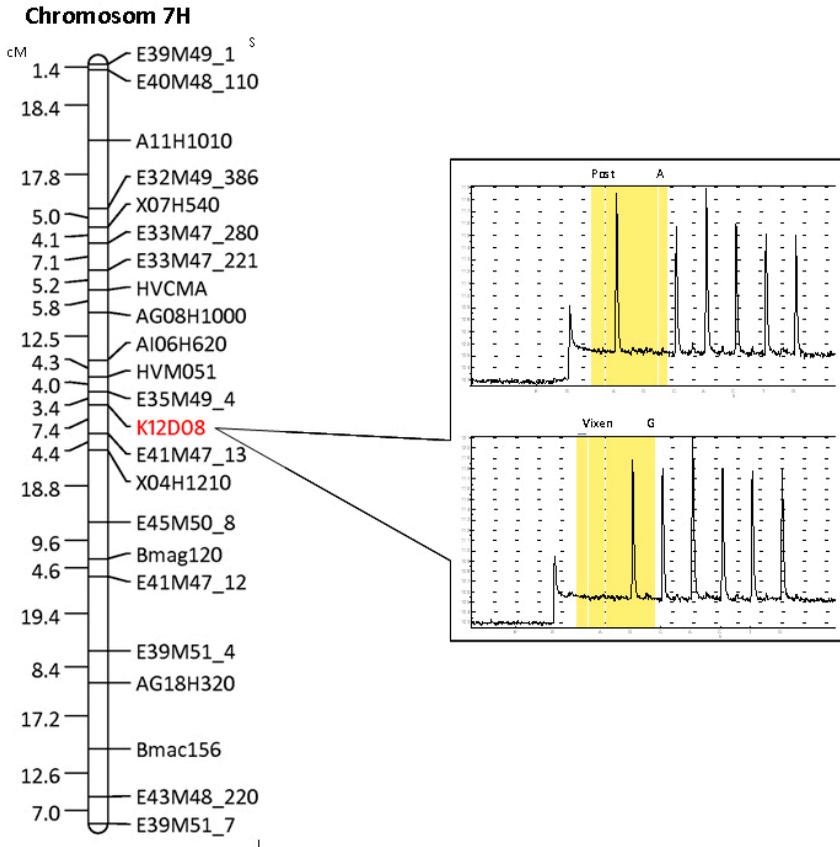


Abb. 4.18: Position des SNP-Markers K12D08 (Pyrogramme der Elternsorten 'Post' [A] und 'Vixen' [G] auf Chromosom 7H).

4.6.5 Vergleich der Markerpositionen mit bekannten QTL

Die Fragmente L8-3f (Fucosyltransferase) und O2-3f (Dihydrolipoamiddehydrogenase) konnten dem Chromosom 1H zugeordnet werden. Der entwickelte SNP-Marker aus der Sequenz N5-1f (unknown Protein) konnte eindeutig auf Chromosom 1H kartiert werden (Abb. 4.13).

Ergebnisse

Von TOOJINDA et al. (2000) ist in der Kreuzungspopulation `Shyri´ x `Galena´ ein QTL bezüglich der BYDV-Reaktion auf Chromosom 1H beschrieben worden. Die Lage dieses QTL in `Shyri´ x `Galena´ entspricht in etwa dem in `Post´ x `Vixen´ lokalisierten SNP N5-1f (Abb. 4.13), welcher ebenfalls proximal kartiert. Ein exakter Vergleich der Karten zwischen TOOJINDA et al. (2000) und SCHEURER et al. (2001) ist aufgrund fehlender gemeinsamer Kartierungsmarker nicht möglich.

Die Marker M1-3f (Glutamatrezeptor), K15D08 (Dihydrodipicolinatreduktase) und C2-2f (unbekannt) konnten mit Hilfe der Additionslinien dem Chromosom 2H zugeordnet werden, wobei die Primer K15D08 auch auf den Chromosomen 4H und 7H amplifizierten und die Primerkombination C2-2f zusätzlich Fragmente auf den Chromosomen 3H, 5H und 6H zeigte. Ein direkter Zusammenhang mit den von SCHEURER et al. (2001) beschriebenen QTL für das Tausendkorngewicht und den Kornertrag/Pflanze auf dem langen Arm von Chromosom 2H kann nicht hergeleitet werden. Die Fragmente P1-5f (unbekannt), O3-1f (unbekannt), C2-2f (s.o.) konnten mit den Additionslinien dem Chromosom 3H zugeordnet werden. Der SNP-Marker K24D18 (unbekannt) kartiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 3H in unmittelbarer Nähe zu dem Mikrosatelliten HVLTPPB. Der Abstand zu kartierten QTL-Regionen auf Chromosom 3H (SCHEURER et al., 2001; TOOJINDA et al., 2000) beträgt über 64 cM bzw. 85 cM. Auf Chromosom 4H amplifizierten die Primerkombinationen K15D08 (s.o.), S3-3r (unbekannt) und L7-2f (Transketolase). Die Marker S1-7f (SNP [unbekannte Sequenz]) und UdpD (UXS1) konnten eindeutig auf Chromosom 4H kartiert werden. Die bekannten QTL für die Merkmale Kornzahl/Ähre und Ährenzahl/Pflanze (SCHEURER et al., 2001) liegen jedoch über 20 cM entfernt auf dem langen Arm dieses Chromosoms, ebenso wie der von TOOJINDA et al. (2000) in `Shyri´ x `Galena´ beschriebene QTL für Verzweigung/Bestockung.

Auf Chromosom 5H konnte der CAPS Marker F6-1f (Cysteinsynthase) kartiert werden. In der Untersuchung anhand der Additionslinien (s.o.) wurde C2-2f ebenfalls auf Chromosom 5H lokalisiert. Der Abstand zwischen dem QTL für die Ährenzahl/Pflanze (SCHEURER et al., 2001) und dem Marker F6-1f umfasst ca. 10 cM. Die Fragmente C2-2f und O3-1f kartierten unter anderem auch auf Chromosom 6H. Eindeutig dem Chromosom 6H zugeordnet werden konnte der SNP Marker K5-4f. Entsprechende QTL hinsichtlich einer Reaktion auf eine BYDV-Infektion sind für Chromosom 6H der analysierten Population nicht beschrieben. Nach NIKS et al. (2004) kartiert in einer anderen Population der Toleranzlocus *Ryd3* aus der Linie `L94´ auf Chromosom 6H, jedoch liegt dieser - im Gegensatz zum SNP K5-4f - im Centromerbereich des Chromosoms und konnte in `Post´ und `Vixen´ nicht nachgewiesen werden. Der SNP Marker K12D08 konnte eindeutig auf Chromosom 7H kartiert werden, liegt jedoch proximal von dem bekannten QTL für die Merkmale Kornzahl/Ähre und Ährenschiebedatum (SCHEURER et al., 2001) und dem von TOOJINDA et al. (2000) beschriebenen QTL für BYDV.

5 Diskussion

Die Charakterisierung der mit unterschiedlichen Toleranzen beschriebenen Linien 'Post' und 'Vixen', sowie ausgewählten doppelhaploiden (DH) Linien der Kreuzung 'Post' x 'Vixen' (SCHEURER et al., 2001) mit Hilfe des cDNA-AFLP ergab, neben einzelnen differentiell regulierten Genen, drei Hauptstoffwechselwege, bei denen eine differentielle Genexpression detektiert werden konnte. Dies sind Synthesewege der Aminosäurebiosynthese, der Zellwandsynthese und Stoffwechselwege des Kohlenhydratmetabolismus. Es wurden Marker erstellt, mit denen die gefundenen Unterschiede in der vorhandenen Population kartiert werden konnten. Ein direkter Zusammenhang zwischen den gefundenen differentiell regulierten Genen und den beschriebenen Toleranzen von 'Vixen' (SCHALLER et al., 1964) und 'Post' (SCHEURER et al., 2001) konnte, aufgrund der Kartierung in anderen Regionen als den beschriebenen Toleranzloci *Yd2* und QTL-Regionen nicht nachgewiesen werden.

5.1 Untersuchung der Genexpression mit cDNA-AFLP

Für die Darstellung der differentiellen Genexpression nach einer BYDV-Infektion in Gerstenpflanzen kam die Methode des cDNA-AFLP zum Einsatz. Die Methode beinhaltet das Standard-AFLP-Protokoll von Vos et al. (1995), welches mit cDNA durchgeführt wird (BACHEM et al., 1996). Mit dem cDNA-AFLP können theoretisch alle Gene, inklusive selten exprimierter Gene, dargestellt werden und eine Differenzierung von quantitativen Unterschieden ist möglich. Vorteile des cDNA-AFLP sind, dass, im Gegensatz zu Hybridisierungen auf Microarrays, eine geringe Menge an RNA als Ausgangsmaterial ausreichend ist und auch unbekannte Sequenzen (Gene) detektiert werden können. Durch die Adapterligation an die cDNA-Fragmente kann eine spezifische PCR durchgeführt werden, die zu weniger Falschpositiven und einer besseren Reproduzierbarkeit führt, als bei der Methode des mRNA Differential Display (LIANG UND PARDEE, 1992). Ein hoher Arbeitsaufwand ist als Nachteil zu nennen.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle möglichen 256 Primerkombinationen der Kombination EcoRI+NN/MseI+NN durchgeführt. Die Größe der Genfragmente variierte von ca. 50 bp bis 500 bp, wobei insgesamt ca. 15000 Genfragmente dargestellt werden konnten. Die Größenordnung der erhaltenen Fragmentanzahl im cDNA-AFLP wurde auch von anderen Autoren beschrieben (BACHEM et al., 1996; VAN DER BIEZEN et al., 2000; ECKEY, 2002), welche von einer Abdeckung des Transkriptoms von ca. 60 % ausgehen.

Die im Screening mit den fluoreszenzmarkierten Primern auf den Fragmentanalysegeräten detektierten Banden, welche interessante Differenzen zeigten, konnten bei einer Auftrennung im Polyacrylamidgel mit Silbernitratfärbung wiedergefunden werden. Zusätzlich wurden weitere Fragmente detektiert, aufgrund der vollständigen Färbung aller Fragmente mit Silbernitrat, während in der Fluoreszenzdetektion nur Banden detektiert werden konnten, welche mindestens einen markierten Primer (nur die *EcoRI*+*NN*-Primer waren fluoreszenzmarkiert) beinhalten. Alle aus dem Gel isolierten Banden konnten mit den spezifischen AFLP-Primern reamplifiziert werden. Nahezu alle ließen sich erfolgreich in T/A-Vektoren klonieren und sequenzieren, wobei die Sequenzen zum Teil von mehreren verschiedenen Fragmenten stammten. Bei der Isolierung von cDNA-AFLP-Fragmenten besteht diese Problematik grundsätzlich und wurde ebenso von DITT et al. (2001) beschrieben. Von jedem isolierten Fragment wurden 6 Klone sequenziert und die am häufigsten vorkommende Sequenz als die Differentielle angenommen. Datenbankvergleiche führten nicht für alle Sequenzen zu näheren Funktionsbeschreibungen. Es sind zwar bisher mehr als 500.000 ESTs aus Gerste öffentlich verfügbar, wovon jedoch einem großen Teil bisher noch keine Funktionen zugeordnet werden konnten (TOMMASINI et al., 2008).

5.2 In BYDV-infizierten Pflanzen herunterregulierte Genfragmente

5.2.1 UDP-D-Glucuronatdecarboxylase

Im cDNA-AFLP wurde ein Teil der Sequenz der UDP-D-Glucuronatdecarboxylase, Synonym für UDP-D-Xyl Synthase (UXS) identifiziert. Dieses Enzym war in infizierten Pflanzen herunterreguliert. Die UXS katalysiert in einer irreversiblen Reaktion die Synthese von UDP-D-Glucuronat zu UDP-D-Xylose, welche Glykosyl Reste für die Biosynthese von Heteroxyylan und Xyloglucan bereitstellt. Das UXS-Enzym gehört zu einer Genfamilie, die cytosolische und Membran-gebundene UXS-Enzyme kodieren (ZHANG et al., 2005) und ist in Pflanzen allgegenwärtig, aufgrund der zentralen Rolle der gegenseitigen Umwandlung von Zucker und Nucleotiden und in der Biosynthese der Zellwand (SEIFERT, 2004). Das Produkt der UXS Reaktion, UDP-D-Xylose, ist beteiligt an der Biosynthese von Xyloglucanen, Arabinoxylan und pektischen Kohlenhydraten (REITER UND VANZIN, 2001). Das Enzym hat vor allem in den *Poaceae* eine wichtige Funktion, da hier besonders hohe Anteile an Arabinoxylan in den Zellwänden vorliegen. Variationen in der Aktivität von UXS verändern die Zusammensetzung der Zellwand, vor allem bei den *Poaceae* und das Enzym wird regulatorisch kontrolliert (ZHANG et al., 2005). BAR-PELED et al. (2001) konnten zeigen, dass die Synthese von UDP-D-Xylose durch Produkte der UXS-Reaktion inhibiert werden kann.

Im cDNA-AFLP wurde UXS1 gefunden, welches nach ZHANG et al. (2005) im Cytosol vorliegt, im Gegensatz zu UXS2-UXS4, welches Membran-gebundene Enzyme sind. UXS nimmt in höheren Pflanzen eine zentrale Rolle bei der Produktion von Pentose-Zuckern ein. Bei den *Poaceae* bestehen Arabinoxylane hauptsächlich aus Pentose-Resten und sind die Haupt-Polysaccharidkomponenten der Zellwandmatrix in den meisten Geweben.

Durch nekrotische Verschlüsse der Siebzellen und der angrenzenden Parenchymzellen, durch Anreicherung von undefinierten Komponenten: „wound gum“ nach einer BYDV Infektion (ESAU, 1957a, 1957b), kommt es zur Störung des Phloems und Desorganisation von Zellkompartimenten, wodurch es zu einer verringerten Translokation von Metaboliten und einer Anreicherung von löslichen Kohlenhydraten und Stärke im Blatt kommt (JENSEN, 1968, 1969). Eine herunterregulierte UXS1, in Verbindung mit einer herunterregulierten Fucosyltransferase (siehe 5.2.5) könnte dazu führen, dass Zellwandbestandteile unvernetzt bleiben, sich im Phloem anreichern und es als Folge davon zu einem Verschuß der Siebzellen kommen kann. Durch den blockierten Transport der löslichen Kohlenhydrate von Source nach Sink wird im Blatt das Verhältnis von löslichen Kohlenhydraten zu höheren, die in gebundener Form vorliegen, deutlich verschoben. Ein deutlich verringertes Längenwachstum, welches neben einer Internodienverkürzung der oberirdischen Pflanzenteile auch das Wurzelwachstum betreffen kann (MILLER UND RASOCHOVÁ, 1997), könnte durch eine verminderte Bildung von Arabinoxylan hervorgerufen werden. Obwohl ein höherer mRNA-Level von UXS zu höheren Gehalten an Arabinoxylan in der Zellwand zu führen scheint, gibt es nach ZHANG et al. (2005) keine eindeutigen Belege, dass eine höhere Aktivität von UXS-Enzymen einen direkten Effekt auf den Flux von Kohlenhydraten oder die Zellwandzusammensetzung hat.

5.2.2 L-allo-Threonin Aldolase

In BYDV infizierten Pflanzen wurde das Enzym L-allo-Threonin Aldolase nach einer Infektion herunterreguliert. Die L-allo-Threonin Aldolase ist eine von drei Varianten der Threonin Aldolase mit einer Substratspezifisierung für L-allo-Threonin (KATAOKA et al., 1997). Die Threonin Aldolase katalysiert die Umwandlung von Threonin in Glycin und ist mitverantwortlich für die Glycinsynthese in der Zelle (LIU et al., 1997). Glycin ist eine wichtige zelluläre Komponente, die vom Peroxisom ins Mitochondrium exportiert wird und über mehrere Biosynthesewege synthetisiert werden kann. Im Mitochondrium entsteht aus 2 Glycin unter Desaminierung und Decarboxylierung die Aminosäure Serin, welche der Proteinsynthese dient, oder wieder in den Kohlenhydratstoffwechsel der Chloroplasten eingeschleust wird (SCHOPFER UND BRENNICKE, 2006).

Glycin und Serin spielen als Proteinbausteine und Vorstufen verschiedener Komponenten wie Phospholipiden und Purinen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel (MOUILLON et al., 1999). Bei *Saccharomyces cerevisiae* führte die Zerstörung des GLY1 Gens, welches für die Threonin Aldolase codiert, zu einer signifikant verminderten Wachstumsrate auf glucosehaltigem Medium, was auf die glycinogene Funktion der Threonin Aldolase als Haupt-Glycinquelle hinweist (MONSCHAU et al., 1997).

Im Zusammenhang mit einer hohen Glucosekonzentration in der Pflanze bei einem Befall mit BYDV, die möglicherweise dazu beiträgt, dass ein großer Teil des Glycins über die Threonin Aldolase synthetisiert wird, würde eine erhöhte Konzentration von Glycin zu einer verminderten Expression der Threonin Aldolase führen und über eine Feedback-Reaktion möglicherweise auch weitere Enzyme im Stoffwechselweg der Aminosäure Threonin herunterregulieren. Dieser Zusammenhang wird deutlich durch die Herunterregulierung eines weiteren Enzymes in diesem Stoffwechselweg, die Dihydrolipoamiddehydrogenase.

5.2.3 Dihydrolipoamiddehydrogenase

Dihydrolipoamiddehydrogenase (LPD) kommt in Pflanzen in den Chloroplasten und Mitochondrien vor und katalysiert die Re-oxidation von reduzierten Lipoamid-prothetischen Gruppen, gekoppelt an die NADH-Produktion (CONNER et al., 1996). LPD ist entscheidend für die Funktion von zwei Multienzymkomplexen, welche eine wesentliche Rolle bei der Blattatmung der Pflanzen spielen: Dem Pyruvatdehydrogenase Komplex (PDC) und dem Glycin Decarboxylase Komplex (GDC), wo die LPD verantwortlich für den Elektronentransfer ist (DOUCE et al., 2001). PDC ist Bestandteil der Mitochondrien aller eukaryotischen Organismen und katalysiert eine entscheidende Schlüsselstufe im Kohlenhydratmetabolismus: die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat und der damit verbundenen Entstehung von CO₂, Acetyl-CoA und NADH. GDC katalysiert mit der Serin-Hydroxymethyltransferase die Photorespiration in den Mitochondrien (BOURGUIGNON et al., 1996).

In BYDV infizierten Pflanzen war eine verringerte LPD Aktivität zu verzeichnen. Im Zusammenhang mit der oben beschriebenen L-allo-Threonin Aldolase, welche Glycin als Ausgangssubstrat für den GDC zur Verfügung stellt, wo aus Glycin unter Desaminierung und Decarboxylierung die Aminosäure Serin entsteht, sind somit zwei entscheidende Enzyme, welche an der Synthese von polaren Aminosäuren beteiligt sind, in infizierten Pflanzen herunterreguliert.

Ein direkter Einfluß auf den Habitus der infizierten Pflanze kann nicht abgeleitet werden, jedoch wird in Pflanzen über den Biosyntheseweg der Aminosäuren von Aspartat aus, ein Viertel der Aminosäuren gebildet, die für die Biosynthese der Proteine benötigt werden (VIOLA, 2001). Aufgrund der Zusammenhänge der Biosynthesewege von Threonin, Methionin und Lysin, würde eine Blockierung im Biosyntheseweg über mögliche Feedbackreaktionen für eine Aminosäure, die Bildung der anderen ebenfalls inhibieren und könnte somit zu deutlichem Mangel führen. BRIGHT et al. (1978) konnten so eine Feedback-Inhibierung der vorgeschalteten Enzyme in Gerstenpflanzen zeigen.

5.2.4 Transketolase

Das Enzym Transketolase (TK) konnte im cDNA-AFLP nach einer BYDV Infektion als herunterreguliert identifiziert werden. TK ist in Chloroplasten lokalisiert und katalysiert den reversiblen Transfer von C₂-Einheiten von Ketosezuckern auf Aldosezucker. Die TK ist damit involviert in die Bereitstellung von Ausgangsprodukten des Phenylpropanoidmetabolismus, der Nukleotidsynthese, des Kohlenhydratmetabolismus und der Glycolyse (HENKES et al., 2001). Eine wichtige Funktion der TK in Pflanzen betrifft den Calvinzyklus, indem Fructose-6-Phosphat in Xylulose-5-Phosphat konvertiert wird (SCHNARRENBARGER et al., 1995). Untersuchungen in Antisense Transformanten von Tabak zeigten starke Auswirkungen einer verminderten TK Aktivität auf die Photosynthese und den Kohlenhydratmetabolismus der Pflanzen. Insbesondere starke Inhibierung der TK Aktivität führte zu einer Inhibierung der Photosynthese, Verringerung der Gehalte an Aminosäuren und Lignin, einem deutlichen Rückgang von Ribulose-1,5-Bisphosphat und der daraus resultierenden Akkumulation von Fructose im Chloroplasten und einem verringerten Pflanzenwachstum (HENKES et al., 2001). Die verzeichneten Verluste an Chlorophyll wurden von den Autoren als indirekte Konsequenz einer geringen TK Aktivität angesehen.

Insbesondere in Bezug auf die Veränderungen nach einer BYDV Infektion, wie Chlorosen oder die Anreicherung von Kohlenhydraten, stellt die verminderte Photosynthese einen besonderen Punkt dar, da die Photosynthese von zahlreichen Enzymen abhängt, die zum einen feinreguliert werden, wie die Ribulosebisphosphatcarboxylase (RUBISCO) und zum anderen keiner Feedbackregulation unterliegen, wie die TK und damit eine verminderte Aktivität des Enzyms nicht kompensiert werden kann. Die TK wird ebenfalls von HENKES et al. (2001) als ein Schlüsselenzym des pflanzlichen Metabolismus angesehen.

5.2.5 Fucosyltransferase

Im cDNA-AFLP wurde das Enzym Fucosyltransferase identifiziert, welches in infizierten Pflanzen herunterreguliert war. Die Fucosyltransferase katalysiert den Transfer von L-Fucose auf Oligosaccharide (CASTILHO et al., 2005) und ist im Golgiapparat lokalisiert (VON SCHAEWEN et al., 1993). L-Fucose ist als Monosaccharid eine Komponente von pflanzlichen Glycoproteinen und der pflanzlichen Zellwand, wie Xyloglucan. L-Fucose stabilisiert dabei das Xyloglucan, welches effizient an Cellulose-Mikrofibrillen gebunden werden kann und die Zellwandintegrität gewährleistet (BONIN et al., 1997).

Analog zur beschriebenen Verringerung der UXS (5.2.1) könnte eine verringerte oder gestörte Expression der Fucosyltransferase zu einem verringerten Wachstum des Sprosses und der Wurzel beitragen, wie es von MILLER UND RASOCHOVÁ (1997) nach einer BYDV Infektion beschrieben wurde, da zum einen nicht ausreichend Zellwandmaterial synthetisiert werden kann, oder die Zellwände nicht stabil genug sind, um ein Längenwachstum der Pflanze zu ermöglichen.

Alle in BYDV infizierten Pflanzen herunterregulierten Gene codieren für Enzyme, die einen Einfluß auf den Habitus der Pflanzen haben. Sie sind somit mit verantwortlich für das typische Symptombild des Zwergwuchses nach einer BYDV Infektion.

5.3 In BYDV-infizierten Pflanzen heraufregulierte Sequenzen

Es konnten im cDNA-AFLP mehrere unterschiedliche Fragmente isoliert werden, welche nach Datenbankvergleichen als möglicherweise Seneszenz assoziiert charakterisiert wurden. Seneszenz ist ein integraler Teil der Blattentwicklung, welcher durch eine Interaktion des Nucleus und des Chloroplasten zustande kommt. Ein Großteil der während der Seneszenz aktivierten Gene sind jedoch nicht Seneszenz spezifisch aktiviert, sondern in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze auf niedrigem Niveau nachweisbar. Es können 6 verschiedene Klassen von Genen unterschieden werden (BUCHANAN-WOLLASTON, 1996). Zur Klasse I gehören die „housekeeping genes“, die essentielle metabolische Aktivitäten der Zelle kontrollieren und auf einem konstanten Niveau während des gesamten Lebenszyklus der Pflanze exprimiert werden. Klasse II und III enthalten Gene, die in grünen Blättern exprimiert werden, deren Expression jedoch die Seneszenz zu einem späteren Zeitpunkt beeinflusst. Zur Klasse IV zählen die regulatorischen Gene, welche nur für eine kurze Zeit vor oder während der Seneszenz exprimiert werden.

Die Klassen V und VI umfassen Gene, die für die Mobilisierung von essentiellen Nährelementen wie N, P, K und Spurenelementen vor allem bei Gehölzen entscheidend sind. Bisher sind mehr als 100 Seneszenz-assoziierte Gene (SAGs) in verschiedenen Pflanzenspezies identifiziert worden (SCHOPFER UND BRENNICKE, 2006). Die erste sichtbare Veränderung während der Blattseneszenz ist der Verlust der Integrität der Plastiden durch Stoffe, die im Cytoplasma gebildet werden. Die Membranproteine der Chloroplasten werden abgebaut, wobei zwei verschiedene proteolytische Systeme aktiviert werden. Zum einen Stromaenzyme und oberflächengebundene Membranproteine und andererseits Enzyme, welche strukturelle Thylakoidkomponenten, inklusive Chlorophyll, abbauen (THOMAS UND STODDART, 1980). In Erbsen (*Pisum sativum*) wurde die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffarten (ROS) im Chloroplasten nach einer Virusinfektion nachgewiesen, welche durch die Zerstörung der Elektronentransportkette ausgelöst wurde (DIAZ-VIVANCOS et al., 2008). Es wurde vermutet, dass die Chloroplasten bei einer Virusinfektion die Quelle für oxidativen Stress darstellen.

Die im cDNA-AFLP identifizierte Chitinase, heraufreguliert in infizierten Pflanzen, wurde von BUCHANAN-WOLLASTON (1997) ebenfalls als Gen beschrieben, welches ein erhöhtes Expressionsniveau während der Seneszenz zeigt.

Oxidativer Stress in den Blattperoxisomen, welche eng an die Chloroplasten angelagert sind, resultiert aus der Oxidation von Glycolat mit O_2 , bei der H_2O_2 entsteht, das durch Katalase unschädlich gemacht wird (SCHOPFER UND BRENNICKE, 2006). ORLOB UND ARNY (1961) zeigten, dass die Katalaseaktivität in BYDV infizierten Pflanzen reduziert ist. In unmittelbarer Nähe der Chloroplasten können sich somit bei BYDV Befall reaktive Sauerstoffspezies anreichern. Die im cDNA-AFLP gefundenen, nicht näher definierbaren, Seneszenz assoziierten Proteine, heraufreguliert in BYDV infizierten Pflanzen, könnten unter anderem zu einem Abbau der plastidären Membranproteine führen, mit den Folgen des Verlustes der Integrität der Plastiden, des Verlustes der entsprechenden Enzymaktivitäten zum Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (siehe auch: 1.4.5 zu Peroxidase) und letztendlich einem Kollaps der Photosynthese. Fragment D19-17 des cDNA-AFLP, im BLASTX als Seneszenz assoziiert beschrieben, zeigte eine Ähnlichkeit zu PsbO2, einem von zwei ähnlichen Proteinen (PsbO) des Thylakoids, welches an regulatorischen Funktionen im Photosystem II beteiligt ist. Insbesondere für die Stabilität des Photosystems II ist PsbO nötig. Nach LUNDIN et al. (2007) liegt PsbO2 in einer geringen Konzentration in der Pflanze vor, als PsbO1. Bei einer Verringerung von PsbO1 in *Arabidopsis* Mutanten konnte gezeigt werden, dass erhöhte Gehalte an PsbO2 in der Pflanze zu verzeichnen sind, diese Pflanzen jedoch ein reduziertes Wachstum zeigten (MURAKAMI et al., 2005).

Die nach einer BYDV Infektion in Gerste heraufregulierten Gene betreffen Seneszenz assoziierte Proteine, die weitestgehend involviert sind in die Chlorosen, welche nach einer BYDV Infektion auftreten.

5.4 Konstitutiv in `Post` exprimierte Fragmente

Aufgrund der begrenzten Anzahl deutlicher Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen im cDNA-AFLP wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen den Sorten mit unterschiedlichem Toleranzgrad untersucht. Hierbei konnten insbesondere Fragmente isoliert werden, welche auf eine konstitutive Expression schließen lassen. Es handelt sich somit um grundsätzliche Unterschiede in der Genexpression zwischen den Sorten und DH21-Linien und nicht um spezifische Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen.

5.4.1 SNARE-binding (Calcium-lipid-Bindeprotein)

Im cDNA-AFLP konnte ein Fragment isoliert werden, welches in der Sorte `Post` vorhanden war, sowie in den DH-Linien 21-09 und 21-136 mit der gleichen Toleranz wie `Post`.

Eine essentielle Funktion in allen eukaryotischen Zellen ist die Kontrolle der Bewegung von Proteinen und Lipiden durch das Endomembransystem vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat und in die Vakuole oder durch die Plasmamembran. Jedes der beteiligten Kompartimente benötigt für die Erkennung und den Transport von Proteinen an und durch die Membran spezifische Rezeptoren die den Verkehr steuern (SANDERFOOT et al., 2000). Diese essentiellen integralen Membranproteine und Rezeptoren sind SNAREs (Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors) und teilen sich in zwei verschiedene Familien von Membran- und Strukturproteinen. Während in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) alle notwendigen SNAREs für ein funktionierendes Endomembransystem charakterisiert wurden, ist bei Pflanzen dieser Mechanismus vermutlich komplexer, aufgrund der multizellulären Struktur (SANDERFOOT UND RAIKHEL, 1999). Ein Einfluss dieses sehr spezifischen Bindeproteins auf die Toleranzausprägung der Pflanze kann nur unzureichend diskutiert werden, wobei ein intakt funktionierendes Endomembransystem (möglicherweise über einen alternativen SNARE, im Gegensatz zu anderen Gerstengenotypen) für ein Wachstum der Pflanze, insbesondere bei Virusbefall, von sehr großer Bedeutung ist.

5.4.2 Dihydrodipicolinatreduktase-like protein (CRR1)

Es konnten Fragmente von 'Post' und den DH-Linien 21-09 und 21-136 identifiziert werden, die in anfälligen Genotypen und in Genotypen mit einer anderen genetischen Toleranzherkunft im cDNA-AFLP nicht in Erscheinung traten. Die Fragmente enthielten eine Sequenz homolog zu CRR1.

Die Lichtreaktionen der Photosynthese beinhalten den Elektronentransport durch die Thylakoidmembranen, welche die Lichtenergie in chemische Energie in Form von ATP und NADPH umwandeln. An diesem Prozess sind zum einen der lineare Elektronentransport und zum anderen der zyklische Elektronentransport des Photosystems I (PSI) beteiligt. In höheren Pflanzen besteht der zyklische Elektronentransport des PSI aus zwei teilweise redundanten Wegen (MUNEKAGE et al., 2004). Der Hauptweg benötigt das kleine Thylakoidprotein PGR5 und der Nebenweg wird katalysiert vom NAD(P)H dehydrogenase (NDH) Komplex des Chloroplasten. Für die Akkumulation und Stabilität des NDH-Komplexes ist ein Dihydrodipicolinatreduktase-like protein (CRR1) von Bedeutung (SHIMIZU UND SHIKANAI, 2007).

Die Funktion der Dihydrodipicolinatreduktase (DHPR) ist in höheren Pflanzen die Lysinbiosynthese über den Weg der Diaminopimelinsäure.

Höhere Pflanzen besitzen somit zwei Arten von DHPR-ähnlichen Genen: Eines ist essentiell für die Biosynthese von Lysin, während das andere spezifisch in die Akkumulation des NDH-Komplexes der Chloroplasten involviert ist. Es wird vermutet, dass CRR1 aus einer DHPR eines Cyanobakteriums hervorgegangen ist. Das Chloroplastengenom höherer Pflanzen enthält 11 verschiedene Gene, welche für die unterschiedlichen Untereinheiten des NDH-Komplexes kodieren (MUNEKAGE et al., 2004). Untersuchungen mit verschiedenen *crr*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass nicht jede Mutation in einer Untereinheit phänotypische Auswirkungen hat, jedoch reduzierte Level des NDH-Komplexes und damit ein verminderter cyclischer Elektronentransport zu verzeichnen sind (MUNEKAGE et al., 2004). Der cyclische Elektronentransportweg, mit der Bereitstellung von ATP, zusätzlich zur offenkettigen (nicht-cyclischen) Elektronentransportkette, unterstützt das richtige Verhältnis von ATP zu NADPH bei der Photosynthese, vor allem in Situationen wie Dunkelheit, Anaerobie oder auch Stress, wo Reduktionsäquivalente (NADPH) im Überschuss vorhanden sein können (BACKHAUSEN et al., 2000).

Durch die in *A. thaliana* nachgewiesenen verschiedenen Gene für die Untereinheiten könnte es denkbar sein, dass die Gerste 'Post' ein Allel für eine hohe Expression von CRR1 besitzt, was der Pflanze einen Vorteil bei einem Befall mit *Barley yellow dwarf virus* und der in anfälligen Pflanzen damit einhergehenden Blockierung der Photosynthese (Chlorose) bringt.

Bei einer möglichen Veränderung des Thylakoidmembranpotentials (ΔpH) durch Stress bei einer Virusinfektion, würde durch eine hohe Expression grundsätzlich ausreichend ATP produziert werden um dem entgegenzuwirken, wobei ATP ebenfalls für die Hexose-Stärke Umwandlung und für die N_2 -Fixierung zur Verfügung gestellt wird.

Ein weiterer Ansatz ergibt sich aus der Beteiligung der DHPR an der Lysinbiosynthese. In BYDV infizierten Pflanzen sind zwei nachgeschaltete Synthesewege vom Threonin herunterreguliert. Aufgrund der engen Kopplung der Biosynthesewege der Aminosäuren Lysin, Threonin und Methionin kann nach AZEVEDO et al. (1997) ein Überfluss an einer oder mehrerer Aminosäuren die Synthese der anderen Aminosäure verhindern. In Gerstenpflanzen führte eine Inhibierung von Enzymen des Syntheseweges durch ein Überangebot von Lysin und Threonin zu einer Blockierung der Synthese von Methionin durch Feedback-Inhibierung vorgeschalteter Enzyme (BRIGHT et al., 1978). Möglicherweise greift ein ähnlicher Feedbackmechanismus in BYDV infizierter Gerste, indem durch eine Threoninanreicherung auch die Biosynthese von Lysin beeinträchtigt wird. Die tolerante Sorte 'Post' könnte unter anderem über die verstärkte Expression von DHPR (CRR1) einem Lysinmangel vorbeugen.

5.4.3 Aspartatkinase / Homoserindehydrogenase

Homologie zu einer Aspartatkinase / Homoserindehydrogenase konnte im BLASTX für das Fragment P3-1 nachgewiesen werden, welches in 'Post' und den Linien DH21-09 und DH21-136 konstitutiv exprimiert wurde.

Die Enzyme Aspartatkinase und Homoserindehydrogenase sind an der Umwandlung von Aspartat in Homoserin beteiligt. In Pflanzen katalysieren Homoserinkinase und Threoninsynthese dann die Bildung von Threonin (UMBARGER, 1978). Threonin ist ein Substrat für die Katalyse von Isoleucin und aus Homoserin wird neben Threonin auch Methionin gebildet. Ein zweiter Syntheseweg, an dem Aspartatkinase / Homoserindehydrogenase beteiligt ist, ist die Biosynthese von Lysin (MUEHLBAUER et al., 1994). Die Homoserindehydrogenase wurde in Maispflanzen im Chloroplasten lokalisiert, wobei es auch als freies Enzym im Cytoplasma vorliegen kann (BRYAN et al., 1977). Aufgrund der engen Kopplung der Biosynthese der Aminosäuren Lysin, Threonin und Methionin kann ein Überfluss einer oder mehrerer Aminosäuren (Lysin und Threonin) über ein Feedback die Synthese der anderen Aminosäure (Methionin) verhindern. BRIGHT et al. (1978) konnten zeigen, dass ein Überangebot an Lysin und Threonin das Wachstum von Gerste inhibiert.

Durch Anzucht von Pflanzen auf Basalmedium mit Zugabe von Lysin oder Threonin konnten Gerstemutanten erhalten werden, welche Enzyme mit alternativen regulatorischen Feedback Mechanismen enthielten und keine Wachstumsdepressionen zeigten (ROGNES et al., 1983).

Im cDNA-AFLP gefundene Enzyme der Biosynthesewege von Lysin und Threonin waren in der Sorte 'Post' konstitutiv exprimiert. Es gab somit keine Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen der Sorte 'Post', jedoch deutliche Unterschiede zu allen anderen Genotypen im Test. Die Möglichkeit eines alternativen Feedback Mechanismus in 'Post' könnte somit eine Erklärung für die Toleranz der Sorte sein.

5.4.4 Glutamat-Rezeptor

Das Fragment M1-3f enthielt eine Sequenz mit Homologie zu einem Glutamat-Rezeptor. Glutamatrezeptoren (GLRs) der Pflanzen spielen eine Rolle bei der Pflanzenentwicklung, dem Signaltransfer über Calciumkanäle und der Umverteilung von Kohlenstoff (DUBOS et al., 2005).

Ein Glutamat-Rezeptor ähnliches Gen, welches in Wurzeln die normale Zellteilung reguliert, wurde von LI et al. (2006) beschrieben. Sie vermuteten, dass die extrazellulären und cytoplasmatischen Segmente der GLRs für Ligandenerkennung, cytoplasmatische Modifikationen und Interaktionen zwischen Rezeptor und cytoplasmatischen Proteinen verantwortlich sind. Im Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod scheinen GLRs eine Rolle bei der Wurzelentwicklung zu spielen. Der programmierte Zelltod ist dabei ein notwendiger Teil der normalen Entwicklung und Funktion von Pflanzenwurzeln (LI et al., 2006). In BYDV infizierten Pflanzen wurden Auswirkungen einer Infektion als deutlich verringertes Längenwachstum, welches neben einer Internodienverkürzung der oberirdischen Pflanzenteile auch das Wurzelwachstum betreffen kann, beschrieben (MILLER UND RASOCHOVÁ, 1997). Hohe Akkumulation von Kohlenhydraten führt in BYDV-infizierter Gerste zu einem Rückgang an deren Produktion und bewirkt eine vermehrte Bildung von stickstoffhaltigen Komponenten (JENSEN UND D'ARCY, 1995), wobei in der Wurzel der Anteil löslicher Kohlenhydrate zurückgeht. Auch wenn diese Veränderung eher auf einen gestörten Phloem-Transport zurückgehen, könnten Glutamatrezeptoren an einer Toleranzreaktion der Pflanze sekundär beteiligt sein, indem sie das erwähnte Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod aufrechterhalten.

5.4.5 Glutathionperoxidase

Ein weiteres Fragment, welches konstitutiv in der Sorte 'Post' exprimiert wurde, zeigte im BLASTX Homologie mit einer Glutathionperoxidase (GPX). Die GPX reduziert, neben weiteren Enzymen, H_2O_2 zu H_2O und trägt zum Schutz der Zelle vor Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies bei (CHURIN et al., 1999), wobei VANACKER et al. (1998) Ascorbatperoxidase und Katalase als Hauptreduktoren für H_2O_2 ansehen. Die GPX zeigen insbesondere bei einer Antwort der Zelle auf Stress eine erhöhte Expression. Mehrere Autoren konnten die Erhöhung der mRNA von GPX als Antwort auf Stress zeigen, darunter Salzstress (GUETA-DAHAN et al., 1997), mechanische Stimulierung der Pflanzen (DEPÈGE et al., 1998), Behandlung mit Schwermetallen (SUGIMOTO UND SAKAMOTO, 1997) und Infektionen mit Pathogenen wie Viren oder Bakterien (LEVINE et al., 1994). Durch Untersuchungen an einer weißen Gerstenmutante (*albostrians*) konnten CHURIN et al., (1999) zeigen, dass die in Gerste gefundenen HVGPHs (GPX-Homologe) in der Mutante sehr stark exprimiert wurden. In Gerste existiert eine Genfamilie, die GPX-Homologe codiert, welche unterschiedliche Funktionen besitzen und an verschiedenen Orten in der Zelle vorkommen, wie z.B. die HVGPH2, welche im Chloroplasten lokalisiert ist.

Bei einer Behandlung mit Natriumchlorid oder Sorbitol zeigte sich eine deutliche Expression von plastidärer HVPGH2 und cytosolischer HVPGH1, während die, im Peroxisom lokalisierte HVPGH3 nicht in die Stressabwehr involviert zu sein scheint. Antioxidantien wie GPX beseitigen Peroxide und verhindern somit einen Zelltod (HOCKENBERY et al., 1993).

Morphologische Symptome eines durch H_2O_2 ausgelösten Zelltodes, sind Schrumpfung der Zellen, Membranablösung und Kondensation von Chromatin, welche zur Fragmentierung der Zelle führen. Insbesondere bei einer hypersensitiven Reaktion der Pflanze wurde die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen beschrieben, welche Enzyme der Lignin-Synthese oder lytische Enzyme, wie z.B. Chitinase, codieren (LAMB et al., 1989). Durch die Ablagerung von Callose und Lignin an der Zellwand wird diese verstärkt. Als Bestandteil der Klasse der PR-(pathogenesis-related) Proteine akkumulieren Chitinasen als Antwort auf einen viralen oder mikrobiellen Befall und können mikrobielle Zellen direkt angreifen. Abwehrgene, welche Chitinasen und Enzyme der Propanoïdbiosynthese codieren, sind beteiligt an der Produktion von Phytoalexinen und Lignin (LAMB et al., 1989; WALTER et al., 1988). Der programmierte Zelltod (Apoptose) kann durch Glutathionperoxidasen verhindert werden, welche die Peroxide von Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Reticulum und cytosolischen Ursprungs entgiften (HOCKENBERY et al., 1993).

Das Cytoplasma BYDV infizierter Zellen zeigt bei mikroskopischer Betrachtung ein Netzwerk feiner Fäden und das Heterochromatin verklumpt (JENSEN, 1969; GILL UND CHONG, 1975), was auf einen hohen Anteil reaktiver Sauerstoffspezies schließen lässt.

Nekrotische Verschlüsse der Siebzellen und der angrenzenden Parenchymzellen durch Anreicherung von undefinierten Komponenten: „wound gum“ nach einer BYDV-Infektion (ESAU, 1957a, 1957b) sprechen für Kallose- und Ligninablagerungen, wie sie von (LAMB et al. 1989) bei einer Aktivierung von Abwehrgenen beschrieben worden sind. Eine erhöhte Peroxidaseaktivität in BYDV infizierten Pflanzen wurde ebenfalls von ORLOB UND ARNY (1961) beschrieben. Die im cDNA-AFLP identifizierte Glutathionperoxidase ist sicherlich nicht 'Post' spezifisch, jedoch würde eine erhöhte Expression der Peroxidase im toleranten Genotyp die Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies verhindern und einem Verfall der Zellen, insbesondere der Phloemzellen, vorbeugen. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund zu sehen, dass VANACKER et al. (1998) die Katalase als einen Hauptreduktor für H_2O_2 ansehen und ORLOB UND ARNY (1961) beschrieben, dass die Katalaseaktivität in BYDV infizierten Pflanzen reduziert ist.

5.5 In der Linie DH21-136 exprimierte Sequenzen

5.5.1 Saccharosephosphatsynthase

Ein Fragment, welches ausschließlich in der Linie DH21-136 nach BYDV-Infektion exprimiert wurde, konnte nach Homologievergleich einer Saccharosephosphatsynthase (SPS) zugeordnet werden.

Die SPS ist ein Schlüsselenzym bei der Regulation des Saccharosemetabolismus. Es ist verantwortlich für die Synthese von Sucrose-6-phosphat aus Fructose-6-phosphat und Uridin-5'-diphosphat-glucose (INGRAM et al., 1997). Saccharose hat eine herausragende Rolle bei der Pflanzenentwicklung, aufgrund der Funktion bei der Verteilung und Speicherung (HUBER UND HUBER, 1996), der Rolle als Schutz vor osmotischem Stress bei Dehydration (INGRAM et al., 1997) und möglicherweise einer regulatorischen Funktion im zellulären Metabolismus auf dem Level der Genexpression (JANG UND SHEEN, 1994).

Wachstum und Entwicklung von Pflanzen basieren auf Energie aus der Photosynthese in Form von Kohlenhydraten. Die Hauptorte der Photosynthese sind die Blätter und zu einem kleinen Teil der Stängel, während Wurzeln, Samen oder Leitgefäße nicht zur Kohlenstoffassimilation beitragen, jedoch von den photosynthetisch aktiven Teilen der Pflanze abhängig sind. Es existiert somit ein Nettoflux der Energie von photosynthetisch aktiven Organen als Nettoexporteure von fixiertem Kohlenstoff (Source), hin zu photosynthetisch inaktiven Organen (Sink) als Nettoimporteure von fixiertem Kohlenstoff.

Ein wichtiger Parameter für die Source-Kapazität eines Blattes ist die photosynthetische Aktivität. Es konnte von GOLDSCHMIDT UND HUBER (1992) gezeigt werden, dass die Photosynthese über eine Rückkopplung (Feedback) reguliert wird, wenn sich Kohlenhydrate in den Source-Blättern anreichern.

Dass Kohlenhydrate in den Blättern akkumulieren und die Photosynthese über ein Feedback inhibiert wird, wenn die Photosyntheserate den Verbrauch an Saccharose im Sink übersteigt wurde auch von VON SCHAEWEN et al. (1990) beschrieben. In transgenen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* wurde im Apoplast eine Invertase aus Hefe überexprimiert, so dass Saccharose zu Glucose und Fructose hydrolysiert wurde. Diese freien Hexosen können schlechter als Saccharose in das Phloem aufgenommen werden und werden daher in den Mesophyllzellen zu Saccharose rekonvertiert. Der Export der Saccharose wurde somit zu einem großen Teil unterbunden. Die transgenen Tabakpflanzen zeigten starke phänotypische Veränderungen, wie eine reduzierte Höhe durch Internodienverkürzung, starke Chlorosen der Blätter, ein reduziertes Wurzelwachstum, eine spätere Blüte und einen verminderten Samenansatz (VON SCHAEWEN et al., 1990; SONNEWALD et al., 1991).

In *A. thaliana* waren die Veränderungen bezüglich des Pflanzenwachstums nicht stark ausgeprägt, dafür zeigten die Pflanzen von der Blattspitze aus beginnende Farbveränderungen in Form von roten Pigmenten (Anthocyanbildung).

Die im cDNA-AFLP in der toleranten Linie DH21-136 nach einer BYDV-Infektion gefundene SPS ist das entgegenwirkende Enzym der Invertase und synthetisiert Fructose und Glucose zu Saccharose. Über die Aktivität der Invertase nach einer BYDV-Infektion kann keine Aussage getroffen werden, jedoch würde eine vermehrte Aktivität der SPS einer Akkumulation von Hexose und Fructose im Apoplasten der Zelle entgegenwirken und möglicherweise über ein Feedback die Photosynthese aufrechterhalten, vorausgesetzt der Export von Saccharose in das Phloem ist nicht oder nur wenig blockiert.

Der erhöhte Gehalt an löslichen Zuckern und hohe Gehalte an Stärke in den Blattadern korrespondieren mit den gefundenen Ergebnissen nach einer BYDV Infektion in Gerste, wie sie von JENSEN (1968) beschrieben wurden. Die reduzierte Translokation führt zu einer Akkumulation von Kohlenhydraten und einer Zunahme des Trockengewichtes, wodurch die Photosynthese inhibiert, der Chlorophyllgehalt vermindert und die Respirationsrate erhöht wird. ORLOB UND ARNY (1961) berichteten von erhöhten Stärke und Kohlenhydratgehalten, insbesondere reduzierender Zucker, in BYDV infizierten Gerstenblättern. In Hafer konnten von GOODMAN et al. (1965) nach einer BYDV Infektion erhöhte Gehalte an Fructose, Glucose, Saccharose und Fructosanen nachgewiesen werden. In Weizen wurden ebenfalls erhöhte Glucose- und Saccharosegehalte gefunden (FERERES et al., 1990).

MOLINE UND JENSEN (1975) konnten Partikel in Chloroplasten infizierter Pflanzen als Kohlenhydrate identifizieren, vermutlich Glycogen. In späteren Stadien der Infektion nimmt der Gehalt an stickstoffhaltigen Komponenten zu, hauptsächlich in Form von Glutamin und Asparagin, während der Gehalt an kohlenhydrathaltigen Komponenten etwas zurückgeht (JENSEN UND D'ARCY, 1995). Von der Blattspitze ausgehende Anthocyanbildung ist ebenfalls nach einer BYDV Infektion, insbesondere bei Weizen und Hafer beschrieben worden (JENSEN UND D'ARCY, 1995).

Als Ursache der Chlorosen nach einer BYDV Infektion wurde in anfälligen Pflanzen ein verminderter Chlorophyllgehalt und eine verminderte Photosyntheseaktivität von ORLOB UND ARNY (1961) beschrieben, während eine tolerante Pflanze davon nicht betroffen gewesen ist. Dass die Effekte der reduzierten Photosynthese und verminderten Chlorophyllgehalte vermutlich von einer massiven Akkumulation von Kohlenhydraten in den Blättern kommen, konnte auch von LAMBOY et al. (1991, zit. aus JENSEN UND D'ARCY, 1995) gezeigt werden. Die chlorotischen Effekte und ein vermindertes Größenwachstum wurden sowohl an gesunden, als auch an BYDV infizierten Haferpflanzen beobachtet, nachdem diese mit einer 10%igen Saccharoselösung behandelt worden waren.

5.5.2 Cysteinsynthese (O-acetylserin (thiol)-lyase)

Das in der Linie DH21-136 nach einer BYDV-Infektion spezifisch heraufregulierte Fragment F6-1f, welches mit dem CAPS-Marker auf Chromosom 5H in der DH-21 Kartierungspopulation der Kreuzung 'Post' x 'Vixen' kartiert werden konnte, zeigte in BLAST-Analysen eine hohe Homologie zu einer O-acetylserin(thiol)lyase. Dieses Enzym ist ein Schlüsselenzym des Biosyntheseweges von Cystein. In höheren Pflanzen wird anorganisches Sulfat als Hauptquelle von Schwefel für schwefelhaltige Aminosäuren, Lipide und Coenzyme verwendet. Die meisten anorganischen Sulfate werden zu Cystein reduziert, der Vorstufe von Methionin und Glutathion bzw. von Proteinen oder für Sulfolipide in Chloroplastmembranen benötigt. Die O-acetylserin(thiol)lyase katalysiert dabei die Reaktion von Sulfit mit O-acetylserin zu Cystein (YOUSSEFIAN et al., 1993).

Glutathion dient in reduzierter Form als Transportmolekül für Schwefel im Siebröhrensaft sowie als universeller Radikalfänger (SCHOPFER UND BRENNICKE, 2006), indem es als Substrat für die Glutathionperoxidase bei der Reduktion von H₂O₂ dient (siehe 5.4.5).

5.5.3 *Light-harvesting* Komplex (Lichtsammelfalle)

Die *Light-harvesting*-Komplexe LHCI und LHCII der Photosysteme I und II enthalten die Hauptmasse der Chlorophyll-*a*- und Chlorophyll-*b*-Antennen, β -Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin. Die Menge an LHCs pro Reaktionszentrum hängt von den Lichtverhältnissen ab, unter denen die Pflanze wächst. Ein Teil des LHCII kann, für eine ausgeglichene Auslastung, Licht sowohl an das PSI und PSII abgeben und ist somit, aufgrund der räumlichen Trennung der beiden Photosysteme im Thylakoiden, in der Membran beweglich (SCHOPFER UND BRENNICKE, 2006). Der Einfluß der Lichtsammelfalle auf eine erhöhte Toleranzreaktion der Pflanze ist schwierig zu bewerten.

5.6 In 'Vixen' konstitutiv exprimierte Sequenz (Xyloseisomerase)

Im cDNA-AFLP wurde ein Fragment isoliert, welches die Sequenz einer Xyloseisomerase enthielt. Diese scheint konstitutiv in der Sorte 'Vixen' und der Linie DH21-50 höher exprimiert zu werden, als in den anderen Genotypen im Test. Die Xyloseisomerase katalysiert die reversible Umwandlung von Glucose in Fructose (WHITAKER et al., 1995). URBANCZYK-WOCHNIAK et al. (2003) konnten durch Expression einer bakteriellen Xyloseisomerase in Kartoffeln zeigen, dass ein erhöhter Fructosegehalt zu einer vermehrten Saccharosesynthese und einer erhöhten Synthese von Stärke führt. Eine Erhöhung der SPS stellt verstärkt Saccharose für den Export zur Verfügung, um möglicherweise das Gleichgewicht an nicht exportierbaren und exportierbaren Kohlenhydraten in der Zelle aufrecht zu erhalten (vergl. 5.5.1), welches nach einer BYDV Infektion gestört zu sein scheint, da ORLOB UND ARNY (1961) von erhöhten Kohlenhydratgehalten, insbesondere reduzierenden Zuckern, in infizierten Gerstenblättern berichteten.

5.7 Kartierung der Fragmente

Mit Hilfe von Weizen-Gerste Additionslinien (ISLAM et al., 1981) konnten 13 Fragmente chromosomal zugeordnet werden, wobei vier Primerkombinationen auf mehreren Chromosomen amplifizierten (Tab. 4.3). Für einige der untersuchten und sequenzierten Fragmente konnten Marker abgeleitet werden, um die entsprechenden, regulierten Gene im Kontext mit den bereits beschriebenen QTL-Regionen und/oder beschriebenen Toleranzloci zu betrachten.

Die Fragmente L8-3f (Fucosyltransferase) und O2-3f (Dihydrolipoamiddehydrogenase) konnten eindeutig Chromosom 1H zugeordnet werden. Beides sind Enzyme, deren Expression nach einer BYDV Infektion herunterreguliert ist. Der entwickelte SNP Marker aus der Sequenz N5-1f (unknown Protein), ebenfalls herunterreguliert in infizierten Pflanzen, konnte eindeutig auf Chromosom 1H kartiert werden (Abb. 4.13). Die Beeinträchtigung der Enzyme der Zellwandsynthese und der Synthese der Aminosäure Serin nach einer BYDV Infektion, die entscheidend zu einer Wuchsdepression der Pflanze beitragen können, könnten mit dem von TOOJINDA et al. (2000) beschriebenen QTL bezüglich Verzweigung/Bestockung auf diesem Chromosom in Zusammenhang stehen.

Die in der Sorte 'Post' konstitutiv exprimierten Sequenzen M1-3f (Glutamatrezeptor), K15D08 (Dihydrodipicolinatreduktase) und C2-2f (unbekannt) konnten mit Hilfe der Additionslinien Chromosom 2H zugeordnet werden, wobei die Primer K15D08 auch auf den Chromosomen 4H und 7H amplifizierten und die Primerkombination C2-2f zusätzliche Fragmente auf den Chromosomen 3H, 5H und 6H zeigte. Ein direkter Zusammenhang mit den von SCHEURER et al. (2001) beschriebenen QTL für das Tausendkorngewicht und den Kornertrag/Pflanze auf dem langen Arm von Chromosom 2H kann nicht hergeleitet werden, jedoch sind die erhaltenen Fragmente ausschließlich aus der Herkunft 'Post'. Der Glutamatrezeptor ist an der Umverteilung von Kohlenhydraten beteiligt und die Dihydrolipoamiddehydrogenase ist ein Enzym des Biosyntheseweges der Aminosäure Lysin. Beides sind Enzyme, die somit einen wichtigen Beitrag auch für einen guten Kornansatz der Pflanze liefern.

Die Fragmente P1-5f (unbekannt [konstitutiv in 'Post']), O3-1f (unbekannt [konstitutiv in 'Vixen']), C2-2f (s.o.) konnten Chromosom 3H der Additionslinien zugeordnet werden. Der SNP Marker K24D18 (unbekannt [in infizierten heraufreguliert]) kartiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 3H in unmittelbarer Nähe zum Mikrosatelliten HVLTPPB. Eine mögliche räumliche Zuordnung, insbesondere der aus 'Vixen' isolierten Sequenz, zu kartierten QTL Regionen (SCHEURER et al., 2001; TOOJINDA et al. 2000) ist nicht möglich. Aufgrund der nicht signifikanten Übereinstimmung im BLAST kann keine weitere Aussage über mögliche Funktionen der gefundenen Fragmente getroffen werden.

Auf Chromosom 4H amplifizierten die Primerkombinationen K15D08 (s.o.), S3-3r (unbekannt [konstitutiv in 'Vixen']) und L7-2f (Transketolase [herunterreguliert nach BYDV Infektion]) im Test der Additionslinien. Die Marker S1-7f (SNP [unbekannte Sequenz]) und UdpD (UXS1 [in infizierten herunterreguliert]) konnten eindeutig auf Chromosom 4H kartiert werden. Die bekannten QTL zur Kornzahl/Ähre und Ähren/Pflanze (SCHEURER et al., 2001) liegen jedoch über 20 cM entfernt auf dem langen Arm des Chromosoms.

Auf Chromosom 5H konnte der CAPS Marker F6-1f (Cysteinsynthase [konstitutiv in DH21-136]) kartiert werden. Die Cysteinsynthase ist ein Schlüsselenzym des Biosyntheseweges der Aminosäure Cystein. Im Test der Additionslinien kartierte C2-2f (s.o.) ebenfalls auf Chromosom 5H. Eine Verbindung zu dem QTL Ähren/Pflanze (SCHEURER et al., 2001) auf diesem Chromosom kann nicht hergestellt werden, aufgrund der Entfernung des Markers F6-1f vom QTL von ca. 10 cM.

Die Fragmente C2-2f (s.o.) und O3-1f (s.o.) kartierten auf den Additionslinien unter anderem auch auf Chromosom 6H. Eindeutig dem Chromosom 6H zugeordnet werden konnte der SNP Marker K5-4f. Die in 'Post' konstitutiv exprimierte Sequenz konnte im BLAST nicht näher bestimmt werden. QTL in Bezug auf eine Reaktion der Pflanze auf eine BYDV Infektion sind auf Chromosom 6H für die analysierte Population nicht bekannt. Nach NIKS et al. (2004) kartiert in einer anderen Population der Toleranzlocus *Ryd3* aus der Linie 'L94' auf Chromosom 6H, jedoch liegt dieser, im Gegensatz zu dem SNP K5-4f, im Centromerbereich des Chromosoms und konnte in 'Post' und 'Vixen' nicht nachgewiesen werden.

Auf Chromosom 7H konnte mit Hilfe der Additionslinien das Fragment K15D08 (s.o.) lokalisiert werden. Eine Korrelation zu bekannten QTL für Kornzahl/Ähre, Datum Ährenschieben (SCHEURER et al., 2001) und Verzweigung und Bestockung (TOOJINDA et al. (2000) konnte nicht hergestellt werden. Der SNP Marker K12D08 konnte eindeutig auf Chromosom 7H kartiert werden, liegt jedoch proximal der QTL.

5.8 Abschließende Überlegungen

Es konnten mit Hilfe des cDNA-AFLP verschiedene Sequenzen identifiziert werden, welche für Enzyme der Biosynthese der Aminosäuren, ausgehend vom Aspartat und Pyruvat, kodieren. Es soll in einer zusammenfassenden Darstellung ein möglicher Zusammenhang der Pflanzenreaktionen nach einer BYDV Infektion verdeutlicht werden, da insbesondere in der toleranten Sorte 'Post' mehrere Sequenzen charakterisiert werden konnten, welche eine Rolle bei der Toleranz gegenüber einer BYDV Infektion spielen könnten.

In BYDV infizierten Pflanzen wurde ein herunterreguliertes Enzym des Biosyntheseweges der Aminosäure Serin gefunden, die Dihydroliipoamiddehydrogenase, welche Bestandteil des Glycin Decarboxylase-Komplexes ist und ausgehend von Glycin über Desaminierung und Decarboxylierung die Aminosäure Serin herstellt (DOUCE et al., 2001). Ein weiteres Enzym, welches in BYDV infizierten Pflanzen herunterreguliert war, ist die L-allo-Threoninaldolase. Die Threoninaldolase ist einer von vier möglichen Synthesewegen von Glycin (SCHLÜPEN, 2003). In Abb. 5.1 sind die Synthesewege stark vereinfacht dargestellt. Glycin wird in der Pflanze vom Peroxisom ins Mitochondrium exportiert und dort Serin hergestellt.

Das Serin wird zum einen für die Proteinsynthese verwendet und andererseits zum größten Teil in den Peroxisomen über mehrere Zwischenstufen wieder in den Kohlenhydratstoffwechsel der Chloroplasten eingeschleust (SCHOPFER UND BRENNICKE, 2006). Durch die Anreicherungen von Kohlenhydraten nach einer BYDV Infektion (vergl. ORLOB UND ARNY, 1961; GOODMAN et al., 1965; FERERES et al., 1990; MOLINE UND JENSEN, 1975) wären die Voraussetzungen für ein regulierendes Feedback auf die Synthese von Serin gegeben (in diesem Fall die Dihydrolipoamiddehydrogenase), was dazu führt, dass die Blattatmung in der Pflanze herunterreguliert wird. Durch eine verminderte Serinsynthese reichert sich Glycin in den Peroxisomen und/oder Mitochondrien an, dass Regulationsmechanismen greifen, die dazu führen, dass Biosynthesewege des Glycin (der Weg über die Threoninaldolase) ebenfalls herunterreguliert werden.

In der Sorte 'Post' wurden im cDNA-AFLP Sequenzen mit Homologie zu mehreren Enzymen der Biosynthesewege von Lysin, Threonin und Methionin identifiziert. Dies sind die Enzyme Aspartatkinase, Homoserindehydrogenase und Dihydrodipicolinatreduktase, welche konstitutiv höher in der Sorte 'Post' und DH21-Linien mit der gleichen Toleranz exprimiert wurden. In Abb. 5.1 soll verdeutlicht werden, dass eine Blockierung oder Verminderung der Enzyme der Glycin- und Serinsynthese möglicherweise zu einer Anreicherung der Aminosäure Threonin führen kann. Dies würde, analog zu BRIGHT et al. (1978) (siehe 5.4.2), über ein Feedback zu einer verminderten Synthese nicht nur von Threonin führen, sondern auch die Aminosäuren Lysin und Methionin betreffen. Durch eine erhöhte Expression der mRNA der Enzyme der Synthesewege in der toleranten Sorte 'Post', insbesondere Aspartatkinase, könnten die Enzyme in größerer Menge für die erforderlichen Biosynthesen zur Verfügung stehen, so dass kein Mangel an einer Aminosäure eintreten kann.

Zusätzlich kann Abb. 5.1 entnommen werden, dass eng mit der Biosynthese von Cystein die Cysteinsynthese verknüpft ist, welche anorganische Sulfate für die Aminosäuresynthese zur Verfügung stellt (YOUSSEFIAN et al., 1993). Cystein ist ein Schlüsselenzym und Vorstufe von Protein, Methionin und Glutathion, sowie Sulfolipiden. In der Sorte 'Post' konnte eine erhöhte Expression der mRNA dieses Enzyms nicht detektiert werden, allerdings konnte mit der Glutathionperoxidase ein weiteres Enzym eines möglichen weiterführenden Stoffwechselweges ermittelt werden. Die Glutathionperoxidase ist entscheidend bei der Reduktion von Sauerstoffradikalen wie H_2O_2 (SCHOPFER UND BRENNICKE, 2006) und eine erhöhte Bereitstellung des Enzyms gleicht in der toleranten Sorte 'Post' möglicherweise die, von ORLOB UND ARNY (1961) beschriebene, reduzierte Katalaseaktivität nach einer BYDV Infektion aus, wobei mit dem vorliegenden Versuch keine Aussage über Unterschiede in der Katalaseaktivität getroffen werden kann.

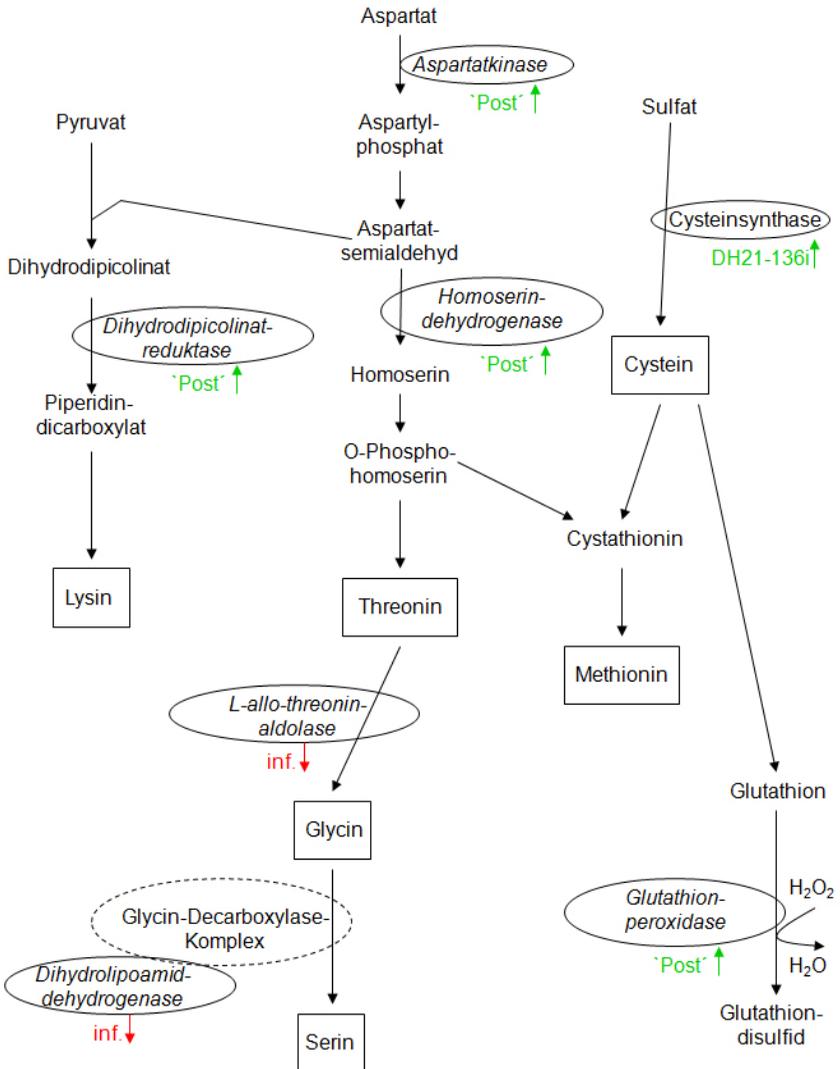


Abb. 5.1: Stark vereinfachte Darstellung der Synthesewege einiger Aminosäuren und der im cDNA-AFLP identifizierten Enzyme (grün = heraufreguliert in Pflanzen der jeweiligen Sorte bzw. Linie, rot = herunterreguliert in BYDV infizierten Pflanzen).

Im Zusammenhang mit dem Kohlenhydratmetabolismus der Pflanze konnten im cDNA-AFLP zwei unterschiedliche Fragmente von zwei verschiedenen, als tolerant beschriebenen Genotypen detektiert werden. Diese betreffen die Biosynthese und Verwertung von Saccharose (Abb.5.2). Nach BYDV-Infektion wurde in der DH21-Linie 136 eine mRNA exprimiert, die nach Homologievergleich (BLAST) einer Saccharosephosphatsynthase (SPS) zugeordnet werden konnte. In der Sorte 'Vixen' und den DH21-Linien 50 und 136, welche die gleichen Toleranzloci besitzen, wurde die Sequenz einer Xyloseisomerase identifiziert. Die SPS ist ein Schlüsselenzym bei der Regulation des Saccharosemetabolismus und ist verantwortlich für die Synthese von Saccharose aus Fructose-6-phosphat und UDP-glucose (HUBER UND HUBER, 1996; vergl. 5.5.1). Die Xyloseisomerase konvertiert Glucose in Fructose, hauptsächlich in Source-Organen (vergl. 5.6.2). Bei hohen Saccharosegehalten in der Zelle, durch einen verminderten Export in das Phloem, wird ein Teil wieder in Fructose und Glucose hydrolysiert, welche sich in den Mesophyllzellen anreichern. Ein Einfluß der Xyloseisomerase kann nur unzureichend geklärt werden, da nach URBANCZYK-WOCHNIAK et al. (2003) höhere Fructosegehalte zwar zu verschiedenen Feedback-Reaktionen führen (erhöhte Stärkesynthese, vermehrte Aminosäurebildung, verminderte Produktion von glycolytischen Metaboliten), diese jedoch nach BYDV Infektion teilweise ebenfalls auftreten (ORLOB UND ARNY, 1961; JENSEN UND D'ARCY, 1995). Einzig ein Feedback von erhöhtem Fructosegehalt auf eine vermehrte Expression der Saccharosephosphatsynthase könnte hier im Zusammenhang betrachtet werden, da eine Erhöhung der SPS verstärkt Saccharose für den Export zur Verfügung stellt, um das Gleichgewicht an nicht exportierbaren und exportierbaren Kohlenhydraten in der Zelle aufrecht zu erhalten.

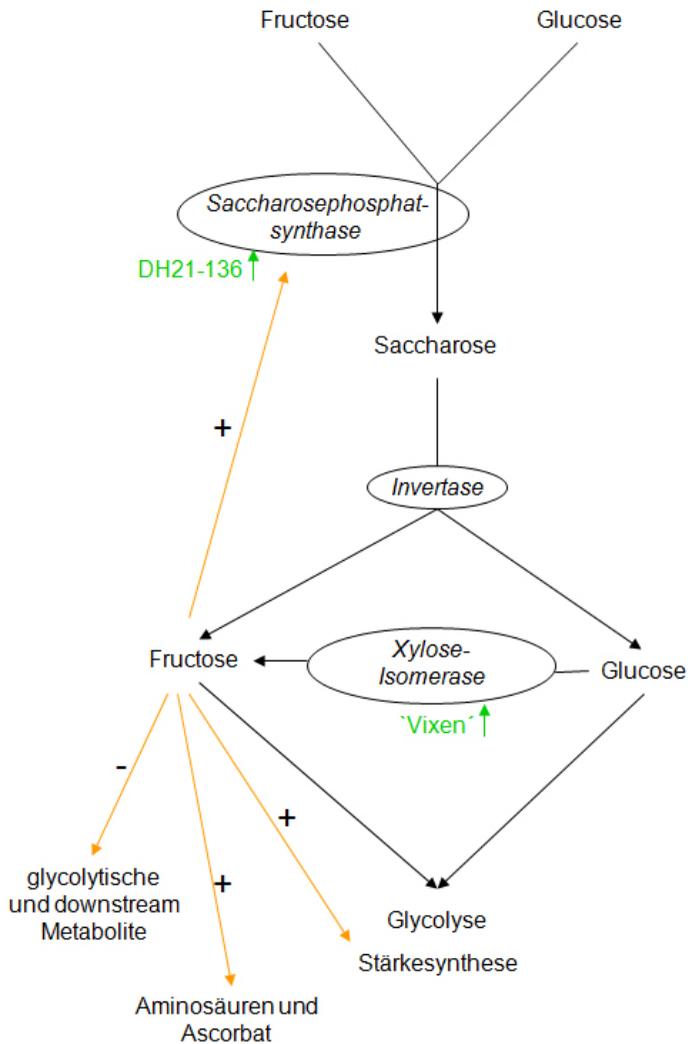


Abb. 5.2: Stark vereinfachte Darstellung des Saccharosekatabolismus und der im cDNA-AFLP identifizierten Enzyme (grün = heraufreguliert in Pflanzen der Sorte/Linie, rot = herunterreguliert in BYDV infizierten Pflanzen, orange = Einfluß [Feedback] von erhöhtem Fructosegehalt).

In BYDV infizierten Pflanzen ist des Weiteren die Transketolase herunterreguliert, ein wichtiges Enzym des Calvinzyklus. Eine verminderte Umwandlung von Fructose in Xylulose kann zu einer starken Anreicherung von Fructose im Cytosol führen, was vermutlich zu den gleichen Feedbackreaktionen führt. Gesunde Pflanzen können die Fructose ohne Einschränkung im Calvinzyklus umsetzen.

Eine deutlich reduzierte Expression konnte in BYDV-infizierten Pflanzen auch für zwei Enzyme des Metabolismus von Zellwandkompartimenten verzeichnet werden: UXS, welches im Cytosol die Umsetzung von UDP-D-Glucuronate zu UDP-D-Xylose katalysiert und Glykosylreste für die Biosynthese von Heteroxytan und Xyloglucan bereitstellt, sowie Fucosyltransferase, welches im Golgiapparat lokalisiert ist, den Transfer von L-Fucose auf Oligosaccharide katalysiert und die Stabilität des Xyloglucans gewährleistet (BONIN et al., 1997). Eine verminderte Zellwandsynthese entspräche auch Ergebnissen von ESAU (1959, zit. aus RUSSEL UND KIMMINS, 1971), wonach der Zwergwuchs von Pflanzen nach einer BYDV-Infektion nicht auf eine Verminderung der Elongation zurückzuführen ist, sondern auf eine verminderte meristematische Aktivität. RUSSEL UND KIMMINS (1971) zeigten, dass BYDV-infizierte Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringe Gesamtzellzahlen hatten, die Zellgröße jedoch nicht signifikant beeinträchtigt war. Durch eine Behandlung der Pflanzen mit Gibberellin wurden sowohl die zwergwüchsigen infizierten Pflanzen, als auch die gesunden Kontrollpflanzen größer, was nicht durch vermehrte Zellteilung zustande kam, sondern als Resultat von erhöhter Zellstreckung angesehen wurde. ORLOB UND ARNY (1961b) behandelten BYDV-infizierte Gerste- und Haferpflanzen mit Gibberellin und Indolelessigsäure (IAA). Die mit Gibberellin behandelten Pflanzen zeigten weniger Zwergwuchs, wie die IAA-behandelten, bei denen zusätzlich weniger Chlorosen zu verzeichnen waren. SPIELMEYER et al. (2004) kartierten drei Gene für Enzyme der Gibberellinbiosynthese auf dem Gerstenchromosom 3H, wo nach SCHEURER et al. (2001) ein QTL für die relative Pflanzenhöhe nach BYDV-Infektion lokalisiert ist.

Die Desorganisation des Phloemgewebes nach einer BYDV-Infektion konnte in der vorliegenden Arbeit nicht mit den im cDNA-AFLP gefundenen, differenziellen Enzymaktivitäten in Zusammenhang gebracht werden. Erkenntnisse über herunterregulierte Enzyme der Zellwandsynthese nach einer BYDV-Infektion lassen die Vermutung zu, dass unvernetzte Zellwandbestandteile sich im Phloem anreichern und es somit zu einem Verschuß der Siebzellen kommen kann.

Über die Kenntnisse des Zusammenhanges der einzelnen betrachteten Gene und der Toleranzausprägung bestimmter Genotypen, wie z.B. 'Post', besteht die Möglichkeit einige der in dieser Arbeit beschriebenen Genfragmente und der daraus abgeleiteten Marker für die zukünftige Züchtung zu nutzen.

Diskussion

Dass in der vorliegenden Arbeit keine Marker in den bekannten QTL-Regionen kartiert werden konnten schließt nicht aus, dass einzelne oder auch alle dieser Gene an einer Toleranzreaktion der Pflanze beteiligt sein könnten, da zum einen die bekannten QTL jeweils nur einen Teil der phänotypischen Varianz erklären und zum anderen gerade bei der Betrachtung von Parametern wie TKG und Kornertrag/Pflanze insbesondere Gene des Kohlenhydratmetabolismus und der Aminosäuresynthese beteiligt sind. Da die cDNA-AFLP Analyse nur eine ca. 60%ige Abdeckung des Transkriptoms beinhaltet, können evtl. Gene des gleichen Syntheseweges im Bereich eines QTL liegen, die aber in dieser Arbeit nicht detektiert wurden.

6 Zusammenfassung

Die blattlausübertragene Gelbverzwergung der Gerste, verursacht durch verschiedene Stämme des *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) und des *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV), ist eine weltweit bedeutende Virose der *Poaceae*, die erhebliche Ertragsverluste zur Folge haben kann. Für eine sowohl wirtschaftlich tragfähige als auch ökologisch verträgliche Getreideproduktion ist ein Anbau toleranter Genotypen erforderlich.

Eine effiziente Züchtung toleranter Gerstensorten setzt die Verfügbarkeit molekularer Selektionsmarker voraus, da eine phänotypische Selektion nach künstlicher Infektion mittels virustragender Blattläuse nur schwer in den Zuchtgang zu integrieren ist. Ziel dieser Arbeiten war es daher mittels cDNA-AFLP Gene zu identifizieren, die an der Ausprägung der Toleranzreaktion beteiligt sind und diese in einer phänotypisch charakterisierten Population von DH-Linien zu kartieren.

Die Charakterisierung der Genexpression in den Linien 'Post' und 'Vixen', sowie ausgewählten doppelhaploiden (DH) Linien der Kreuzung 'Post' x 'Vixen' mit der cDNA-AFLP Technik ergab insgesamt 45 differentiell regulierte Gene mit folgender Verteilung: 13% Kohlenhydratmetabolismus, 11% Aminosäurebiosynthese, 11% Seneszenz assoziiert, 7% Zellwandsynthese, 2% BYDV-Reaktion, 16% mRNAs anderer Klassen, 9% ohne signifikante Übereinstimmung und 31% mRNAs unbekannter Funktion.

Von sieben differenzierenden Fragmenten konnten Marker als STS, CAPS oder SNPs entwickelt werden, mit denen die gefundenen Unterschiede in der vorhandenen DH-Population DH21 'Post' x 'Vixen' kartiert werden konnten. Die abgeleiteten Marker der im cDNA-AFLP gefundenen Fragmente kartierten in der Untersuchungspopulation nicht im Bereich bisher bekannter QTL. Für einige Sequenzen ließ sich die chromosomale Zuordnung über Weizen-Gerste Additionslinien bestimmen, ohne eine genaue Aussage über die Position auf dem jeweiligen Chromosom treffen zu können.

Die im cDNA-AFLP identifizierten Genfragmente, insbesondere Enzyme der Aminosäurebiosynthesewege betreffend, sind vermutlich auf sekundäre Pflanzenreaktionen nach einer BYDV-Infektion zurückzuführen, da insbesondere eine hohe Akkumulation von Kohlenhydraten in den Blättern BYDV-infizierter Pflanzen auf eine gestörte Phloemfunktion zurückgeführt werden kann. Saccharose kann von den Source-Organen nicht in das Phloem entladen werden und reichert sich daher an. Als Folge wird die Saccharose ggf. wieder in Fructose und Glucose gespalten, was zum einen vielfältige *Feedback* Funktionen auf weitere Prozesse des Kohlenhydratmetabolismus auslöst und zum anderen, als Folge der Anreicherung von löslichen Zuckern in der Pflanze, zu starken Chlorosen führen kann.

Zusammenfassung

Die Desorganisation des Phloemgewebes nach einer BYDV Infektion konnte mit den im cDNA-AFLP gefundenen Enzymen nicht abschließend erklärt werden. Indes lassen Erkenntnisse über herunterregulierte Enzyme der Zellwandsynthese nach einer BYDV-Infektion die Vermutung zu, dass unvernetzte Zellwandbestandteile sich im Phloem anreichern und es somit zu einem Verschuß der Siebzellen mit der Folge von Chlorosen und Leistungsminderungen kommen kann.

7 Summary

Aphid transmitted Barley yellow dwarf, caused by different strains of *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) and *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) is an important virosis of *Poaceae* worldwide and causes substantial yield losses. For an economical and ecologically sound production of cereals growing of tolerant cultivars is a prerequisite. For efficient breeding of tolerant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars molecular markers are useful tools since artificial inoculation using virus bearing aphids can hardly be efficiently implemented in a barley breeding programme. Therefore, this study aimed at the identification of genes involved in BYDV tolerance by cDNA-AFLP followed by mapping of these genes in a phenotypically well characterized DH-line population derived from the cross 'Vixen' (*Ryd2*) and 'Post' (QTL on 2HL).

In order to achieve information on genes differentially expressed after BYDV infection in general and differentiating tolerant and non-tolerant genotypes, the parental cultivars and doubled haploid (DH) lines derived from their cross carrying all possible combinations of positive and negative alleles at respective loci (*Ryd2*, QTL on 2HL) as well as the non-tolerant cultivar 'Nixe' were raised in growth chambers (18°C, 70% relative humidity, 16 h light period, illumination level of 10⁴ lm·sm⁻¹). Artificial inoculation took place in the one-leaf stage with aphids (*Rhopalosiphum padi*) carrying the BYDV-PAV-ASL-isolate. At 2 dpi the aphids were removed with a systemic insecticide, and 15 dpi the success of artificial infection was checked by analysing the tip of the third leaf by DAS-ELISA. The rest of this leaf was used for total RNA extraction, based on a method using guanidinium thiocyanate. Selective isolation of mRNA was carried out with magnetic beads and the mRNA of infected and healthy control plants was reverse-transcribed to double-stranded cDNA. AFLP reactions were applied and subsequently analysed by 256 *EcoRI*+2/*MseI*+2 primer combinations. Differentiating fragments were cut out of electrophoresis gels and re-amplified by using the corresponding +2 primer combinations. Re-amplified fragments were cloned and sequenced. Sequences were compared to EST and protein databases on the worldwide web.

A total of 45 differentially regulated genes could be examined and attributed to functions as follows: 13% carbohydrate metabolism, 11% aminoacid biosynthesis, 11% senescence associated, 7% cell wall synthesis, 2% BYDV, 16% mRNA of other classes, 9% without significant similarities and 31% mRNA of unknown function. Out of seven different fragments STS, CAPS and SNP markers were derived and mapped in the existing DH population 'Post' x 'Vixen'. Out of the derived markers of the isolated fragments from the cDNA-AFLP, no one mapped in the DH21 population 'Post' x 'Vixen' at known tolerance loci or QTL regions.

Summary

Some sequences could be assigned to barley chromosomes (1H-7H) with wheat-barley chromosome addition lines, but the exact position on the respective chromosome can not be determined by this approach.

The detected gene fragments, especially from the amino acid biosynthesis pathways, possibly play a role in secondary plant reactions after BYDV infection because the high accumulation of carbohydrates in BYDV infected leaves most probably resulted from degeneration of the phloem. Accumulation of sucrose in source-organs is the consequence of a distorted phloem loading. On the one hand the plethora of sucrose gets cleaved in fructose and glucose with manifold feedback processes in the carbohydrate metabolism and, on the other hand, it results in severe chlorosis as a result of the enrichment of soluble carbohydrates in the leaf. The reason for distorted phloem transport could not be clarified but the identification of down-regulated genes from cell wall synthesis after BYDV infection allow to presume that uncured fragments of the cell wall accumulate in the phloem, block the sieve cells, cause chlorosis and finally lead to plant damage and yield reduction.

8 Literatur

- ALLEN E, WANG S, MILLER WA (1999): *Barley yellow dwarf virus* RNA requires a cap-independent translation sequence because it lacks a 5' cap. *Virology* 253, 139-144
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402
- ANANDALAKSMI R, PRUSS GJ, GE X, MARATHE R, MALLORY AC, SMITH TH, VANCE VB (1998): A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13079-13084
- ANONYMUS (2007): Beschreibende Sortenliste 2007 Getreide, Mais, Öfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Bundessortenamt (Hrsg.) Deutscher Landwirtschaftsverlag, 16-45
- ARUNDEL PH, VAN DE VELDE R, HOLLOWAY PJ (1988): Optimal conditions for the use of cDNA probes to measure the concentration of *Barley yellow dwarf virus* in barley (*Hordeum vulgare*). *J Virol Methods* 19, 307-318
- AYALA L, HENRY M, VAN GINKEL M, SINGH R, KELLER B, KHAIRALLAH M (2002): Identification of QTLs for BYDV tolerance in bread wheat. *Euphytica* 128, 249-259
- AZEVEDO RA, ARRUDA P, TURNER WL, LEA PJ (1997): The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* 46, 395-419
- BACHEM WBC, VAN DER HOEVEN RS, DE BRUIJN SM, VREUGDENHIL D, ZABEAU M, VISSER RGF (1996): Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9, 745-753
- BACKHAUSEN JE, KITZMANN C, HORTON P, SCHEIBE R (2000): Electron acceptors in isolated intact spinach chloroplasts act hierarchally to prevent overreduction and competition for electrons. *Photosynth Res* 64, 1-13
- BALAJI B, BUCHHOLTZ DB, ANDERSON JM (2003): *Barley yellow dwarf virus* and *Cereal yellow dwarf virus* Quantification by Real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. *Phytopathology* 93, 1386-1392
- BANKS P, WATERHOUSE PM, LARKIN PJ (1992): Pathogenicity of three RPV isolates of *barley yellow dwarf virus* on barley, wheat and wheat alien addition lines. *Ann Appl Biol* 121, 305-314

Literatur

- BANKS P, LARKIN PJ, BARIANA HS, LAGUDAH ES, APPELS R, WATERHOUSE PM, BRETTTELL RIS, CHEN X, XU HJ, XIN ZY, QIAN YT, ZHOU XM, CHEN ZM, ZHOU GH (1995): The use of cell culture for subchromosomal introgressions of BYD virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Genome* 38, 395-405
- BAR-PELED M, GRIFFITH CL, DOERING TL (2001): Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12003-12008
- BECKER H (1993): Pflanzenzüchtung. Verlag Eugen Ulmer, 282 S
- BECKET R, MILLER WA, JACQUOT E, LAPIERRE H (2004): Genus *Luteovirus*. In: Lapierre H, Signoret PA (Eds.) *Viruses and Virus diseases of Poaceae (Gramineae)*. INRA, 370-374
- BINGHAM PM (1997): Cosuppression comes to the animals. *Cell* 90, 385-387
- BIRNBOIM HC, DOLY J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6), 1513-1523
- BMELV, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (2008): Tab. 2901.1, Stand: April 2008, www.bmelv-statistik.de
- BONIN CP, POTTER I, VANZIN GF, REITER W-D (1997): The *MUR1* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2085-2090
- BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RV (1980): Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32, 314-331
- BOURGUIGNON J, MERAND V, RAWTHORNE S, FOREST E, DOUCE R (1996): Glycine decarboxylase and pyruvate dehydrogenase complexes share the same dihydrolipoamide dehydrogenase in pea leaf mitochondria: evidence from mass spectrometry and primary-structure analysis. *Biochem J* 313, 229-234
- BRIGHT SWJ, WOOD EA, MIFLIN BJ (1978): The effect of aspartate-derived amino acids (lysine, threonine, methionine) on the growth of excised embryos of wheat and barley. *Planta* 139, 113-117
- BRYAN JK, LISSIK EA, MATTHEWS BF (1977): Changes in enzyme regulation during growth of maize. *Plant Physiol* 59, 673-679
- BUCHANAN-WOLLASTON V (1997): The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48, 181-199
- BURNETT PA, COMEAU A, QUALSET CO (1995): Host plant tolerance or resistance for control of *barley yellow dwarf*. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (Eds.) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press, 321-343

- BURROWS ME, CAILLAUD MC, SMITH DM, GRAY SM (2007): Biometrical genetic analysis of luteovirus transmission in the aphid *Schizaphis graminum*. *Heredity* 98, 106-113
- CARLOS JS, EMMANUEL DN, ANDREW JG (1994): Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products Separated on Polyacrylamide Gels. *BioTechniques* 17, 914-921
- CASTILHO A, CUNHA M, AFONSO AR, MORAIS-CECILIO L, FEVEREIRO PS, VIEGAS W (2005): Genomic characterization and physical mapping of two fucosyltransferase genes in *Medicago trunculata*. *Genome* 48, 168-176
- CATHERALL PL, HAYES JD (1966): Assessment of varietal reaction and breeding for resistance to *yellow dwarf virus* in barley. *Euphytica* 15, 39-51
- CHALHOUB BA, KELLY L, ROBAGLIA C, LAPIERRE HD (1994): Sequence variability in the genome-3'-terminal region of BYDV for 10 geographically distinct PAV-like isolates of *Barley yellow dwarf virus*: analysis of the ORF6 variation. *Arch Virol* 139, 403-416
- CHALHOUB BA, SARRAFI A, LAPIERRE HD (1995): Partial resistance in the barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar 'Chikurin Ibaraki 1' to two PAV-like isolates of *Barley yellow-dwarf virus*: allelic variability at the *Yd2* gene locus. *Plant Breed* 114, 303-307
- CHAY CA, SMITH DM, VAUGHAN R, GRAY SM (1996): Diversity among isolates within PAV serotype of *barley yellow dwarf virus*. *Phytopathology* 86, 370-377
- CHENG S-L, DOMIER LL, D'ARCY CJ (1994): Detection of the readthrough protein of *Barley yellow dwarf virus*. *Virology* 202, 1003-1006
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987): Single step method isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159
- CHUNG S-M, VAIDYA M, TZFIRA T (2006): *Agrobacterium* is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. *Trends Plant Sci* 11, 1-4
- CHURIN Y, SCHILLING S, BÖRNER T (1999): A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Lett* 459, 33-38
- CLARK MF, ADAMS AN (1977): Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J Gen Virol* 34, 475-483
- CLOSE TJ (2005): The barley microarray: a community vision and application to abiotic stress. *Czech J Genet Plant Breed* 41, 144-152
- CLOSE TJ, WANAMAKER S, CALDO RA, TURNER SM, ASHLOCK DA, DICKERSON JA, WING RA, MUEHLBAUER GJ, KLEINHOF A, WISE RP (2004): A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Physiol* 134, 960-968

Literatur

- COLLINS NC, PALTRIDGE NG, FORD CM, SYMONS RH (1996): The *Yd2* gene for *barley yellow dwarf virus* resistance maps close to the centromere on the long arm of barley chromosome 3. *Theor Appl Genet* 92, 858-864
- CONNOR M, KRELL T, LINDSAY JG (1996): Identification and purification of a distinct dihydrolipoamide dehydrogenase from pea chloroplasts. *Planta* 200, 195-202
- COOPER B, LAPIDOT M, HEICK JA, DODDS JA, BEACHY RN (1995): A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* 206, 307-313
- COOPER JI, JONES AT (1983): Responses of plants to viruses: Proposal for the use of terms. *Phytopathology* 73, 127-128
- DAMSTEEGT VD, BRUEHL GW (1964): Inheritance of resistance in barley to *barley yellow dwarf*. *Phytopathology* 54, 219-224
- D'ARCY CJ (1995): Symptomatology and host range of *barley yellow dwarf*. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (Eds) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press, 9-28
- D'ARCY CJ, DOMIER LL, MAYO MA (2000): Family *Luteoviridae*. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Eds.) *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Academic Press, 775-784
- DEB M, ANDERSON JM (2008): Development of a multiplexed PCR detection method for *Barley* and *Cereal yellow dwarf viruses*, *Wheat spindle streak virus*, *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus*. *J Virol Methods* 148, 17-24
- DELSERONE LM, COLE H, FRANK JA (1987): The effects of infections by *Pyrenophora teres* and *Barley yellow dwarf virus* on the freezing hardiness of winter barley. *Phytopathology* 77, 1435-1437
- DEPÈGE N, DREVET J, BOYER N (1998): Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins. *Eur J Biochem* 253, 445-451
- DI R, BRAULT V, DINESH-KUMAR SP, MILLER WA (1991): Translational control of *Barley yellow dwarf virus*. *Phytopathology* 81, 1221
- DI R, DINESH-KUMAR SP, MILLER WA (1993): Translational frameshifting by *barley yellow dwarf virus* RNA (PAV serotype) in *Escherichia coli* and in eukaryotic cell-free extracts. *Mol Plant-Microbe Interact* 6, 444-452
- DIAZ-VIVANCOS P, CLEMENTE-MORENO MJ, RUBIO M, OLMOS E, GARCIA JA, MARTINEZ-GOMEZ P, HERNANDEZ JA (2008): Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to *plum pox virus*. *J Exp Bot* 59, 2147-2160

- DITT RF, NESTER EW, COMAI L (2001): Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci USA 98, 10954-10959
- DOMIER LL, LUKASHEVA LI, D'ARCY CJ (1994): Coat protein sequences of RMV-like strains of *Barley yellow dwarf virus* separate them from other luteoviruses. Intervirology 37, 2-5
- DOUCE R, BOURGUIGNON J, NEUBURGER M, RÉBEILLÉ F (2001): The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. Trends Plant Sci 6, 167-176
- DUBOS C, WILLMENT J, HUGGINS D, GRANT GH, CAMPBELL MM (2005): Kanamycin reveals the role played by glutamate receptors in shaping plant resource allocation. Plant J 43, 348-355
- ECKEY C (2002): Isolierung und Charakterisierung Pathogen-induzierter Gene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Markerentwicklung für den *Mlg* Resistenzgenlocus mittels cDNA-AFLP. Dissertation Universität Giessen
- ESAU K (1957a): Anatomical effects of *barley yellow dwarf virus* and maleic hydrazide on certain *Poaceae*. Hilgardia 27, 15-69
- ESAU K (1957b): Phloem degeneration in *gramineae* affected by the *barley yellow dwarf virus*. Am J Bot 44, 245-251
- FERERES A, ARAYA JE, HOUSLEY TL, FOSTER JE (1990): Carbohydrate composition of wheat infected with *barley yellow dwarf virus*. Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz 97, 600-608
- FILICHKIN SA, BRUMFIELD S, FILICHKIN TP, YOUNG MJ (1997): *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with *Barley yellow dwarf virus*. J Virol 71, 569-577
- FORD CM, PALTRIDGE NG, RATHJEN JP, MORITZ RL, SIMPSON RJ, SYMONS RH (1998): Rapid and informative assays for Yd2, the *barley yellow dwarf virus* resistance gene, based on the nucleotide sequence of a closely linked gene. Mol Breed 4, 23-31
- FRIEDT W, SCHIEMANN A, SCHEURER KS, PELLIO B, ORDON F (1999): Breeding for virus resistance in barley. In: Scarascia Mugnozza GT, Porceddu E, Pagnotta MA (Eds.) Genetics and breeding for crop quality and resistance. Kluwer Academic Publishers, 233-240
- FRIEDT W, WEISKORN C, SCHEURER KS, HABEKUSS A, HUTH W, ORDON F (2001): *Barley yellow dwarf virus*-Toleranz und markergestützte Züchtungsansätze bei der Gerste. 52. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. BAL Gumpenstein, 117-120
- GALLITELLI D (2004): Nucleic acid-based assay for the diagnosis of viral pathogens. Phytopathol Mediterr 43, 221-227
- GILDOW FE (1999): Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In: Smith HG, Barker H (Eds.) *The Luteoviridae*, CABI Publishing, 88-112

Literatur

- GILDOW FE, ROCHOW WF (1980): Role of accessory salivary glands in aphid transmission of *barley yellow dwarf virus*. *Virology* 104, 97-108
- GILL CC, CHONG J (1975): Development of the infection in oat leaves inoculated with *barley yellow dwarf virus*. *Virology* 66, 440-453
- GOLDSCHMIDT EE, HUBER SC (1992): Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiol* 99, 1443-1448
- GOLEMBOWSKI DB, LOMONOSOFF GP, ZAITLIN M (1990): Plants transformed with a tobacco mosaic virus non-structural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 6311-6315
- GOODMAN PJ, WATSON MA, HILL ARC (1965): Sugar and fructosan accumulation in virus-infected plants: rapid testing by circular-paper chromatography. *Ann Appl Biol* 56, 65-72
- GRAFTON KF, POEHLMAN JM, SECHLER DT, SEHGAL OP (1982): Effect of *barley yellow dwarf virus* infection on winter survival and other agronomic traits in barley. *Crop Sci* 22, 596-600
- GRAY SM, POWER AG, SMITH DM, SEAMAN AJ, ALTMAN NS (1991): Aphid transmission of *Barley yellow dwarf virus*: Acquisition access periods and virus concentration requirements. *Phytopathology* 81, 539-545
- GUETA-DAHAN Y, YANIV Z, ZILINKAS BA, BEN-HAYIM G (1997): Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta* 203, 460-469
- HABEKUSS A, SCHLIEPHAKE E, MATTHES P, HARTLEB H, MEHNER S, GRÜNTZIG M, FUCHS E (2002): Zum Auftreten des Gerstengelverzwergungsvirus und seiner Vektoren in Sachsen-Anhalt. 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, BAL Gumpenstein, 111-114
- HABEKUSS A, SCHLIEPHAKE E, SOLOVYEVA N (2004): Einfluss der Temperatur auf die Übertragungsrate und die Symptomausprägung von BYDV-PAV durch ungeflügelte *Rhopalosiphum padi* bei Wintergerste. *Vortr Pflanzenzüchtg* 64, 15-17
- HABEKUSS A, RIEDEL C, SCHLIEPHAKE E, ORDON F (2009): Breeding for resistance to insect-transmitted viruses in barley – an emerging challenge due to global warming. *J Kulturpflanzen* 61, 53-61
- HABER S (1995): Interactions of *Barley Yellow Dwarf Viruses*: Cross-Protection and Interactions with other Pathogens and with Abiotic Factors. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (Eds.) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press, 145-161
- HALBERT S, VOEGTLIN D (1995): Biology and Taxonomy of Vectors of *Barley Yellow Dwarf Virus*. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (Eds.) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press, 217-258

- HALDANE JBS (1919): The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J Genet* 8, 299-309
- HAMILTON A, VOINNET O, CHAPPELL L, BAULCOMBE D (2002): Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21, 4671-4679
- HAMILTON AJ, BAULCOMBE DC (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952
- HANAHAH D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580
- HARRISON BD, ROBINSON DJ (2005): Another quarter century of great progress in understanding the biological properties of plant viruses. *Ann Appl Biol* 146, 15-37
- HENKES S, SONNEWALD U, BADUR R, FLACHMANN R, STITT M (2001): A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 13, 535-551
- HENRY M, VIVAR H (1998): Resistance to BYDV in barley. *Barley Yellow Dwarf Newsletter* 7, 4
- HOCKENBERRY DM, OLTVAI ZN, YIN X-M, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ (1993): Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251
- HOLLOWAY PJ, HEATH R (1992): Identification of polypeptide markers of *Barley yellow dwarf virus* resistance and susceptibility genes in non-infected barley (*Hordeum vulgare*) plants. *Theor Appl Genet* 85, 346-352
- HRUZ T, LAULE O, SZABO G, WESSENDORP F, BLEULER S, OERTLE L, WIDMAYER P, GRUISSEM W, ZIMMERMANN P (2008): Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinform* 2008, 420747
- HUBER SC, HUBER JL (1996): Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 47, 431-444
- HULL R (1989): The movement of viruses in plants. *Ann Rev Phytopathol* 27, 213-240
- HUTH W (1992): Gelbverzwergung der Gerste: Widerstandsfähigkeit der Wintergerste gegenüber der Virose. 43. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, BAL Gumpenstein, 53-60
- HUTH W (1995): Möglichkeiten und Grenzen der Züchtung von Getreidesorten mit Resistenz gegenüber den Gelbverzwergungsviren – aus virologischer Sicht. 46. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, BAL Gumpenstein, 1-14

Literatur

- HUTH W (1998): Resistenz-Toleranz: Neu definieren. 48. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, BAL Gumpenstein, 129-133
- HUTH W (1999): Reformation der Resistenzdefinitionen. Nachrichtenblatt des deutschen Pflanzenschutzdienstes 51, 162-163
- HUTH W (2001): Einsatz molekularer Marker zur Selektion virusresistenter Pflanzen von Wintergerste aus phytopathologischer Sicht. 52. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, BAL Gumpenstein, 91-93
- ILBAGI H, RABENSTEIN F, HABEKUSS A, ORDON F, CITIR A (2006): Incidence of virus diseases in maize fields in the trakya region of turkey. *Phytoprotection* 87, 115-122
- ILBAGI H, RABENSTEIN F, HABEKUSS A, ORDON F, CITIR A, CEBECI O, BUDAK H (2008): Molecular, serological and transmission electron microscopic analysis of the Barley yellow dwarf virus-PAV and the Cereal yellow dwarf virus-RPV in canary seed (*Phalaris canariensis* L.). *Cereal Res Comm* 36, 225-234
- INGRAM J, CHANDLER JW, GALLAGHER L, SALAMINI F, BARTELS D (1997): Analysis of cDNA clones encoding sucrose-phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst.. *Plant Physiol* 115, 113-121
- IRWIN ME, THRESH JM (1990): Epidemiology of barley yellow dwarf virus: a study in ecological complexity. *Ann Rev Phytopathol* 28, 393-424
- ISLAM AKMR, SHEPHERD KW, SPARROW DHB (1981): Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. *Heredity* 46 (2), 161-174
- JANG J-C, SHEEN J (1994): Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6, 1665-1679
- JEFFERIES SP, KING BJ, BARR AR, WARNER P, LOGUE SJ, LANGRIDGE P (2003): Marker-assisted backcross introgression of the *Yd2* gene conferring resistance to *barley yellow dwarf virus* in barley. *Plant Breed* 122, 52-56
- JENSEN SG (1968): Photosynthesis, respiration and other physiological relationships in barley infected with barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 58, 204-208
- JENSEN SG (1969): Occurrence of virus particles in the phloem tissue of BYDV-infected barley. *Virology* 38, 83-91
- JENSEN SG, D'ARCY CJ (1995): Effects of *Barley Yellow Dwarf* on Host Plants. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (Eds.) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press, 55-74
- KATAOKA M, WADA M, NISHI K, YAMADA H, SHIMIZU S (1997): Purification and characterization of L-allo-threonine aldolase of *Aeromonas jandaei* DK-39. *FEMS Microbiol Lett* 151, 245-248

- KEGLER H, FRIEDT W (1993): Resistenz von Kulturpflanzen gegen pflanzenpathogene Viren. Gustav Fischer Verlag
- KLINKOWSKI M (1967): Bekämpfung pflanzenpathogener Viren. In: Klinkowski M (Hrg.) Pflanzliche Virologie 1, Einführung in die allgemeinen Probleme, 2. Aufl., Akademie-Verlag, 266-285
- KNELLER ELP, RAKOTONDRAFARA AM, MILLER WA (2006): Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res* 119, 63-75
- KOEV G, LIU S, BECKETT R, MILLER WA (2002): The 3'-terminal structure required for replication of *Barley yellow dwarf virus* RNA contains an embedded 3' end. *Virology* 292, 114-126
- LAMB CJ, LAWTON MA, DRON M, DIXON RA (1989): Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56, 215-224
- LARKIN PJ, YOUNG MJ, GERLACH WL, WATERHOUSE PM (1991): The *Yd2* resistance to *barley yellow dwarf virus* is effective in barley plants but not in their leaf protoplasts. *Ann Appl Biol* 118, 115-125
- LEE SW, TOMASETTO C, SAGER R (1991): Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2825-2829
- LEMIEUX B, AHARONI A, SCHENA M (1998): Overview of DNA chip technology. *Mol Breed* 4, 277-289
- LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R, LAMB C (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593
- LI C, COX-FOSTER D, GRAY SM, GILDOW FE (2001): Vector specificity of *barley yellow dwarf virus* (BYDV) transmission: Identification of potential cellular receptors binding BYDV-MAV in the aphid *Sitobion avenae*. *Virology* 286, 125-133
- LI J, ZHU S, SONG X, SHEN Y, CHEN H, YU J, YI K, LIU Y, KARPLUS VJ, WU P, DENG XW (2006): A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell* 18, 340-349
- LIANG P, PARDEE AB (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971
- LISTER RM, RANIERI R (1995): Distribution and economic importance of *barley yellow dwarf*. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (Eds.) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press, 29-53

Literatur

- LIU J-Q, NAGATA S, DAIRI T, MISONO H, SHIMIZU S, YAMADA H (1997): The *GLY1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-allo-threonine and L-threonine to glycine. *Eur J Biochem* 245, 289-293
- LOMONOSSOFF GP (1995): Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Ann Rev Phytopathol* 33, 323-343
- LUNDIN B, HANSSON M, SCHOEFS B, VENER AV, SPETEA C (2007): The Arabidopsis PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein. *Plant J* 49, 528-539
- MACKILL DJ, ZHANG Z, REDONA ED, COLOWIT PM (1996): Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39, 969-977
- MAISS E (1987): Use of resistance induction through culture filtrates of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb. Ex Link) Hughes and *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn against virus diseases under commercial conditions of crop production. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 4, 275-283
- MALAMY J, CARR JP, LESSIG DF, RASKIN I (1990): Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002-1004
- MALMSTROM CM, SHU R (2004): Multiplexed RT-PCR for streamlined detection and separation of *barley* and *cereal yellow dwarf* viruses. *J Virol Methods* 120, 69-78
- MASTARI J, LAPIERRE H, DESSENS JT (1998): Asymmetrical distribution of *Barley yellow dwarf virus* PAV variants between host plant species. *Phytopathology* 88, 818-821
- MAYO MA (2002): ICTV at the Paris ICV: Results of the planary session and the binomial ballot. *Arch Virol* 147, 2254-2260
- MAYO MA, D'ARCY CJ (1999): Family *Luteoviridae*: a Reclassification of Luteoviruses. In: Smith HG, Barker H (Eds.) *The Luteoviridae*, CABI Publishing, 15-22
- MCGRATH PF, VINCENT JR, LEI C-H, PAWLOWSKI WP, TORBERT KA, GU W, KAEPLER HF, WAN Y, LEMAUX PG, RINES HR, SOMERS DA, LARKINS BA, LISTER RM (1997): Coat protein-mediated resistance to isolates of barley yellow dwarf in oats and barley. *Eur J Plant Pathol* 103, 695-710
- MCKIRDY SJ, JONES RAC (1997): Effect of sowing time on *Barley yellow dwarf virus* infection in wheat: virus incidence and grain yield losses. *Aust J Agric Res* 48, 199-206
- MILLER WA, LIU S, BECKETT R (2002): Barley yellow dwarf virus: *Luteoviridae* or *Tombusviridae*? *Mol Plant Pathol* 3, 177-183
- MILLER WA, RASOCHOVÁ L (1997): *Barley yellow dwarf viruses*. *Ann Rev Phytopathol* 35, 167-190

- MOLINE HE, JENSEN SG (1975): Histochemical evidence for glycogen-like deposits in *barley yellow dwarf virus*-infected barley leaf chloroplasts. *J Ultrastruct Res* 53, 217-221
- MONSCHAU N, STAHMANN K-P, SAHM H, MCNEIL JB, BOGNAR AL (1997): Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 150, 55-60
- MOUILLON J-M, AUBERT S, BOURGUIGNON J, GOUT E, DOUCE R, RÉBEILLÉ F (1999): Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J* 20, 197-205
- MUEHLBAUER GJ, SOMERS DA, MATTHEWS BF, GENGENBACH BG (1994): Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. *Plant Physiol* 106, 1303-1312
- MUELLER WC, ROCHOW WF (1961): An aphid-injection method for the transmission of *Barley yellow dwarf virus*. *Virology* 14, 253-258
- MUNEKAGE Y, HASHIMOTO M, MIYAKE C, TOMIZAWA K-I, ENDO T, TASAKA M, SHIKANAI T (2004): Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429, 579-582
- MURAKAMI R, IFUKU K, TAKABAYASHI A, SHIKANAI T, ENDO T, SATO F (2005): Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO proteins: PsbO1 and PsbO2. *FEBS J* 272, 2165-2175
- MURPHY JF, D'ARCY CJ (1991): Enzyme-linked immunosorbent assay: an unreliable predictor of yields of *barley yellow dwarf* viruses purified from three oat cultivars. *Can J Plant Pathol* 13, 332-335
- MURPHY AM, CHIVASA S, SINGH DP, CARR JP (1999): Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: A parting of the ways? *Trends Plant Sci* 4, 155-160
- NAJAR A, MAKKOUK KM, BOUDHIR H, KUMARI S, ZAROUK R, BESSAI R, OTHMAN FB (2000): Viral diseases of cultivated legume and cereal crops in Tunisia. *Phytopathol Mediterr* 39, 423-432
- NIKS RE, HABEKUSS A, BEKELE B, ORDON F (2004): A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the *Barley yellow dwarf virus*. *Theor Appl Genet* 109, 1536-1543
- NISSAN-AZZOUZ F, GRANER A, FRIEDT W, ORDON F (2005): Fine-mapping of the BaMMV, BaYMV-1 and BaYMV-2 resistance of barley (*Hordeum vulgare*) accession PI1963. *Theor Appl Genet* 110, 212-218
- OKAYAMA H, BERG P (1982): High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol Cell Biol* 2, 161-170

Literatur

- ORDON F, FRIEDT W (1993): Mode of inheritance and genetic diversity of BaMMV-resistance of exotic barley germplasms carrying genes different from 'ym4'. *Theor Appl Genet* 86, 229-233
- ORDON F, PELLIO B, WERNER K, SCHIEMANN A, FRIEDT W, GRANER A (2003): Molecular breeding for resistance to soil-borne viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Dis Prot* 110, 287-295
- ORLOB GB, ARNY DC (1961): Some metabolic changes accompanying infection by *Barley yellow dwarf virus*. *Phytopathology* 51, 768-775
- ORLOB GB, ARNY DC (1961b): Influence of some environmental factors and growth substances on the development of *barley yellow dwarf*. *Plant Dis Rep* 45, 192-195
- OSWALD JW, HOUSTON BR (1951): A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Dis Rep* 35, 471-475
- OVESNÁ J, VACKE J, KUČERA L, CHRPOVÁ J, NOVÁKOVÁ I, JAHOOOR A, ŠÍP V (2000): Genetic analysis of resistance in barley to *barley yellow dwarf virus*. *Plant Breed* 119, 481-486
- OWENS RA, DIENER TO (1981): Sensitive and rapid diagnosis of *potato spindle tuber viroid* disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213, 670-672
- PALIWAL YC (1977): Rapid diagnosis of *Barley yellow dwarf virus* in plants using serologically specific electron microscopy. *Phytopatholog Z* 89, 25-36
- PALIWAL YC (1982): Detection of *Barley yellow dwarf virus* in aphids by serologically specific electron microscopy. *Can J Bot* 60, 179-185
- PALTRIDGE NG, COLLINS NC, BENDAHMANE A, SYMONS RH (1998): Development of YLM, a codominant PCR marker closely linked to the *Yd2* gene for resistance to *barley yellow dwarf* disease. *Theor Appl Genet* 96, 1170-1177
- PARRY AL, HABGOOD RM (1986): Field assessment of the effectiveness of a *barley yellow dwarf virus* resistance gene following its transference from spring to winter barley. *Ann Appl Biol* 108, 395-401
- PARSONS BL, HEFLICH RH (1997): Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mut Res* 387, 97-121
- PFEIFFER ML, GILDOW FE, GARY SM (1997): Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *J Gen Virol* 78, 495-503
- PLASTERK RHA, KETTING RF (2000): The silence of the genes. *Curr Opin Genet Develop* 10, 562-567

- PLUMB RT, JOHNSTONE GR (1995): Cultural, chemical and biological methods for the control of *barley yellow dwarf*. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (Eds.) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press, 307-319
- POWELL-ABEL P, NELSON RS, DE B, HOFFMANN N, ROGERS SG, FRALEY RT, BEACHY RN (1986): Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743
- POWER AG, GRAY SM (1995): Aphid transmission of *Barley yellow dwarf* viruses: Interactions between viruses, vectors, and host plants. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (Eds.) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press, 259-289
- POWER AG, SEAMAN AJ, GRAY SM (1991): Aphid transmission of *Barley yellow dwarf virus*: Inoculation access periods and epidemiological implications. *Phytopathology* 81, 545-548
- PRELL HH, DAY PR (2001): *Plant-Fungal pathogen interaction, a classical and molecular view*. Springer-Verlag
- PRIBEK D, POCSAI E, VIDA G, VEISZ O (2006): Presence of *wheat dwarf virus*, *cereal yellow dwarf virus-RPV* and *barley yellow dwarf* viruses in cereal species in Mantonvasar. *Cereal Res Comm* 34, 625-628
- PRINS M, LAIMER M, NORIS E, SCHUBERT J, WASSENEGGER M, TEPFER M (2008): Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol* 9, 73-83
- RANIERI R, LISTER RM, BURNETT PA (1993): Relationships between *barley yellow dwarf virus* titer and symptom expression in barley. *Crop Sci* 33, 968-973
- RASMUSSEN DW, SCHALLER CW (1959): The inheritance of resistance in barley to the *yellow dwarf virus*. *Agron J* 51, 661-664
- REITER WD, VANZIN GF (2001): Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Mol Biol* 47, 95-113
- ROBERTSON NL, FRENCH R (2007): Genetic structure in natural populations of *barley / cereal yellow dwarf virus* isolates from Alaska. *Arch Virol* 152, 891-902
- ROBERTSON NL, FRENCH R, GRAY SM (1991): Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J Gen Virol* 72, 1473-1477
- ROCHOW WF (1958): The role of aphids in vector specificity of *Barley yellow-dwarf virus*. *Plant Dis Rep* 42, 905
- ROCHOW WF (1959): Transmission of strains of *barley yellow dwarf virus* by two aphid species. *Phytopathology* 49, 744-748

Literatur

- ROCHOW WF (1960): Transmission of *barley yellow dwarf virus* acquired from liquid extracts by aphids feeding through membranes. *Virology* 12, 223-232
- ROCHOW WF (1969): Biological properties of four isolates of *barley yellow dwarf virus*. *Phytopathology* 59, 1580-1589
- ROCHOW WF, BRAKKE MK (1964): Purification of *Barley yellow dwarf virus*. *Virology* 24, 310-322
- ROCHOW WF, CARMICHAEL LE (1979): Specificity among *Barley yellow dwarf viruses* in Enzyme Immunosorbent Assays. *Virology* 95, 415-420
- ROGNES SE, BRIGHT SWJ, MIFLIN BJ (1983): Feedback-insensitive aspartate kinase isoenzymes in barley mutants resistant to lysine plus threonine. *Planta* 157, 32-38
- ROZEN S, SKALETSKY HJ (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 365-386
- RUSSELL SL, KIMMINS WC (1971): Growth regulators and the effect of *Barley yellow dwarf virus* on Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Ann Bot* 35, 1037-1043
- SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354
- SANDERFOOT AA, RAIKHEL NV (1999): The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell* 11, 629-641
- SANDERFOOT AA, ASSAAD FF, RAIKHEL NV (2000): The *Arabidopsis* genome. An abundance of soluble *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiol* 124, 1558-1569
- SCHALLER CW (1984): The genetics of resistance to *barley yellow dwarf virus* in barley. In: Burnett PA (Ed.) *Barley yellow dwarf: Proceedings of the workshop, CIMMYT*, 93-99
- SCHALLER CW, QUALSET CO, RUTGER JN (1964): Inheritance and linkage of the *Yd2* gene conditioning resistance to the *barley yellow dwarf* disease in barley. *Crop Sci* 4, 544-548
- SCHALLER CW, RASMUSSEN DC, QUALSET CO (1963): Sources of resistance to the *yellow-dwarf virus* in barley. *Crop Sci* 3, 342-344
- SCHENA M, SHALON D, DAVIS RW, BROWN PO (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470
- SCHEURER KS (2000): Genetische Analyse der Vererbung von Toleranz der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gegenüber *Barley yellow dwarf virus* (BYDV). Dissertation Universität Giessen, Shaker Verlag

- SCHEURER KS, HUTH W, FRIEDT W, ORDON F (2000): First results on BYDV-tolerance in barley estimated in pot experiments. *J Plant Dis Prot* 107, 427-432
- SCHEURER KS, FRIEDT W, HUTH W, WAUGH R, ORDON F (2001): QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 103, 1074-1083
- SCHIEMANN A (1999): Entwicklung PCR-basierter Marker für Resistenzgene gegen Gelbmosaikviren der Gerste und Erstellung einer hochauflösenden Kartierungspopulation für das Resistenzgen *ym5*. Dissertation Universität Giessen, Shaker Verlag
- SCHLÜPEN C (2003): Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener Enzyme des Glycin-Stoffwechsels für die Riboflavin-Bildung in *Ashbya gossypii*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- SCHNARRENBARGER C, FLECHNER A, MARTIN W (1995): Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiol* 108, 609-614
- SCHOPFER P, BRENNICKE A (2006): Pflanzenphysiologie. 6. Auflage, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag
- SCHUELKE M (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18, 233-234
- SCHWEIZER P, POKORNY J, SCHULZE-LEFERT P, DUDLER R (2000): Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J* 24, 895-903
- SEIFERT GJ (2004): Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr Opin Plant Biol* 7, 277-284
- SHIMIZU H, SHIKANAI T (2007): Dihydrodipicolinate reductase-like protein, CRR1, is essential for chloroplast NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant J* 52, 539-547
- SIGNORET PA, MAROQUIN C (1990): The *barley yellow dwarf virus* situation in western Europe. In: Burnett, PA (Ed.) *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico, 42-44
- SINGH RP (1993): Genetic association of gene *Bdv1* for tolerance to *Barley yellow dwarf virus* with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rusts in bread wheat. *Plant Dis* 77, 1103-1106
- ŠÍP V, CHRPOVÁ J, VACKE J, OVESNÁ J (2004): Possibility of exploiting the *Yd2* resistance to BYDV in spring barley breeding. *Plant Breed* 123, 24-29

Literatur

- SKARIA M, LISTER RM, FOSTER JE, SHANER G (1985): Virus content as an index of symptomatic resistance to *barley yellow dwarf virus* in cereals. *Phytopathology* 75, 212-216
- SMYRNIODIS IN, HARRINGTON R, HALL M, KATIS N, CLARK SJ (2001): The effect of temperature on variation in transmission of a BYDV-PAV-like isolate by clones of *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Eur J Plant Pathol* 107, 167-173
- SMITH HC (1955): Barley yellow dwarf virus in New Zealand. *Commonwealth Phytopathol News* 1, 10-11
- SMITH HC (1957): Cereal yellow dwarf virus seen in Australia. *Commonwealth Phytopathol News* 3, 10-11
- SONNEWALD U, BRAUER M, VON SCHAEWEN A, STITT M, WILLMITZER L (1991): Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant J* 1, 95-106
- SPIELMEYER W, ELLIS M, ROBERTSON M, ALI S, LENTON JR, CHANDLER PM (2004): Isolation of gibberellin metabolic pathway genes from barley and comparative mapping in barley, wheat and rice. *Theor Appl Genet* 109, 847-855
- SPIELMEYER W, SINGH RP, MCFADDEN H, WELLINGS CR, HUERTA-ESPINO J, KONG X, APPELS R, LAGUDAH ES (2007): Fine scale genetic and physical mapping using interstitial deletion mutants of *Lr34/Yr18*: a disease resistance locus effective against multiple pathogens in wheat. *Theor Appl Genet* 116, 481-490
- STICHER L, MAUCH-MANI B, MÉTRAUX JP (1997): Systemic acquired resistance. *Ann Rev Plant Pathol* 35, 235-270
- SUGIMOTO M, SAKAMATO W (1997): Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. *Genes Genet Systems* 72, 311-316
- SUNESON CA (1955): Breeding for resistance to *yellow dwarf virus* in barley. *Agron J* 47, 283
- SUNESON CA, RAMAGE RT (1957): Studies on the importance of the *yellow-dwarf virus*. *Agron J* 49, 365-367
- SYVÄNEN A-C, AALTO-SETÄLÄ K, HARJU L, KONTULA K, SÖDERLUND H (1990): A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics* 8, 684-692
- TANKSLEY SD (1983): Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep* 1, 3-8
- TANKSLEY SD (1993): Mapping Polygenes. *Ann Rev Genet* 27, 205-233

- TAUTZ D (1989): Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 12, 4127-4137
- THOMAS H, STODDART JL (1980): Leaf senescence. *Ann Rev Plant Physiol* 31, 83-111
- TOMMASINI L, SVENSSON JT, RODRIGUEZ EM, WAHID A, MALATRASI M, KATO K, WANAMAKER S, RESNIK J, CLOSE TJ (2008): Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct Integr Genom* 8, 387-405
- TOOJINDA T, BROERS LH, CHEN XM, HAYES PM, KLEINHOF A, KORTE J, KUDRNA D, LEUNG H, LINE RF, POWELL W, RAMSAY L, VIVAR H, WAUGH R (2000): Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor Appl Genet* 101, 580-589
- TORRANCE L, JONES RAC (1981): Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. *Plant Pathol* 30, 1-24
- TREDER K, KNELLER ELP, ALLEN EM, WANG Z, BROWNING KS, MILLER WA (2008): The 3' cap-independent translation element of *Barley yellow dwarf virus* binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *RNA* 14, 134-147
- UMBARGER HE (1978): Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* 47, 533-606
- URBANCZYK-WOCHNIAK E, LEISSE A, ROESSNER-TUNALI U, LYTOVCHENKO A, REISMEIER J, WILLMITZER L, FERNIE AR (2003): Expression of a bacterial xylose isomerase in potato tubers results in an altered hexose composition and a consequent induction of metabolism. *Plant Cell Physiol* 44, 1359-1367
- VANACKER H, CARVER TLW, FOYER CH (1998): Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol* 117, 1103-1114
- VAN DEN HEUVEL JFJM, BRUYÈRE A, HOGENHOUT SA, ZIEGLER-GRAFF V, BRAULT V, VERBEEK M, VAN DER WILK F, RICHARDS K (1997): The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL, and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol* 71, 7258-7265
- VAN DER BIEZEN EA, JUWANA H, PARKER JE, JONES JDG (2000): cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13, 895-898
- VAN WAETERMEULEN X (2004): Strategies of insecticide control of aphids vectors of small grain *Luteoviridae*-like viruses (BYDVs). In: Lapiere H, Signoret PA (Eds.) *Viruses and Virus diseases of Poaceae (Gramineae)*. INRA, 230-235
- VIOLA RE (2001): The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis. *Acc Chem Res* 34, 339-349

Literatur

- VON RADEMACHER B, SCHWARZ R (1958): Die Rotblättrigkeit oder Blattröte des Hafers – eine Viruskrankheit (*Hordeumvirus nanescens*). Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz 65, 641-650
- VON SCHAEWEN A, STITT M, SCHMIDT R, SONNEWALD U, WILLMITZER L (1990): Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. EMBO J 9, 3033-3044
- VON SCHAEWEN A, STURM A, O'NEILL J, CHRISPEELS MJ (1993): Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks *N*-Acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize golgi-modified complex N-linked glycans. Plant Physiol 102, 1109-1118
- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, VAN DE LE T, HORNES M, FRIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M, ZABEAU M (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23, 4407-4414
- WALTER MH, GRIMA-PETTENATI J, GRAND C, BOUDET AM, LAMB CJ (1988): Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. Proc Natl Acad Sci USA 85, 5546-5550
- WANG MB, ABBOT DC, WATERHOUSE PM (2000): A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to *barley yellow dwarf virus*. Mol Plant Pathol 1, 347-356
- WANG MB, CHENG Z, KEESE P, GRAHAM MW, LARKIN PJ, WATERHOUSE PM (1998): Comparison of the coat protein, movement protein and RNA polymerase gene sequences of Australian, Chinese and American isolates of *barley yellow dwarf virus* transmitted by *Rhopalosiphum padi*. Arch Virol 143, 1005-1013
- WATERHOUSE PM, MARTIN RR, GERLACH WL (1989): BYDV-PAV virions contain readthrough protein. Phytopathology 79, 1215
- WATERHOUSE PM, WANG M-B, LOUGH T (2001): Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 411, 834-842
- WATSON MA, MULLIGAN T (1960): The manner of transmission of some *Barley yellow-dwarf viruses* by different aphid species. Ann Appl Biol 48, 711-720
- WEISKORN C, KRÄMER M, HUTH W, FRIEDT W, ORDON F (2004): Investigation on the efficiency of dichloroisonicotinic acid (DCINA) against a German isolate of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). J Plant Dis Prot 111, 566-571
- WEN F, LISTER RM (1991): Heterologous encapsidation in mixed infections among four isolates of *Barley yellow dwarf virus*. J Gen Virol 72, 2217-2223

- WESLEY SV, HELLIWELL CA, SMITH NA, WANG M, ROUSE DT, LIU Q, GOODING PS, SINGH SP, ABBOTT D, STOUTJESDIJK PA, ROBINSON SP, GLEAVE AP, GREEN AG, WATERHOUSE PM (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27, 581-590
- WHITAKER RD, CHO Y, CHA J, CARRELL H, GLUSKER JP, KARPLUS PA, BATT CA (1995): Probing the roles of active site residues in D-xylose isomerase. *J Biol Chem* 270, 22895-22906
- WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI JA, TINGEY SV (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18, 6531-6535
- YOUSSEFIAN S, NAKAMURA M, SANO H (1993): Tobacco plants transformed with the *O*-acetylserine (thiol) lyase gene of wheat are resistant to toxic levels of hydrogen sulphide gas. *Plant J* 4, 759-769
- ZABEAU M, Vos P (1993): Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent application number 92402629.7, Publication number 0534858A1
- ZHANG W, CARTER M, MATSAY S, STOUTJESDIJK P, POTTER R, JONES MGK, KLEVEN S, WILSON RE, LARKIN PJ, TURNER M, GALE KR (2001): Implementation of probes for tracing chromosome segments conferring *barley yellow dwarf virus* resistance. *Aust J Agric Res* 52, 1389-1392
- ZHANG Q, SHIRLEY N, LAHNSTEIN J, FINCHER GB (2005): Characterisation and expression patterns of UDP-D-glucuronate decarboxylase genes in barley. *Plant Physiol* 138, 131-141
- ZHU S, KOLB FL, KAEPLER HF (2003): Molecular mapping of genomic regions underlying *barley yellow dwarf* tolerance in cultivated oat (*Avena sativa* L.). *Theor Appl Genet* 106, 1300-1306

9 Anhang

Tab. 9.1: Sequenzen der cDNA-AFLP Fragmente

cDNA-AFLP PK	Fragment-Klon Code	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')
E12/M15	A4-3	442	gactgcgtaccaattcaccactctggaacttgcctgagaacgtgaggagttgtaacccagaggtgacagtgacatgactgagaactcctgatgacctcccgagggaagctgacacccaagaagcaagaggttctgactggagcccaaggtgctcttctgtagcgttgggtgctc atgggaggaacacttcgggagcgtttggcagtgcccaagaagcaagcctaagggcaactccctgcttggcgatcaccaaatgtccga gacatactcatagttgggtgggtctgcaatattcgtgctgtttgtattactcccgcttttgcggaacttggctcctaattgttttagcttagca ctccccaataatatagcaacgttgggtccattttgggctgttactcaggactcatc
E12/M15	A5-4	451	gactgcgtaccaattcaccaccagcgaagatgaaatcttctgactgtaagaactaactacatatgtagcagcaatgctacagtcaccta ctgctcggttctgactctcttctactctgggatgcatgaactccttgggaagttctctagttctctgtagcaaacgtgcatcatcaaacact gtttgaactcttctcagtgtttattctgaaagactctgccaatttctggttgaagaanaaacctgtgataaaagaaacataataaccaca ttctccccattttgtggcacttaggaactcgagacggatttttctagaagtcgctgttcttccgctcttgattcaataaacaccag aatgaactctgtagctcaggtcccagcctcttggatctgtgttactcaggactcatc
E11/M16	C2-2	191	aacggcgaaactctcatcaggtgggtccctctaggcgggaagcagtgaccacaagcaagagcatcgattatggtattcaaccagac tgcctgattagatgacataaataaggttatgatgtgggttcagggaggtacttagcccccaaaaactatgactcatcacaactttctgggca 88
E11/M14	C9-6	398	aacgaaggtccagcagcgagcgagcgaagcggcgaggatgactaccgcaactgcttccctctctccactgctcactctggggcagc gtcgcccggccggcctcgcgggggtctctctcttcggcgcaaggagaatccagggtcatcttcccgcaaggcgagagcgtgaggcagc aggacagagccatgatgggcaagaactagtcagaccacaactcaattcgactctcaccatgtagcctacacagggaaacggcgtatctt gctctatagacaatattttctgctgctggcaatggcaacttctgcttcccccaatgaaatactcggcgccatgcttctttgagcaaac tcatgactctgttactc
E25/M24	D1-4	125	tgccagtgctctgaaatgtcaagtgaaagaattcaaccaagcgcgggtaaacggcgaggtaactgactctttaaagtagcacaatgctt cgtcatcaatagtagcgcgcatgaatgga
E25/M24	D2-6	122	tcgtggggatccggctgctgactgtcttattttgtagtgaccacaacgtgaaacgtgagacatgagagccccagctgcttctgactgt gtagatcacagatccaactgtcca
E25/M24	D8-12	122	tgaaaaagagcggatgacacttcacagaagcagtgctttggctacaccaactcaacatagactctgaaacatactcctcatccttaggaaa gtagtctcgtcatattggtatcacaga
E25/M24	D8-15	122	tggcaatcggaaaggtgatacggttgaagaactgattatggcctggagaactctgttaggaacgtcagctcacatcatgagaactctt ttttctcaggaaagatcaatggga
E25/M24	D12-16	316	tgcttcaaatgataggaagccgacatcgaaggatcaaaaagcaacgtcgtatgaacgttggctgccaagcagttatccctgtggtgta acttttctgacacctctgactcacaactcgaagatcaaaagatcgatagccacgttctcaggttcgattctgactgtaactcagaatcaaa cgagcttttaccctttgtccacacagagattctgtctctgttagctcatcttaggacacctgcttatctttactcaggactcctcgcgacc ccttgctttgtgcgtgaaattgtcagatctggaagggatgagggcggtgaaatagttggtgagactagacggttatctgctctctcgcag cccccacttctgtcttga
E25/M24	D15-2	404	tgcttcaaatgataggaagccgacatcgaaggatcaaaaagcaacgtcgtatgaacgttggctgccaagcagttatccctgtggtgta acttttctgacacctctgactcacaactcgaagatcaaaagatcgatagccacgttctcaggttcgattctgactgtaactcagaatcaaa cgagcttttaccctttgtccacacagagattctgtctctgttagctcatcttaggacacctgcttatcttttaccggaaactcctcgcgacc ccttgctttgtgcgtgaaattgtcagatctggaagggatgagggcggtgaaatagttggtgagactagacggttatctgctctctcgcag cccccacttctgtcttga
E25/M24	D17-15	411	tgcttcaaatgataggaagccgacatcgaaggatcaaaaagcaacgtcgtatgaacgttggctgccaagcagttatccctgtggtgta acttttctgacacctctgactcacaactcgaagatcaaaagatcgatagccacgttctcaggttcgattctgactgtaactcagaatcaaa cgagcttttaccctttgtccacacagagattctgtctctgttagctcatcttaggacacctgcttatcttttaccggaaactcctcgcgacc atttctcataaggtgcggcggaagctcctataagcaactcggcactcctctgctgagcttattggtgagactagacggttatctgctctcgcag ttcgagcccccaacttctgtcttga
E25/M25	D18-24	256	gtttatgctcgtatcctagaggtactcctgcttacttattattgttatacaagttcgcgaactgatggcaaacattggtatggtgtagt ggcagctgtgcattcgggatacaaatcaagcatgcatctggagttgtataggggtcggctccaanaataagataaaatgtagtactgttggct tttgctcgtgagctggggagttcttttggctcctggagatccattttccgatgttga

Tab. 9.1 Fortsetzung

cDNA-AFLP PK	Fragment-Klon Code	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')
E25/M25	D19-17	257	tgtcttcaaatgataggaagccgacatcgaaggatcaaaaagcaactgctgctgaacgcttggctccacaagcattatctctccgca cttggctaccacggctttactcgttaggcacgataactgctacaccagggctgctcttccgctctctctgactagggaaaggtctctcaatgc tcaacgccacacggatgatggaccgaactgtctcacgacttctgaaccagctcaactgctaccg
E25/M25	D22-20	318	tggcagaaatcttcagcagcccggaattctgtccgggtgttgctctgaggttgctggtgttcgaatgacctgtgtgtaatgattg ggatgatgaccggacttactcgtgctgctgtttcaaggccgggtttccaaggattggttccccgaatgcgaatggtttatcccgga aacatgctatcgaacatggtcaaggcatgcaaaactcagtaaatcttccctgggtgctgactggtcccttggaaatgcatggtggacc gtgatccgatgcagatgtctggcctggcca
E25/M25	D24-25	373	tgcagaaggaacaggagaaactggcaagaactggtgatctcaccagcagcagatgctaccagagagaactcttagtggaggcctttag ctgatacagttggattattgtctccacagacctctagcagaggaagcgaacctgaagaagattccgaccaggaacaacagaggactggct agtagaaggatgctgtgtgatactactcagggccagaactggcaggtgtgcatgtaaccattacaacctgctataatgctcagcagca tactggatgacagaattgtagtgatccagcagctctgtctgctgcagcaactgtagcagcaaacatcaccaattgtagatacagcttca
E14/M17	E4-4	375	cgctgcactccagttggcttaacaactccaactaccctgctctctctgactcgtactctgacaagggcgtcttttggcgacagcat caaatggaaatcttcaagtcttggtagaaggagggtcacgttggagcgtatgccccgaccttccccatgagcattgaaagagata taagaagctgcttagactgacactgctggctggagcctgtgagagaatctgctactctgactcaagaacaatgaataattgtgtca aataaaaaactgtagtatttccagagggtgactctactgttttctcatcctactgctactgtttagtattgtagttaa
E14/M17	E9-8	131	cgatcgcgactgtagctcgatccaattcatggggaagtgcacaagtaaatgggattgaattctagtagctggaccattggacatg gacatcatgaaaaaaggccaagtgcattgccg
E11/M14	F1-1	208	aaccaagcgggtaaacggcgggagtaactatgactcttaaatcgaaccaaccttgggttctaggttagcgcgactgggaccg taaccggcttcggttaccctccatcccgatgcagttctgcttcaaaaatggccactggagcaccgattccgtagcagcctcaccgaagca gccggacatctactat
E11/M14	F1-4	213	aagcattgctgctgctatgattgacagccatgatggcagcaagttgaactcactctgttcatgcatcagatccaagcaactaaggctactgt ataaaggteggggtagagctgctgaaatgacgggtgttggtagaagcggcgcaacagattatggaggctacttggaggatgacga agaccatatactcaaggctcat
E11/M14	F2-1	501	atcagttatagttgtttgatggtactgctactcggataaccgtagtaattctagagctaatacgtgcaacaaccccgacttttggaggggc catttattagataaaaggctgacgtggcctctgctcgtgactcagatgattcatgataactcagcggatcagctgacttggctgctgacgcac cattcaaatcttctcctatacaacttctgatgtaggataggggcctaccatgtggtgacgggtgacgagaattagggtcattccgagag ggagcctgagaaaacgctaccacatccaaggaaggcagcagggcgcaaatcccaatctctgacaggggaggtagtgacaataaatac aataccggcgcattagttgctgtaattggatgagtaacaatcaaatccctaaacggagatcattggaggggcaagctgtggtcagcagcc cggtaattccagctccaatagcgtatat
E11/M14	F6-1	540	atgggtgaaagcctggaccacacaagatccaagaaatgggaactggttacccttgggtctggatgtgacatcatgtgaaaccgtacag gtttcaagtgatgattcattgagatggcaaaactctctgacttgaagaagaaatgctggttgggactctcttggctgctgctgacgcca atcaaggttctcagagcctgaaaaagcagggaaactcttgggttattcccaagcttggagagcgtactcttctgctgctcttccact ctacaagaagaggccgagagcattggttggagatgctcccgagactcctgacgagcgaagcttcttccgaagcaaatccctcctgct aaaggaccctctacaagaataaaagcttctgctcctctgtagttggtctgacattaaagccttggcaagtttggagcttcttggtagc aaatgggaatctctgttggccttctggcattgaaattacgtctgctgctgatatatt
E14/M14	G3-2	200	atcgaatgtcacagatatggtaccaaatccattcgtttgttggtaacctcogtaagagacaacatagttgactgtgacttcttattgtttg gagcattaggtagaacaagcagcatcagctgactgctgacgtgaaagacatcagcggcactcccttcaactattgttccatctgtgactg caatcat
E14/M14	G7-1	501	atcagttatagttgtttgatggtactgctactcggataaccgtagtaattctagagctaatacgtgcaacaaccccgacttttggaggggc catttattagataaaaggctgacgtggcctctgctcgtgactcagatgattcatgataactcagcggatcagctgcttggctgctgacgcac cattcaaatcttctcctatacaacttctgatgtaggataggggcctaccatgtggtgacgggtgacgagaaatagggtctgattccggagag ggagcctgagaaaacgctaccacatccaaggaaggcagcagggcgcaaatcccaatcccaatctgacacgggaggtgtagcaataaatac aataccggcgcgttagttctgtaattggaaatgagtaacaatcaaatccctaaacggagatcattggaggggcaagctgtggtcagcagcc cggtaattccagctccaatagcgtatat

Tab. 9.1 Fortsetzung

cDNA-AFLP PK	Fragment-Klon Code	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')
E12/M21	H1-1	497	gggattgattgtactctccaattaccagacactaatgcccggattgtttatttattgtcactactcccgtgcaggattgggtaattgfcgocctgctgctccttcctggatgtgtagacgtttctcaggctccctcctcggaaatcgaaacctaaattccgtcaccctcaccacatgtaggccctactctaccatgaaagttgatggcgagaaattgaaatgatcgctcggcgcacaaaaggccatcgatccgtcagttatcatgaaatcatggatcagcagcagagcccaactgacgtctttatctaataatgcccctcccaaaatgggggtttgttcacgtattagctctgaaatctacta cggttatccgagtagcacgtaccatcaaaacaaactaaactgattactcaggactcatgtaattcatctgcccgtcactaattagatgacgaggcattgtgctacc
E12/M21	H2-4	472	gggaagttggatcccactatttgcactgactcctggtgtgtaagcttctcaagaagcactgtgtaacttactcctccagttatattgttggca tttacatgagttggattacctgcttacttcaaaaagagctagagacggcctgaaaggatccaagcaggagttctcttcaagtcttccctgatttgcagaccatttggatcgcgatccctcaatattccatagctcttctggagagatctggtggcagacagggtcagacact ggaaacctcatctcctggttcagattctactgaggaacaggaggaggggcaaaaggcactggagcaaaatgtgctggga agctggcccgctcaagatagacagagacacatctctgacgactgcacaaatttgagccttcaaaaacgactcgaattgtt
E12/M21	H3-1	523	ggctgaggcgcgatccggccgaaggctcagtaggtcggctgctgctgagcggacggccgaccggcccaagatgactcctgagta aatcagttatagtttggatgctgctactcggataaccgtagtaattctagagctaatactgcaacaacccgactttggaggggc gattattagataaaaagctgacgtggcctcgtcgtatccgatattcatgataactgacgctgcatgctgcttggccggcga cgca tcaatcaatttctccctcaactctgtagtaggtagggcctactatggtagcgggtgacgggtgacgagaatagggtcattccggaga gggagcctgagaaacgctacacatccaaggaaagcagcagcgcgcaaatccaactctgacacggaggtagtgacataataa caatccggcgctcattgctgtaattggaatgagtaactcaatccc
E16/M26	J2-5	258	cccctacttcaaaaacttctaagcccctcctatggtatccaagttgaaagataagttgaaacagatggccgcttcttattgggatgta ctattactaggaacttaattactactcgcgacccgaaaggccaacaataggccggaatcctatgatttccatgctaatgatcagaga gcgatgctgtcttggactactatcttcaaaagtaacgatgcccgaaaacacgaccggccaa
E16/M25	K1-7	106	tggaacattgttagagactaagcccaagaaccaaaagcatgatgtagtggaaattgcaactacattctcctctcagagaattgtg tcttcaaggg
E16/M25	K5-4	364	ccaattggaacgcttagttgctgaaccttccatcaacaactctcgaagaatgtagtgattcggaggactcgaacccgtggaaaaatt cgcctgacgcgcagagaagatggaagacgctagctctatggatattgacgaacgctgagtaggtctagacacccatggagatagcac atataatgtagtgaataatcactctgctttagttgccaactcctgacattactcaacgacgctaagcagcaactgagcggagagacta gcccgcgattctccgaaggcgctgctgcatcatatgcatgacacatcgacaacaacatccgcbggcca
E24/M25	L5-3	118	tgtctactcaaaagcttccatttggcgtgccgacacggattcagactcactgactcctgtggtgtagaattgaggacatagccgtcagg agtgcggcaagcttctgtgca
E24/M25	L7-2	163	tgtttaggcccctgtaagccatagagaagatgacttggatcgcagatgtgcataattgtagaagtgtgctgactatgagggtcca tacaaggtatccaagcctgtgtagatttggagacctcgactctgatacccataagctga
E24/M25	L8-3	303	tgcgctcggaggaaggggtaccaaatgtgatgacaacagccttccctagatgtagcattggtgctacttctcatggtgctgaatgatcat ggcaactgtcctccaaagactgaagaggccctagctgacgcttatttccaactgcbgtgacgaaactccgttgcgaacccctgagatgct tgaagccttagatgaaaattgacttctatgtagctgctatcgtatcgtgtagcgaagtggaacaaagtggagactaaaggctcaaaa ttcagcttggctttga
E16/M14	M1-4	122	attcacggatgtacagagggcaccagcgttccccaggagatcatcagttcaaaagatgatttccctggaattgcaatcaacgattag acttctgattgtagctgacaggg
E16/M14	M1-3	117	atggaaactgatacggtaacaagtttctgacgagaacaacatcaagaaacacgacgctccggttattgtagctgacacaa attgacggtagcttccctattgg
E17/M13	N1-4	107	agaaggcgtaggacatagagacttatctcactgacaactcagctgataaggagcagaataatcagacttggatgagactcttca ggttttgtgacg
E17/M13	N5-1	397	agccaaatcgaactcggagaatattccagaatggttcgaggtgagacagacatgaagcaggctcaacaacaacatagctttgt ctagaycagaacttgtttacatctttacatgctgttcttcccctcaaaagcttggtagggagaagccaaaggaaacactctgattgacara ggaactggaaacaaaggcgtgcatacctacagatgacccctgtcaccctcaaatgagccagtaatacaactgctataccttgttgc tccccagacacatgacagacagcaggaagctcagcactgagacatcttataccttgcacccaggagcctgagactcactata atccgcaaacctgctg

Tab. 9.1 Fortsetzung

cDNA-AFLP PK	Fragment-Klon Code	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')
E17/M13	N5-5	408	agagtgctgtaatagctactgatcagcgcctctgcgctgaggatgaacggggctaagcagatctccgaagctgacgagcgggagccctcac gggcccaccgctgcccagcctgatctctctggaaggttcagttggagcacgcctgtcgggaccgaagaagtggtgaactatccctgagc ggcgaaagcagagaaactctggtaggctcgaagcgaatcagctgcaaatcttctgctgactgggtatagggcgaagactaatc gaaccatctagtagctgttccctccgaagttccctcaggatagctggagccattacaggtttctatcaggtaaagccaatgattaggagcatt ggggacgcaacgctctcgactattctcaact
E17/M13	N6-2	362	aggaccagcgttgagtcttctcaagctgaaactaagaatgtggagatgaggcctctagtgtgtagctctgattggggaacag caggccaagcacgagcagattggctgtgtgatgttcccccgaaggtgccaaagaattgtccagtagccatgtttgcgctgacct caatttggccgttggcttggatgacacgagagttcacataattctagtgatctcagtggaagaagcaagagaagaagacagcttgca tgaactgttcgacgctccccctgactgtatctattggaactcattgacgatccattgtttgcccgggttgact
E20/M23	O1-2	179	ctacctcctattccaccactgatgtcttcaagaattttggcctgtatagaaggccttggaaaccaaatctactgacccaggagcac ctaaaccttggataggacaccgaaactgaaccagcagctctcaagctctatgaacgaaactccaagtccaaggaggcc
E20/M23	O2-3	448	ctggagccttcctctcctcgttcttccaaaggatgcaactctgggtgtgtgtagaccacagggaaccagatgtagtgcagctgacctt ccttgcagcgaggaaactaacacatgccaacacatctcttcaagccttggggcaagcatggggccaggatggatccaactgcatacac tccattcaactggtcatgaatcttctatcagcagagatctccagccttgcactcaaccccaatggctacccgagccggcggtata aggggttctcccagcagagacaagaacgatgtcttcaagggtctctgctcaactcagctcaggtcaagtgttagcttaccacagtag cctagccgtaaacgatgatactaggctgctgacactcagccctacagtctgtagtaacgcc
E20/M23	O3-1	257	tacggagctcaagatctatgcaaaagtacaactaattggtatgaagttcagaactatctagaataacctgccagtttcaaaaggca gcacaaccagcggcatgactgaagcagaatataatgatgttctgcaactcagcggagaaattctgtagatattcagcagatatactgtag atgaattgagaactttgtagaanaaacctgatacaattacaaggaggttaataatcctgacg
E14/M24	P1-5	317	atcggatgtagaagtcgcatagagcagatgtaaaagctgtgcctgctgaagttcctcctgctcgaagatccgctagatcggccggt tgcgaagttcagtaggtgactgaggcagcttcaagcttggatcaggcacacatcgattgtgaaactcgaaggagcatccaagactca gaagctcagtagacactcgtgtggcacctcctcaggcacacaatcaacacacatcagatgtcttcttgggaagttctcagcagctc gctgcaaaagttggttatggctcggaggga
E14/M24	P3-1	189	tcattcatgctgctcaactaattagatgacgagcatttggctacacttactctgtacctcagtttacccttccctccggtcagcagctca ccactcagcagcagcagctacttccctcagcctcagcctcagcggctgctcggccaactcctggccaagttaggtagcttttgcatt
E14/M24	P3-2	186	tcagcagctcgtgaagaagctccagaccactcctcgcctcgaagccgaggtggccagcctcctgctcttggatcatcagaggaggatc gaaggggagattggaccttcccttaccagcgtcggtagaaagcaatgatttgcaccaggggagcttcttgggtgcgaggttat
E14/M25	Q1-1	447	tggattagattgactctccaattaccagacataatgcgccggatgtttattattgtcactactccccttgcaggattgggttaatttgc gctcgtctccttcttggatgtgtgtagcgttttccagctcctcctcggaaatgaaacctaatctcgtcacccctcaacacatgtaggc ccctactccatcagaagttagaggcagaatgtgaatgctgctcggccacaagaagccatcgatcctcgagttatcatgaatcactc ggatcagcagcagagccacagctcagcttttataaataagcgcctcccaaaagctgggttgggtgacgctattagctcgaataacta cgttatccgattagcagctaccatcaaaacaaactaaactgtgaaactcgaatgctca
E23/M12	R1-4	74	tacagagtttggggcgatgagaagaatagggggtgacgggactgcatcggaattgtgatactctgaacgct
E23/M12	R2-1	74	tacagagtttggagcgatgagaagaatagggggtgacgggactgcatcggaattgtgatactctgaacgct
E13/M12	S1-7	252	actgaagtgaagtgaactttttgttcttggatgctctcctcttccagaccctcagcagccgagcagctgtagtggctgacactcga gctgtcctactcctcactataactagcccacttcttggagggttgggtttctatgcccccttgcaggctgaaagtgaggagcctaccg aagcgaacttactgagttctcaaaaactcaaacactgacctggccagctatttctt
E13/M12	S3-3	279	acgtgaggagtagtaccagcgttgatgactcttctgacaaagctgagtaactgtaatttctgactgactcagctcagcctcagcagccctg ctgtgcaaaagatttctcaggtgcaagcgtcaacacctcagaagttctgtacaaaatgctgctgtagctgactgaaatgcaagc cttctgtatgtacaatgtgcatcaaaagcttgcctcaactctgtgtagtacttggatatacactctgtcttactttagct
E13/M12	S5-7	271	acgctaaatttctgactatatttccatggaatttccgtaacaaccagtagtagaagaatcacagttgaaaacggcgaacacattagc gtgctacagaggcagtaacactcggagcagcactcgttccagcgtctatcggccggcaggcaccagtcgacagctcttctgacaggt cagttctgtcgcggagctccgtaccggctcgggtccgctcggccaggcagcagctcggccggtgtaaatgtct

Anhang

Tab. 9.2: Abgeleitete Primer der differentiellen cDNA-AFLP Fragmente

Primer	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemperatur (°C)
K11D08f	tgcccagtgctctgaatgt	60
K11D08rev	atgacgaggcatttggctac	60
K06D02f	ggctgctgacgttgcttatt	60
K06D02rev	tggacagggtgatactgtga	60
P15D17f	taggaagagccgacatcgaa	60
P15D17rev	ctcgaagacgatcagataccg	63
K24D18f	tgctgctatcctagaggtaatc	63
K24D18rev	tcagcagcacaaagaaccaac	60
K12D08f	aatcgagcatcatttctt	58
K12D08rev	aaaagagcgcatgacactt	58
K15D08f	acggaaggtgatacggttga	60
K15D08rev	ccattgatctcttctcggaa	58
P16D19f	acttgcctcatcaagcag	60
P16D19rev	cgctgaggatggttcataca	60
P17D19f	taggaagagccgacatcgaa	60
P17D19rev	ggcgcttagagcattgagag	62
P19D19f	aggcctgaccacatcacc	62
P19D19rev	agtgagacagctcggccat	62
P20D22f	gtttctgttccgggtgtgtt	60
P20D22rev	cagcaccagggtgaagattt	60
P25D24f	caggagaactggcaagaactg	63
P25D24rev	catccagatcgtctgctgac	62
P26D24f	acgtcgctatgaacgcttg	60
P26D24rev	aagactgtcaaggggatgtg	62
C2-2f_for	cggcaaaaacttctatcagg	60
C2-2f_rev	cccgaaaaggttgatgagt	60
E9-9r_for	cgaccagaagatgaaggag	62
E9-9r_rev	ccatgtctgatgacgatgt	60
F1-2f_for	gaagccctccagaatggtaa	60
F1-2f_rev	catgactggaaaactttggaga	59
F1-4f_for	aagcattcggtgtcatgta	58
F1-4f_rev	tgagcctttgagtatgatggtc	61
F6-1f_for	ggaccacacaagaatccaagg	62
F6-1f_rev	gacgtaattcaaatgccaga	59
J2-1f_for	ggttcacctcgattgatt	58
J2-1f_rev	aaggctcgtctctcg	59
K1-4f_for	ccctgtaagcaaaactctgt	61
K1-4f_rev	ggtacgtgagctgggtcag	65

Tab. 9.2 Fortsetzung

Primer	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemperatur (°C)
K5-4f_for	ttggaacctgtagttgctg	60
K5-4f_rev	cggtatgtttgttcggatg	60
L5-3f_for	tgtgctactcaaaaggcttcc	61
L5-3f_rev	caagacgttcggcgacct	62
L7-2f_for	gtttgaggccctctgtga	60
L7-2f_rev	tcagctattggggtatcaagg	60
L8-3f_for	tcgaggaagagggtacaaa	60
L8-3f_rev	caaaagccaagctgaattgt	57
M1-3f_for	aataggccaagctaccgtca	60
M1-3f_rev	tggatacggtaacaagtttgc	59
M1-4f_for	ttcaggagatgtacaggag	60
M1-4f_rev	tgttcaagctacatcacatcg	61
N1-4f_for	aggcgtaggaccataggag	65
N1-4f_rev	tgtgactgctaccaattcc	60
N5-1f_for	agccaaatcgaactctgga	58
N5-1f_rev	gagcagtttggcgaattat	58
N6-4f_for	gaataggtcaggacgttgc	62
N6-4f_rev	gacggttaagctccaaggaag	62
O1-2f_for	tacctgctcattccaaccac	62
O1-2f_rev	tcctggcacttggagtt	60
O2-3f_for	aggccttcactgctcct	62
O2-3f_rev	tcgtttacggctagggtctac	62
O3-1f_for	cggagcttcaagatgctatgt	61
O3-1f_rev	cgtcaggattatttaacctcttg	61
P1-5f_for	ggatgtagagaatccgatct	61
P1-5f_rev	caggcaccataacaccaactt	61
Q1-3f_for	tttattgatgatctccttagaa	56
Q1-3f_rev	attcagacaccatcagttacaa	59
S1-7f_for	tttttggcttcggatg	56
S1-7f_rev	cccaggtcaggtgtttgg	62
S3-3r_for	aggagtataccagcgttg	62
S3-3r_rev	agctgatcaaatgaagacagatg	61
S3-5r_for	gcaaggaagactttgctgct	60
S3-5r_rev	ccggaactattgttcttca	58

Anhang

Tab. 9.3: Primer für den STS-Marker (fett = M13-Sequenz)

Primer	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemperatur (°C)
UdpDf	atgctggaacttgctgagaac	60
UdpDr	aagcgggagtaatacaaacagc	60
UdpD_Insert_f	ttccacgtcacgactt gtgcatgacgattctggatg	72
UdpD_Insert_rev	acgaacccccaactatga	60

Tab. 9.4: Primer und Enzym für den CAPS-Marker

Primer	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemperatur (°C)
F6-1f_for	ggaccacacaagatccaagg	62
F6-1f_rev	gacgtaattcaaatcgccaga	59
Enzym: TaqI	5'-T ^Δ C G A-3' 3'-A G C ^Δ T-5'	Verdau bei 37°C

Tab. 9.5: Primer für die SNP-Marker (BioTEG = Biotinmarkierung)

Primer	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemperatur (°C)
PyF1K12D08	gtcatatgttgattggtgtagc	61
PyR1K12D08	BioTEG -aaaagagcgcgatgacactt	58
PyS1K12D08	ggattgggtgtagccaaa	55
PyF2K24D18	BioTEG -agtcgatggcaaacattgga	58
PyR2K24D18	cttgatttgatcccgaatgc	58
PyS2K24D18	cacagctgcccaatc	56
Pyro_K5_4f_fw	gtgctatactctccatgggtgtct	65
Pyro_K5_4f_rv	BioTEG -cagaagatggaagacgctagctc	65
Pyro_K5_4f_seq	actctccatgggtgtc	57
Pyro_N5_1f_fw	BioTEG -tggaggaagaacagcatgtaaagg	63
Pyro_N5_1f_rv	ttccagaatggttcgaggtga	61
Pyro_N5_1f_seq	tggttcgaggttgag	53
Pyro_S1_7f_fw	aatgctggaacatggtatgtatgt	59
Pyro_S1_7f_rv	BioTEG -tcccaatcatgtatagtcgatgaa	59
Pyro_S1_7f_seq	gtgcagggcatggee	62

10 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASG	akzessorische Speicheldrüse (accessory salivary gland)
BaMMV	<i>Barley mild mosaic virus</i>
BaYMV	<i>Barley yellow mosaic virus</i>
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
BTE	<i>Barley yellow dwarf</i> Translationselement
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	copy DNA
cDNA-AFLP	copy DNA-amplified fragment length polymorphism
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo
cM	Centimorgan
CYDV	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>
DAS-ELISA	Double-Antibody-Sandwich ELISA
DCINA	2,6 Dichlorisonikotinsäure
DH	Doppelhaploide
DHPR	Dihydrodipicolinatedehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraesigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EST	Expressed Sequence Tag
EtBr	Ethidiumbromid
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
g	Erdschwerebeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
GDC	Glycin Decarboxylase Komplex
GLR	Glutamatrezeptor
GPX	Glutathionperoxidase
h	Stunden
IAA	Indolessigsäure (Indol acetic acid)
IAP	Verweildauer (Inoculation access period)
(s)IR	(systemisch) induzierte Resistenz

Abkürzungen

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kLux	Kilolux
l	Liter
LB	Luria Bertoni (Luria Miller, Nährmedium)
LP	latente Phase
LPD	Dihydrolipoamiddehydrogenase
M	Molar
MAV, PAV...	Serotypen des BYDV
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnical Information
NDH	NAD(P)H-Dehydrogenase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDC	Pyruvatdehydrogenasekomplex
PEG	Polyethylenglycol
PK	Primerkombination
PR-Protein	Pathogenesis related Protein
PSI	Photosystem I
PTGS	Post transcriptional gene silencing
QTL	Quantitative trait loci
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RdRp	RNA-abhängige RNA Polymerase
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RIL	Rekombinante Inzuchtlinie
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxigen species (Reaktive Sauerstoffarten)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions PCR
RUBISCO	Ribulosebisphosphatcarboxylase
SAGs	Seneszenz-assoziierte Gene
SDS	Sodiumdodecylsulfat

sek	Sekunden
sgRNA	subgenomische RNA
siRNA	small interfering RNA
SNARE	Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptor
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOB	Super optimal broth (Komplexnährmedium)
SPS	Saccharosephosphatsynthase
SSR	Simple sequence Repeat
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA (Puffer)
TBIA	Tissue-blot Immunoassay
TE	Tris-EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TK	Transketolase
TKG	Tausendkorngewicht
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
U	Unit (Einheit)
ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UXS	UDP-D-Xyl Synthase
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VIGS	Virus induced gene silencing
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. hc Wolfgang Friedt danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftlichen Anregungen und die Betreuung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Frank Ordon für die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit am Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz des Julius Kühn-Institutes, die stete Unterstützung und vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Bei Frau Dr. Antje Habekuss bedanke ich mich für die Bereitstellung des Testmaterials und Hilfe bei allen virologischen Fragestellungen.

Frau Dr. Ilona Krämer danke ich für die hervorragende Unterstützung bei den molekularen Arbeiten.

Weiterhin danke ich Dr. Edgar Schliephake für seine Geduld bei entomologischen Fragen, Frau Dr. Doris Kopahnke und Dr. Dragan Perovic für stete Diskussionsbereitschaft, sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ‚Molekulare Marker‘ und des Institutes für die gute Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre.

Danke auch an meine Eltern und meine Familie für ihren Rückhalt und ihr Verständnis.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

