

# Ökologische Risiken gentechnisch veränderter virusresistenter Pflanzen<sup>1</sup>

Barbara E. G. Weber, Manuela Jäger und Claudia Eckelkamp

## Synopsis

### Ecological Risks of Genetically Engineered Virus Resistant Plants

Recent findings support some risk scenarios concerning transgenic plants which express viral sequences. In plants transformed with viral coat protein genes heterologous encapsidation between viruses belonging to the same or different virus groups was confirmed. Heterologous encapsidation of potyviruses was shown to be more effective in plants expressing potyviral coat proteins than in double infected non transgenic controls. Viral symptoms may be changed as well as aggravated and vector and host ranges may be altered by heterologous encapsidation. In particular, substantial damages may arise from heteroencapsidated viruses if coat protein transgenic plants were cultivated on a commercial scale. Further, recombination between cloned viral sequences and infecting RNA-viruses was found. In some cases recombinations were shown to alter viral symptoms, to broaden the host range or to enhance the virus fitness. Recombinant viruses may cause increased losses in cultivated plants and affect wild plant populations, too.

*plant viruses, virus resistant plants, heterologous encapsidation, recombination, vector transmission, plant host range*

*Pflanzenviren, virusresistente Pflanzen, heterologe Enkapsidierung, Rekombination, Vektorübertragung, Wirtspflanzenkreis*

## 1 Einleitung

Pflanzenviren sind für eine Reihe von Pflanzenkrankheiten verantwortlich, die zu Schäden und Ernteinbußen bei Nutzpflanzen führen. Ihre Schädlichkeit ist Anlaß für die Suche nach Bekämpfungsmethoden. Nur in manchen Fällen stehen wirksame Vorsorge- und Bekämpfungsmaßnahmen gegen virale Pflanzenkrankheiten zur Verfügung.

Die Gentechnik verbindet den molekularbiologischen Ansatz mit dem der Resistenzzüchtung. Bisher hing die Züchtung von Resistenzen ab, die in Pflanzen entdeckt worden waren. Ihrer Verwertung wird durch Kreuzungsbarrieren zwischen verschiedenen Pflanzenarten Grenzen gesetzt. Die gentechnische Strategie geht dagegen in den meisten Fällen von kurzen, einfach erscheinenden Genomabschnitten pathogener Pflanzenviren aus. Diese werden ins pflanzliche Genom integriert und können Resistenz gegen das homologe Virus und eventuell noch weitere, mit diesem meist verwandte Viren verleihen. Die Idee der gentechnisch vermittelten, vom Pathogen abgeleiteten Resistenz geht auf SANFORD & JOHNSTON (1985) zurück.

Im Zentrum der Risikoforschung zu virusresistenten transgenen Pflanzen steht die Frage, ob die gentechnischen Strategien zur Vermittlung von Virusresistenz molekulare und populationsdynamische Prozesse beeinflussen könnten mit dem Potential, pathogene Pflanzenviren sowie virale Pflanzenkrankheiten und Epidemien von erhöhter Schädlichkeit hervorzu- bringen.

## 2 Gentechnische Strategien zur Vermittlung von Virusresistenz

Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Strategien, um Pflanzen mit Hilfe der Gentechnik virusresistent zu machen. In den meisten Fällen werden die Pflanzen mit viralen Genomabschnitten transformiert. 94% der Pflanzenviren sind RNA-Viren, von denen man komplementäre DNA-Sequenzen (cDNA) kloniert (MATTHEWS 1991). Zumeist handelt es sich um Gene, die für virale Hüllproteine kodieren. Aber auch virale Replikations- und Transportproteingene sowie Satellitensequenzen werden ins Pflanzen-

<sup>1</sup> Die vorliegende Veröffentlichung baut auf eine 1996 erstellte, vom Umweltbundesamt / dem Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit geförderte Studie (ECKELKAMP, C., JÄGER, M., WEBER, B. E. G., 1997a: Risikolüberlegungen zu transgenen virusresistenten Pflanzen, Gutachten im Auftrag des Umweltbundesamtes, UBA-Texte 59/97) auf.

genom integriert.<sup>2</sup> Außerdem werden proteinkodierende virale Sequenzen in Antisense-Orientierung kloniert.<sup>3</sup> Noch relativ neu sind Forschungen zu den Einsatzmöglichkeiten von Proteasen, Proteaseinhibitoren und Ribozymen.<sup>4</sup> Ebenfalls einen neueren Ansatz stellt die Transformation mit nichtviralen Nukleinsäuresequenzen dar, die für tierische Antikörper, Interferone oder 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase kodieren (JÄGER & WEBER 1993, HENRY & al. 1995).

Im folgenden liegt der Schwerpunkt der Darstellung auf der Klonierung von viralen Hüllproteinen in Sense-Orientierung als der bisher am weitesten entwickelten und am häufigsten gewählten Methode zur Herstellung transgener virusresistenter Pflanzen.<sup>3</sup>

### 3 Grundlagen zur Beurteilung ökologischer Risiken gentechnisch veränderter virus-resistenter Pflanzen

Eine wichtige Grundlage zur Abschätzung der ökologischen Wirkungen transgener virusresistenter Pflanzen ist die Kenntnis der Funktion der klonierten viralen Nukleinsäuresequenzen. Im Fall des Hüllproteins (CP, coat protein) ist dies grundsätzlich die Verpackung der viralen Nukleinsäure. Darüber hinaus haben Hüllproteine, oft zusammen mit anderen Viruskomponenten, von Virus zu Virus verschiedene weitere Funktionen. Bei vielen Viren ist das CP für die Übertragung durch Vektoren essentiell und für die Vektor- und Wirtsspezifität (mit)bestimmend. Darüber hinaus kann das CP bei manchen Viren am Zell-zu-Zell- und am Langstreckentransport sowie regulierend an der Replikation beteiligt sein. Bei manchen Viren ist es – u.U. auch in Abhängigkeit von der Wirtspflanze – essentiell für einen systemischen Infektionsverlauf und beeinflusst maßgeblich die Krank-

heitssymptome der Wirtspflanze. Die verschiedenen Funktionen, die Hüllproteine haben können, sind im Einzelfall oft nicht vollständig bekannt und können auch nur selten bestimmten Abschnitten der Aminosäuresequenz zugeordnet werden (siehe 4.1.3.2).

Des Weiteren wird die Folgenabschätzung gentechnischer Strategien zur Vermittlung von Virusresistenz bei Pflanzen dadurch erschwert, daß die der Resistenz zugrundeliegenden Mechanismen unbekannt sind (ALLISON 1997). Es gibt offensichtlich je nach kloniertem CP-Gen und infizierendem Virus mehrere Mechanismen, die zu einer Störung des Infektionszyklus führen können (FITCHEN & BEACHY 1993, LINDBO & al. 1993, WILSON 1993, HACKLAND & al. 1994). Meist scheinen frühe Stadien des Infektionszyklus betroffen. In Abhängigkeit vom klonierten CP-Gen kann die Resistenz auf der CP-mRNA oder dem Hüllprotein beruhen.

Ferner ist die Kenntnis der Epidemiologie der Viruskrankheiten von Pflanzen eine Voraussetzung für eine Folgenabschätzung transgener virusresistenter Pflanzen in der Umwelt. An der Epidemiologie einer Viruskrankheit sind Kulturpflanzen, Vektoren und u.U. Wildpflanzen beteiligt. Die Vektoren der untersuchten Viren sind meist bekannt. Unklarheiten bestehen jedoch über die räumliche und zeitliche Reichweite der Übertragungswege. So stellten ZEYEN & BERGER (1990) fest, daß nichtpersistent übertragene Viren mit geringer Frequenz noch nach viel längeren Retentionszeiten, als bis dahin angenommen, übertragen werden können.<sup>5</sup> Bezüglich der Wirtspflanzenkreise von Viren bestehen große Wissenslücken, da Virusinfektionen von Wildpflanzen häufig nicht erfaßt werden, vor allem wenn sie symptomlos verlaufen. Wildpflanzen spielen jedoch in der Virusepidemiologie eine wichtige Rolle. Sie bilden eine Brücke für die schrittweise Verbreitung der Krankheit von Feld zu Feld, stellen mögliche Virusreservoir dar und sind für die Überwinterung und Vermehrung der Vektoren von Bedeutung.

Es ist auch wenig darüber bekannt, welche populationsdynamischen Folgen virale Erkrankungen von Pflanzen haben. Sie können sowohl Vor- als auch Nachteile in der intra- und interspezifischen Konkurrenz bringen. In manchen Fällen schützen Virusinfektionen vor anderen Pathogenen, Herbivoren oder Schädlingen.

<sup>2</sup> Satelliten-RNAs kommen bei manchen RNA-Viren zusätzlich zum Virusgenom vor. Sie kodieren für keine, für das jeweilige Virus essentiellen Funktionen, können jedoch die Schwere und Symptomatik des Infektionsverlaufs beeinflussen. Satelliten-RNAs benötigen ihrerseits für ihre Replikation, Verpackung und Transmission ein Helfervirus, mit dem jedoch keine signifikanten Sequenzübereinstimmungen bestehen.

<sup>3</sup> Antisense-Klonierungen führen dazu, daß die Proteinbiosynthese in umgekehrter Richtung verläuft, vom Ende der kodierenden Sequenz zu ihrem Anfang. Dadurch kann die Synthese des betreffenden Proteins in der normalen Orientierung (Sense-Orientierung) gehemmt werden.

<sup>4</sup> Ribozyme sind RNA-Moleküle mit RNA-spaltender enzymatischer Aktivität.

<sup>5</sup> Nichtpersistent übertragene Viren werden durch Vektoren aus nahe der Oberfläche gelegenen Gewebe der Pflanzen aufgenommen. Die Aufnahme ist bereits nach sehr kurzer Saugzeit möglich. Das Virus kann anschließend in der Regel sofort auf eine gesunde Pflanze übertragen werden. Die Übertragung ist bis einige Zeit nach der Virusaufnahme, d.h. innerhalb der sog. Retentionszeit, durch den Vektor möglich.

Schließlich wären zur Einschätzung des Risikos heterologer Enkapsidierungen in Hüllprotein-transgenen Pflanzen sowie viraler Rekombinationen in Pflanzen, in die virale Nukleinsäuresequenzen kloniert wurden, die Art und Häufigkeit dieser Ereignisse in nichttransgenen Pflanzen eine wichtige Beurteilungsgrundlage. Wie unter 4.1 und 4.2 dargestellt, fehlt diese ebenfalls weitgehend.

#### 4 Ökologische Risiken transgener virus-resistenter Pflanzen

Allgemein werden vor allem drei Risiken im Zusammenhang mit transgenen Pflanzen, die mit viralen Nukleinsäuresequenzen transformiert wurden, diskutiert.

- 1) Es können Synergismen zwischen dem klonierten Gen bzw. Genprodukt und infizierenden Viren auftreten. Pflanzen, in deren Genom virale genetische Information integriert wurde, sind meist gegen das Virus, von dem die klonierte Sequenz stammt, und mit diesem verwandte Viren resistent, nicht jedoch gegen nicht verwandte Viren. Bisher ist kaum untersucht worden, in welchem Maße die Pflanzen Synergismen mit heterologen Viren zeigen (PALUKAITIS & KAPLAN 1997). In manchen Fällen wurden solche Effekte bei der Transformation mit intakten viralen Replikase- und Transportproteingenen beobachtet (TASCHNER & al. 1991, COOPER & al. 1995). Virale Synergismen sind auch von Mischinfektionen nichttransgener Pflanzen bekannt.
- 2) Des weiteren können in Pflanzen, die mit einem viralen Hüllproteingen transformiert wurden, heterologe Enkapsidierungen auftreten. Dabei wird die Nukleinsäure eines Virus, dessen Vermehrung durch das klonierte Hüllprotein zumindest nicht vollständig unterbunden wird, teilweise oder ganz durch rekombinantes CP verpackt. Heterologe Enkapsidierungen treten auch in Mischinfektionen verschiedener Viren auf. Sie können virale Eigenschaften, die durch das Hüllprotein determiniert oder beeinflusst werden, verändern, wie den Vektor- und Wirtsbereich und den Krankheitsverlauf.
- 3) Schließlich können Rekombinationen zwischen der in Pflanzen klonierten viralen genetischen Information und infizierenden Viren stattfinden. RNA-Rekombinationen sind prinzipiell möglich und treten auch in Mischinfektionen verschiedener Viren auf. Sie können zu Viren mit genetisch verankerter erhöhter Fitness und Pathogenität sowie verändertem Wirtsspektrum führen.

#### 4.1 Heterologe Enkapsidierung

##### 4.1.1 Heterologe Enkapsidierung in nichttransgenen Pflanzen

Heterologe Enkapsidierungen wurden häufiger zwischen Viren derselben Virusgruppe als zwischen Viren aus verschiedenen Virusgruppen festgestellt. Sie treten aber auch zwischen nicht verwandten Viren auf. Heterologe Enkapsidierungen scheinen bei verschiedenen Virusgruppen unterschiedlich verbreitet zu sein und unterschiedlich spezifisch zu verlaufen. Bei Potyviren kommt es z.B. relativ leicht zu heterologen Enkapsidierungen zwischen Viren dieser Gruppe. Luteo- und Nepoviren zeigen dagegen besonders geringe Spezifität bezüglich der verpackten RNA (COOPER & al. 1994, MAISS & al. 1994). Diese Befunde sind jedoch durch die unterschiedlich intensive Erforschung verschiedener Viren(gruppen) beeinflusst.

Die heterologe Enkapsidierung kann einem transmissionsdefizienten Virus zur Übertragung durch Vektoren verhelfen.<sup>6</sup> BOURDIN & LECOQ (1991) nehmen an, daß heterologe Enkapsidierungen z.B. die Übertragung und Aufrechterhaltung nichttransmissibler Virusisolate in der Umwelt erklären könnten. Von größerer ökologischer Bedeutung ist diesen Autoren zufolge aber wahrscheinlich der Vektorwechsel, durch den einem Virus ein anderer Wirtsbereich erschlossen werden kann.

Verschiedene transmissionsdefiziente Viren werden in Mischinfektionen durch heterologe Enkapsidierung vektorübertragbar. So kann das *Lettuce speckles mottle virus* (LSMV) prinzipiell einen großen Kreis von Wirtspflanzen infizieren. Es ist jedoch in seiner Verbreitung begrenzt, weil es allein nur mechanisch übertragbar ist. In Mischinfektionen mit dem Westlichen Rübenvergilbungsvirus (*Beet western yellows Luteovirus*, BWYV) kann es zu heterologer Enkapsidierung von LSMV kommen. LSMV wird dann durch *Myzus persicae* übertragbar und erschließt sich auf diese Weise einen größeren Wirtskreis (FALK & al. 1979).

Virusgenome und sekundäre virusassoziierte RNA-Spezies, die wie Umbraviren und Satelliten-RNAs für ihre Verpackung auf ein heterologes CP angewiesen sind und erst dadurch vektortransmissibel werden, können evolutionär und ökologisch erfolgreich sein.

Wirtskreiserweiterungen können sowohl Nutzpflanzen als auch Wildpflanzen betreffen und somit landwirtschaftlich und ökologisch relevante Folgen haben.

<sup>6</sup> Transmission: Vektorübertragung

#### 4.1.2 Heterologe Enkapsidierungen in Hüllprotein-transgenen Pflanzen

Heterologe Enkapsidierungen wurden auch in CP-transgenen Pflanzen gefunden, und zwar zwischen RNA und Hüllproteinen von Viren derselben Virusgruppe im Fall der Potyviren (FARINELLI & al. 1992, LECOQ & al. 1993, MAISS & al. 1994) wie auch zwischen Viren verschiedener Gruppen. So wird das Gurkenmosaikvirus (*Cucumber mosaic Cucumovirus*, CMV) in Tabakpflanzen durch transgen exprimiertes CP des Luzernmosaikvirus (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) verpackt (CANDELIER-HARVEY & HULL 1993).

Bisher gibt es nur eine systematische Untersuchung zur Frage, ob heterologe Enkapsidierungen in CP-transgenen Pflanzen häufiger vorkommen als in mischinfizierten Pflanzen und ob eventuell auch neue heterologe Enkapsidierungen stattfinden, die in Mischinfektionen nicht auftreten (MAISS & al. 1994). Dabei wurden heterologe Enkapsidierungen durch das CP des Scharkavirus (*Plum pox Potyvirus*, PPV) in transgenen und doppelt infizierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen verglichen. Die Rate heterologer Enkapsidierungen der untersuchten Potyviren war in den transgenen Pflanzen stark erhöht. Die mit Potyviren nicht verwandten untersuchten Vertreter der Potex-, Tobamo- und Furovirusgruppe wurden weder in den transgenen noch in den nichttransgenen Pflanzen durch PPV-CP heteroenkapsidiert.

In den mit Potyviren und Viren anderer Virusgruppen doppelt infizierten nichttransgenen Versuchspflanzen wurden bis zu 4,2% mit PPV-Antiserum markierte Partikel als unspezifische Reaktion eingestuft. Sollten entsprechende Ergebnisse bei den mit verschiedenen Potyviren doppelt infizierten Pflanzen ebenfalls eine unspezifische Reaktion anzeigen, wären bei drei der sieben untersuchten Potyviren heterologe Enkapsidierungen nur in den transgenen und nicht in den nichttransgenen Pflanzen aufgetreten.

#### 4.1.3 Risikoszenarien zu heterologen Enkapsidierungen

##### 4.1.3.1 Veränderter Infektionsverlauf

Wenn das Hüllprotein eines organ- oder gewebespezifischen Virus in einer transgenen Pflanze in allen Pflanzenteilen exprimiert wird, kann ein anderes Virus, dessen Infektion auf andere Gewebe oder Organe beschränkt ist, mit diesem CP wechselwirken, mit dem es normalerweise nicht in Kontakt kommt. Dadurch könnte die Organ- oder Gewebespezifität von Viren verändert oder aufgehoben werden, und es könnten neue Schadbilder resultieren.

Das Hüllprotein ist in vielen Fällen für den Langstreckentransport im Phloem essentiell. Die Geschwindigkeit einer systemischen Infektion kann ebenfalls CP-abhängig sein und ist manchmal ent-

scheidend für ihren Erfolg. Durch heterologe Enkapsidierung mit transgen exprimiertem CP könnte der Virustransport komplementiert und die systemische Infektion beschleunigt werden. Außerdem könnte es einem Virus auch die systemische Verbreitung in Wirtspflanzen ermöglichen, in denen es sonst dazu nicht in der Lage ist.

Bisher wurden zwar bei einigen Viren (z.B. beim Trespenmosaikvirus, *Brome mosaic Bromovirus*, BMV) Bereiche des Hüllproteins identifiziert, die für eine systemische Infektion essentiell sind, jedoch können dies in Abhängigkeit von der Wirtspflanze unterschiedliche Bereiche sein (FLASINSKI & al. 1995). Ein biologisches Containment durch die Klonierung entsprechend mutierter CP-Gene scheint damit nicht möglich.

##### 4.1.3.2 Veränderte Vektorübertragung und Wirtspflanzenkreise

In CP-transgenen Pflanzen kann es durch heterologe Enkapsidierungen zu einem Vektorwechsel kommen, der den betreffenden Viren Zugang zu neuen Wirtspflanzen verschaffen und die Epidemiologie einer durch diese Viren hervorgerufenen Krankheit beeinflussen könnte. Heterologe Enkapsidierungen werden häufig für »Sackgassen« ohne erhebliche Risiken gehalten. Ein heterolog enkapsidiertes Virus kann dieser Einschätzung zufolge, wenn es auf neue Wirtspflanzen übertragen wird, diese zwar u.U. infizieren. Eine weiterreichende Aktivität und Verbreitung des Virus außerhalb seines ursprünglichen Wirkungskreises soll aber ausgeschlossen sein, da es nach einem Vermehrungszyklus wieder in sein eigenes CP eingehüllt würde.

Jedoch kann auch eine vorübergehende Ausdehnung des Wirkungskreises zu ernstzunehmenden Schäden führen, wenn das heteroenkapsidierte Virus in der neuen Wirtspflanze eine neue Erkrankung hervorruft, gegen die keine Resistenz entwickelt wurde. Da in einer Region häufig die gleichen Kulturpflanzen angebaut werden, kann der Infektionsweg sowohl in einer als auch mehreren Vegetationsperioden wiederholt besprochen werden. Besonders betroffen könnten mehrjährige Kulturen sein.

Wird ein Teil der Nachkommen eines Virus A durch das CP eines Virus B verpackt, würde die Nachkommenschaft des Virus A nicht nur durch den eigenen Vektor, sondern zusätzlich auch durch den des Virus B übertragen. Dies kann eine schnellere Verbreitung des Virus A zur Folge haben. Außerdem ist seine Transmission auch dann möglich, wenn sein Vektor noch nicht vorhanden ist, wohl aber der des Virus B (ROCHOW 1977). Infektionen, die früh in der Vegetationsperiode einer Wirtspflanze erfolgen, führen häufig zu stärkeren Schäden als späte Infektionen (MATTHEWS 1991).

Eine Möglichkeit zu fortgesetzten heterologen Enkapsidierungen besteht, wenn in einer Region ver-

schiedene Kulturpflanzen angebaut werden, die rekombinante CP-Gene exprimieren. Würde ein Virus A in einer CP-transgenen Pflanzenart von einem Hüllprotein B heterolog enkapsidiert und durch einen neuen Vektor in eine andere transgene Pflanzenart übertragen, die ebenfalls das Hüllprotein B exprimiert, könnte sich die heterologe Enkapsidierung und damit die veränderte Vektorübertragung des Virus A weiter fortsetzen (RISSLER & MELLON 1993). Der Anbau verschiedener Kulturpflanzen mit unterschiedlichen rekombinanten CP-Genen könnte zu schwer abschätzbaren Interaktionen zwischen heteroenkapsidierten Viren und weiteren transgen exprimierten Hüllproteinen führen (MAISS & al. 1994).

Es ist auch vorstellbar, daß ein Virus in einer neuen Wirtspflanze auf ein neues Helfervirus oder einen neuen Vektor trifft. Dadurch könnte eine weitere Transmission gewährleistet sein, und das Virus könnte sich in einer neuen ökologischen Nische etablieren (DE ZOETEN 1991).

Bei den wenigsten Virusgruppen sind die Sequenzen des CP bekannt, die für eine Vektorübertragung erforderlich sind. Eine Ausnahme scheinen die Hüllproteine der Potyviren zu sein. Ein DAG-Motiv der Aminosäuresequenz wurde als essentiell für die Blattlausübertragung charakterisiert. Das Fehlen dieses Motivs führt allerdings nicht in jedem Fall zum Verlust der Blattlausübertragbarkeit (LOPEZ-MOYA & al. 1995). Darüber hinaus benötigen Potyviren für die Blattlausübertragung ein virales Protein, die Helferkomponente. PIRONE (1981) und SAKO & OGATA (1981) zeigten, daß eine Komplementation der Helferkomponenten in manchen Potyviruskombinationen möglich ist. Daher ist anzunehmen, daß auch heterologe Enkapsidierungen zwischen Potyviren deren Transmissionseigenschaften verändern können.

Bei den daraufhin untersuchten Luteoviren ist die Virushülle aus zwei verschiedenen Proteinen aufgebaut: dem CP und einem höhermolekularen »Readthrough«-Protein, das dadurch entsteht, daß bei der Translation ein Stopcodon am Ende des CP-Sequenz unterdrückt wird. Beide Proteine sind an der Transmission durch Vektoren beteiligt (BRAULT & al. 1995, WANG & al. 1995, CHAY & al. 1996) und anscheinend auch an der Vektorspezifität (GILDOW & GRAY 1993, JOLLY & MAYO 1994, CHAY & al. 1996). Daher könnten heterologe Enkapsidierungen auch bei Luteoviren zu einer Veränderung der Vektor- und Wirtsspezifität führen.

## 4.2 Rekombination

### 4.2.1 Rekombination in nichttransgenen Pflanzen

Erst vor kurzer Zeit wurde nachgewiesen, daß RNA-Viren rekombinieren können. *De novo* RNA-Rekom-

bination wurde zunächst bei tierischen Picornaviren (ZIMMERN 1988) und 1986 auch bei Pflanzenviren gefunden (BUJARSKI & KAESBERG 1986). Später wurden Rekombinationen bei weiteren RNA- und auch bei DNA-Pflanzenviren festgestellt. Inzwischen wird Rekombinationen, und insbesondere nichthomologen Rekombinationen, eine wichtige Rolle in der Evolution der RNA-Viren zugesprochen (SIMON & BUJARSKI 1994). Die Genome von RNA-Viren sind modular organisiert: Verschiedene, in ihrer Sequenz und Funktion ähnliche Genomabschnitte treten in unterschiedlichen Anordnungen und Kombinationen bei morphologisch und in ihren pathogenen Eigenschaften verschiedenen Viren auf (GOLDBACH 1990). Diese Genomorganisation wird auf den Austausch von Genomabschnitten im Lauf der Evolution zurückgeführt (SIMON & BUJARSKI 1994). Deshalb ist das Konzept von Arten, Gattungen und Familien, die den Virustypen, -untergruppen und -gruppen entsprechen, nicht allgemein akzeptiert und die getroffene Einteilung nicht widerspruchsfrei (MATTHEWS 1991). Die Mechanismen der viralen Rekombination sind noch wenig erforscht und bei RNA-Pflanzenviren erst teilweise geklärt. Es treten homologe, aberant homologe und nichthomologe Rekombination auf (LAI 1992).

Es ist noch weitgehend ungeklärt, wie häufig Rekombinationen bei Pflanzenviren stattfinden (GIBBS & al. 1997). Anscheinend unterscheiden sich verschiedene Virusgruppen, aber auch verschiedene Viren einer Gruppe hinsichtlich der Rate intraspezifischer Rekombination (REVERS & al. 1996, CANDRESSE & al. 1997). Möglicherweise spiegeln die unterschiedlichen bisher ermittelten Rekombinationshäufigkeiten tatsächliche Unterschiede im erreichten evolutionären Gleichgewicht der Viren wider. In vielen Fällen dürften sie jedoch durch den Effekt fehlender systematischer Erhebungen überlagert sein.

Die Sequenzanalyse etlicher rezenter Viren weist darauf hin, daß sie aus interspezifischer Rekombination hervorgegangen sind. Das Genom des *Cucurbit aphid-borne yellow Luteovirus* (CABYV) enthält z.B. einen Abschnitt, der vermutlich aus dem Erbsen-entationmosaikvirus (*Pea enation mosaic Virus*, PEMV) stammt. Die wahrscheinlich durch zwei Rekombinationsereignisse transferierte Sequenz kodiert für einen Bereich des »Readthrough«-Proteins, von dem angenommen wird, daß es die Vektorspezifität beeinflusst (siehe 4.1.3.2.). CABYV ähnelt jedoch hinsichtlich der Vektorspezifität mehr dem Westlichen Rübenvergilbungsvirus (*Beet western yellows Luteovirus*, BWYV), von dem die anderen Abschnitte seines »Readthrough«-Gens abzustammen scheinen, als PEMV (GIBBS & COOPER 1995). Hinweise auf interspezifische Rekombination finden sich des weiteren bei Tobra-, Luteo- und Nepoviren (ANGENENT & al. 1989, SIMON & BUJARSKI 1994, LE GALL & al.

1995). Sequenzanalysen legen außerdem nahe, daß Pflanzenviren auch Sequenzen ihrer Wirte in ihr Genom aufnehmen können (Übersicht bei ECKELKAMP & al. 1997b). Bei Tombusviren wiesen WHITE & MORRIS (1994) interspezifische Rekombination *in vivo* in Pflanzenprotoplasten nach.

Virusrekombinationen können zu einer Erhöhung der Fitness führen. Dafür spricht das Vorkommen von Virusrekombinanten in der Umwelt. Experimentell wurde eine Fitnesserhöhung durch interspezifische Rekombination zwischen den Cucumoviren Gurkenmosaik- (CMV) und Tomatenaspermievirus (*Tomato aspermy virus*, TAV) gezeigt. Die rekombinierten Viren vermehrten sich in den untersuchten Pflanzen rascher als die Ausgangsviren (FERNANDEZ-CUARTERO & al. 1994). Ein Selektionsdruck, der die Bildung von Rekombinanten mit erhöhter Fitness begünstigte, ist in diesem Experiment nicht ersichtlich.

Kürzlich wurde die Entstehung eines DNA-Virus mit erhöhter Virulenz durch Rekombination im Feld beschrieben. Zwei Rekombinationsereignisse zwischen zwei Cassavamosaikviren (*African* und *East-african Cassava mosaic Geminivirus*, ACMV und EACMV), die als Vertreter verschiedener Spezies gelten, führten zu einem Virus, das seit ca. 1988 eine besonders verheerende Form der Cassavamosaikkrankheit in Uganda hervorruft (ZHOU & al. 1997).

#### 4.2.2 Rekombination in transgenen Pflanzen

LOMMEL & XIONG (1991) zeigten als erste, daß RNA-Pflanzenviren mit der mRNA von in Pflanzen klonierten viralen Sequenzen rekombinieren können. Sie führten mit *Red clover necrotic mosaic Dianthovirus* (RCNMV) ähnliche Versuche durch wie später GREENE & ALLISON (1994). In beiden Fällen wurden die transgenen Pflanzen mit defekten Viren infiziert, die erst durch Rekombination mit der klonierten Wildtypsequenz zu einer systemischen Infektion der Pflanzen befähigt wurden. Versuchsarrangements mit ebenfalls einem deutlichen Selektionsdruck ermöglichten den Nachweis von Rekombinationen des DNA-Virus Blumenkohlmosaikvirus (*Cauliflower mosaic Caulimovirus*, CaMV) mit in Pflanzen klonierten Genomabschnitten dieses Virus (GAL & al. 1992, SCHOELZ & WINTERMANTEL 1993). MAISS & al. (1997) wiesen Rekombination von Potyviren mit transgen exprimierten potyviralen Sequenzen in Pflanzen unter Selektionsdruck nach.

WINTERMANTEL & SCHOELZ (1996) zeigten jedoch, daß auch bei nur mäßigem oder schwachem Selektionsdruck Virusrekombinanten in transgenen Pflanzen gebildet werden können. Sie arbeiteten mit *Nicotiana bigelovii* Pflanzen, die mit dem Gen VI eines CaMV-Stammes transformiert worden waren, das CaMV die systemische Infektion dieser und anderer Wirtspflanzen erlaubt. Die transgenen Pflanzen

wurden mit einem anderen CaMV-Stamm infiziert, der ebenfalls zu ihrer systemischen Infektion befähigt ist. Insofern lag kein ersichtlicher Selektionsdruck vor, der Rekombinationen oder Rekombinanten begünstigen würde. Dennoch wurden in 13% der untersuchten Pflanzen Virusrekombinanten gefunden, die zudem fitter waren als das Wildtypvirus, von dem sie abstammen. Eine ähnliche hohe Rekombinationsfrequenz zeigte ein chimäres CaMV, das die transgenen Pflanzen systemisch infizieren kann, weil es durch das rekombinante Genprodukt komplementiert wird. In dieser Versuchsarrangements liegt nur ein mäßiger Selektionsdruck vor.

Durch Rekombination können sich außer der Fitness der Wirtsbereich sowie die durch die Viren verursachten Symptome verändern. Zwei der von SCHOELZ & WINTERMANTEL (1993) isolierten Rekombinanten hatten einen im Vergleich zum Ausgangsstamm erweiterten Wirtsbereich. Eine der Rekombinanten rief bei Rüben abgeschwächte Symptome hervor. Die Autoren halten jedoch prinzipiell für möglich, daß rekombinierte Viren schlimmere Symptome hervorrufen als die Viren, die ursprünglich die transgenen Pflanzen infizierten. Mutanten des *Cowpea chlorotic mottle Bromovirus* (CCMV) mit einer Deletion im Hüllproteingen konnten durch Rekombination in transgenen *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die das CCMV-Hüllproteingen exprimierten, diese Pflanzen wieder systemisch infizieren. Drei von sieben Rekombinanten verursachten aber im Vergleich zum Wildtyp veränderte Symptome auf Kuhbohnenpflanzen (ALLISON 1997).

Die mit CaMV durchgeführten Experimente sind insofern auch für RNA-Viren von Bedeutung, als die Rekombination bei diesen DNA-Viren zwischen zwei RNA-Molekülen stattfand, die durch die reverse Transkriptase der CaMV synthetisiert wurden. Die Rekombinationsfrequenz in den von WINTERMANTEL & SCHOELZ (1996) durchgeführten Experimenten mit CaMV lag deutlich höher als in denen von GREENE & ALLISON (1994), die das RNA-Virus CCMV untersuchten. MAISS & al. (1997) fanden dagegen in ihren Versuchen mit RNA-Potyviren ebenfalls hohe Rekombinationsraten.

Interspezifische und nichthomologe Rekombinationen zwischen infizierenden Viren und in Pflanzen klonierten Virussequenzen wurden bisher nicht nachgewiesen, sie treten jedoch zwischen RNA-Viren auf und haben zur Evolution der rezenten Viren beigetragen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß sie in transgenen Pflanzen vorkommen.

#### 4.2.3 Risikoszenarien zu Rekombinationen

Wenn es sich um Hüllprotein-transgene Pflanzen handelt, sind durch Rekombination infizierender Viren mit den klonierten Sequenzen genetisch veran-

kerte Veränderungen des Infektionsverlaufs, des Vektoren- und Wirtspflanzenspektrums möglich (vergl. 4.1.3). Außerdem können durch Rekombinationen in Pflanzen, die virale Sequenzen exprimieren, Viren mit gesteigerter Fitness entstehen.

Eine Etablierung rekombinierter Viren in der Umwelt setzt zudem nicht in jedem Fall eine im Vergleich zu den Ausgangsviren erhöhte Fitness voraus. Die mechanische oder durch Vektoren vermittelte Übertragung sollte dazu führen können, daß einzelne rekombinierte Viren isoliert werden, der direkten Konkurrenz mit den Ausgangsviren entkommen und sich eine ökologische Nische erobern können (GIBBS 1994). Auf diese Weise können Virusrekombinationen in transgenen Pflanzen, die virale Sequenzen exprimieren, auch dann ökologisch relevant werden, wenn sie nur selten stattfinden. Außerdem können Fitness-reduzierende Rekombinationen im Lauf der weiteren Virusevolution kompensiert werden.

Die rekombinierten Viren könnten sowohl Kultur- als auch Wildpflanzen schädigen.

## 5 Wahrscheinlichkeit von heterologen Enkapsidierungen und viralen Rekombinationen

Durch die dauernde Verfügbarkeit viraler Nukleinsäuren und Genprodukte in transgenen Pflanzen, die mit viralen Nukleinsäuresequenzen transformiert wurden, und durch die Verbreitung dieser Pflanzen ist eine neue Situation gegeben. In der Natur sind Mischinfektionen einer Pflanze mit verschiedenen Viren zwar häufig, es gibt aber nur wenig direkte Hinweise darauf, daß zwei verschiedene RNA-Viren gleichzeitig in einer Pflanzenzelle repliziert werden. Vielmehr bewegen sich Viren im Lauf einer systemischen Infektion von Zelle zu Zelle. So könnten multiple Infektionen mehrere Einzelinfektionen darstellen, welche die Pflanzen zu verschiedenen Zeiten durchlaufen (ALLISON 1995). Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, daß verschiedene Pflanzenviren bzw. ihre Komponenten im Rahmen natürlicher Mischinfektionen tatsächlich aufeinandertreffen, reduziert. Zudem findet die Vermehrung einiger Viren anscheinend innerhalb von abgegrenzten Bereichen des Zytoplasmas statt (MATTHEWS 1991). Dadurch bestehen bei natürlichen Mischinfektionen wahrscheinlich Barrieren, die die Möglichkeit von heterologen Enkapsidierungen und Rekombinationen einschränken. Bei Virusinfektionen von transgenen, mit viralen Nukleinsäuresequenzen transformierten Pflanzen dürften diese Barrieren zum Teil wegfallen. Auch dadurch, daß transgene Pflanzen die klonierte virale genetische Information während der ganzen Vegetationsperiode und im allgemeinen in allen Geweben exprimieren, können sonst voneinander getrennte virale Nukleinsäuren und Genprodukte in Kontakt kommen.

Des weiteren sind Viren durch ihre unterschiedliche Vektor- und Wirtsspezifität und dadurch, daß in verschiedenen geographischen Regionen verschiedene Virusvarianten entstehen und vorherrschen, voneinander isoliert. Mit der weltweiten Verbreitung transgener, virusresistenter Pflanzen können virale Nukleinsäuresequenzen und Genprodukte in Regionen gelangen, in denen sie vorher nicht anzutreffen waren. Eine bestimmte virale Sequenz wird kloniert, die transgene Pflanze dürfte jedoch auch in Regionen angebaut werden, in denen andere Stämme des Virus, aus dem die klonierte Sequenz stammt, endemisch sind. Außerdem werden zunehmend mehrfach transformierte Pflanzen konstruiert, die mehrere Virusresistenzgene oder ein Virusresistenzgen zusammen mit anderen Trans-Genen enthalten. Es ist damit zu rechnen, daß diese Pflanzen auch in Gebieten angebaut werden, in denen Viren oder Virusisolate, von denen die resistenzvermittelnde/n klonierte/n Sequenz/en stammt/stammen, nicht vorhanden sind. Auf diese Weise würden Begegnungen viraler Nukleinsäuren und Genprodukte möglich, zu denen es bisher nicht kam.

Vor diesem Hintergrund sind heterologe Enkapsidierungen in CP-transgenen Pflanzen wahrscheinlicher als in nichttransgenen Pflanzen und könnten zwischen Virusgenomen und Hüllproteinen erfolgen, zwischen denen sie bisher nicht beobachtet wurden. Experimente mit Potyviren und transgenen Pflanzen mit einem klonierten potyviralen CP-Gen bestätigen diese Annahme (4.1.2). Ebenso ist wahrscheinlich, daß in transgenen Pflanzen häufiger Virusrekombinationen entstehen als in nichttransgenen Pflanzen, und daß neue Rekombinationsmöglichkeiten realisiert werden.

Unterschiede in der Rekombinationshäufigkeit zwischen verschiedenen Viren sollen auf der unterschiedlichen Affinität des Replikasekomplexes zur Matrize beruhen. Demnach ist anzunehmen, daß die Wahrscheinlichkeit, mit der in Pflanzen klonierte virale Nukleinsäuresequenzen rekombinieren, nicht von dem Virus abhängt, von dem diese Sequenz stammt, sondern vom infizierenden Virus (ALLISON 1995). Infolgedessen läßt sich von der Rekombinationseigenschaften eines Virus nicht auf die Rekombinationseigenschaften einer in Pflanzen klonierten Nukleinsäuresequenz dieses Virus schließen.

## 6 Konsequenzen

Es werden verschiedene Maßnahmen diskutiert, um die ökologischen Risiken transgener Pflanzen mit rekombinanten viralen Nukleinsäuresequenzen zu verringern. Entsprechende Vorschläge von verschiedenen AutorInnen hatten bisher keinen Einfluß auf die Genehmigung von Freisetzungsversuchen und Markt-

zulassungen. Im August 1997 wurden auf einer Tagung der US-amerikanischen Genehmigungsbehörde USDA (United States Department of Agriculture) Sicherheitsmaßnahmen vorgeschlagen und diskutiert, wie die Begrenzung klonierter Sequenzen auf die für den Zweck notwendige Länge, das Vermeiden von Trans-Genen, die zur Synthese funktionaler viraler Proteine führen, sowie von Sequenzen, die die Virusreplikation auslösen (KLEINER 1997). Die meisten bereits zugelassenen oder in der Entwicklung befindlichen transgenen virusresistenten Pflanzen wurden allerdings mit funktionalen Hüllproteingenen transformiert, die die 3' untranslatierte Erkennungsregion für den Replikationskomplex einschließen, wodurch Rekombinationen mit infizierenden Viren begünstigt werden sollen.

Maßnahmen, die die Wahrscheinlichkeit von Synergismen, heterologen Enkapsidierungen und Rekombinationen in virusresistenten transgenen Pflanzen reduzieren, sind unter Sicherheitsaspekten wünschenswert. Jedoch sind auch Pflanzen, die mit Nukleinsäuresequenzen transformiert wurden, die für nicht funktionale Proteine kodieren, nicht risikolos. Beispielsweise wird eine Entfernung des DAG-Triples aus klonierten potyviralen CP-Trans-Genen vorgeschlagen. Dies würde jedoch nicht in jedem Fall die Vektortransmission heteroenkapsidierter Viren unterbinden (siehe 4.1.3.2). Außerdem würden Gefahren, die von der Rekombination klonierter CP-Sequenzen mit heterologen Viren ausgehen, weiterhin bestehen. Im übrigen sind bisher die Vektorübertragbarkeit und -spezifität vermittelnden Sequenzen bei den meisten Viren nicht bekannt.

ALLISON (1997) diskutiert den Vorschlag, die 3' untranslatierten Regionen (3' UTR) von Virusgenomen nicht zu klonieren, um die Rekombinationshäufigkeit zu senken. In mit RNA-Viren infizierten Pflanzen wird jedoch ein geringer Prozentsatz von chimären Viren gefunden, die wahrscheinlich aus Rekombinationen mit 3'UTR-loser Wirts-RNA hervorgegangen sind. Der Autor geht deshalb davon aus, daß 3'UTR-lose Trans-Genkonstrukte lediglich seltener an Virusrekombinationen beteiligt wären, daß ihre Beteiligung daran aber nicht ausgeschlossen wäre.

Somit sind noch viele Fragen zu den vorgeschlagenen Sicherheitsmaßnahmen offen, die vor der Freisetzung und insbesondere Vermarktung virusresistenter transgener Pflanzen geklärt werden müßten, um zumindest deren vermeidbare ökologische Risiken zu verringern. Darüber hinaus dürften spezifische Risikoabschätzungen und Maßnahmen zur Risikoversorgung aufgrund der Komplexität der Situation im Freiland in der Praxis auf kaum überwindbare Schwierigkeiten stoßen. Es fehlen die erforderlichen Kenntnisse über die Funktionen der viralen Genomabschnitte, die Mechanismen der gentechnisch vermittelten Resistenz und die Frage, welche Pflanzenviren(stämme)

mit den transgenen Kulturpflanzen und auch ihren Kreuzungspartnern in einer konkreten Umgebung in Kontakt kommen werden und welche Wechselwirkungen dabei zu erwarten sind. Vor diesem Hintergrund und in Hinblick auf das Risiko, daß mit der Freisetzung Hüllprotein-transgener Pflanzen durch heterolog enkapsidierte und rekombinierte Viren verursachte Schädigungen von Kultur- und Wildpflanzen zunehmen, erscheinen Freisetzungen und der Anbau dieser Pflanzen zumindest verfrüht und ein Moratorium angemessen. Der grundlegende Mangel an Daten über die Epidemiologie und Ökologie von Pflanzenviren und ihren Vektoren spricht im Sinne einer Schadensvorsorge auch gegen die Freisetzung von Pflanzen, in die andere virale Sequenzen kloniert wurden.

### Literatur

- ALLISON, R., 1995: RNA plant virus recombination. – In: American Institute of Biological Sciences (ed): Transgenic virus-resistant plants and new plant viruses. An American Institute of Biological Sciences workshop: 32–33
- ALLISON, R., 1997: OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract
- ANGENENT, G.C., POSTHUMUS, E., BREDERODE, F.T. & J.F. BOL, 1989: Genome structure of tobacco rattle virus strain PLB: further evidence on the occurrence of RNA recombination among tobamoviruses. – *Virology* 171: 271–274
- BOURDIN, D. & H. LECOQ, 1991: Evidence that heteroenkapsidation between two potyviruses is involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infections. – *Phytopathology* 81: 1459–1464
- BRAULT, V., VANDENHEUVEL, J.F.J.M., VERBEEK, M., ZIEGLER-GRAFF, V., REUTENAUER, A., HERRBACH, E., GARAUD, J.C., GUILLEY, H., RICHARDS, K. & G. JONARD, 1995: Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. – *The EMBO Journal* 14: 650–659
- BUJARSKI, J.J. & P. KAESBERG, 1986: Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. – *Nature* 321: 528–531
- CANDELIER-HARVEY, P. & R. HULL, 1993: Cucumber mosaic virus genome is encapsidated in alfalfa mosaic virus coat protein expressed in transgenic tobacco plants. – *Transgenic Research* 2: 277–285
- CANDRESSE, T., REVERS, F. LE GALL, O. & S. KOFALVI, 1997: OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract

- CHAY, C.A., GUNASINGE, U.B., DINESH-KUMAR, S.P., MILLER, W.A. & S.M. GRAY, 1996: Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. – *Virology* 219: 57–65
- COOPER, B., LAPIDOT, M., HEICK, J.A., DODDS, J.A. & R.N. BEACHY, 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, J.I., EDWARDS, M.L., ROSENWASSER, O. & N.W. SCOTT, 1994: Transgenic resistance genes from nepoviruses: efficacy and other properties. – *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 22: 129–137
- DE ZOETEN, G.A., 1991: Risk assessment: do we let history repeat itself? – *Phytopathology* 81: 585–586
- ECKELKAMP, C., JÄGER, M. & B.E.G. WEBER, 1997a: Risikoüberlegungen zu transgenen virusresistenten Pflanzen. – Gutachten im Auftrag des Umweltbundesamtes, Forschungsbericht 112 01 010, UBA-FB 97-058, UBA-Texte 59/97
- ECKELKAMP, C., MAYER, M. & B. WEBER, 1997b: BASTA-resistenter Raps. Vertikaler und horizontaler Gentransfer unter besonderer Berücksichtigung des Standortortes Wölfersheim-Melbach. – Werkstattreihe Nr. 100, Öko-Institut e.V.
- FALK, B.W., DUFFUS, J.E. & T.J. MORRIS, 1979: Transmission, host range, and serological properties of the viruses that cause lettuce speckles disease. – *Phytopathology* 69: 612–617
- FARINELLI, L., MALNOË, P. & G.F. COLLET, 1992: Heterologous encapsidation of potato virus Y strain O (PVY<sup>O</sup>) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVY<sup>N</sup>) in *Solanum tuberosum* cv. bintje. – *Bio/Technology* 10: 1020–1025
- FERNANDEZ-CUARTERO, B., BURGYÁN, J., ARANDA, M.A., SALÁNKI, K., MORIONES, E. & F. GARCÍA-ARENAL, 1994: Increase in the relative fitness of a plant virus associated with its recombinant nature. – *Virology* 203: 373–377
- FITCHEN, J.H. & R.N. BEACHY, 1993: Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. – *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 739–763
- FLASINSKI, S., DZIANOTT, A., PRATT, S. & J.J. BUJARSKI, 1995: Mutational analysis of the coat protein gene of brome mosaic virus: effects on replication and movement in barley and *Chenopodium hybridum*. – *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 23–31
- GAL, S., PISAN, B., HOHN, T., GRIMSLEY, N. & B. HOHN, 1992: Agroinfection of transgenic plants leads to viable cauliflower mosaic virus by intermolecular recombination. – *Virology* 187: 525–533
- GIBBS, M., 1994: Risks in using transgenic plants? – *Science* 264: 1650–1651
- GIBBS, M.J. & J.I. COOPER, 1995: A recombination event in the history of luteoviruses probably induced by base-pairing between the genomes of two distinct viruses. – *Virology* 206: 1129–1132
- GIBBS, M.J., WEILLER, G.F. & A.J. GIBBS, 1997: OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract
- GILDOW, F.E. & S.M. GRAY, 1993: The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteoviruses. – *Phytopathology* 83: 1293–1302
- GOLDBACH, R., 1990: Genome similarities between positive-strand RNA viruses from plants and animals. – In: M.A. BRINTON & F.X. HEINZ (eds): *New aspects of positive-strand RNA viruses.* – American Soc. Microbiol., Washington D.C.: 3–11
- GREENE, A.E. & R.F. ALLISON, 1994: Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. – *Science* 263: 1423–1425
- HACKLAND, A.F., RYBICKI, E.P. & J.A. THOMSON, 1994: Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. – *Arch. Virol.* 139: 1–22
- HENRY, C.M., BARKER, I., PRATT, M., PEMBERTON, A.W., FARMER, M.J., COTTEN, J., EBBELS, D., COATES, D. & R. STRATFORD, 1995: Risks associated with the use of genetically modified virus tolerant plants. MAFF, London
- JÄGER, M. & B. WEBER, 1993: Risikoaspekte gentechnisch erzeugter Virusresistenzen. – *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie* 22: 407–412
- JOLLY, C.A. & M.A. MAYO, 1994: Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. – *Virology* 201: 182–185
- KLEINER, K., 1997: Fields of genes. – *New Scientist* 1997, 4
- LAI, M.M.C., 1992: RNA recombination in animal and plant viruses. – *Microbiological Reviews* 56: 61–79
- LE GALL, O.L., LANNEAU, M., CANDRESSE, T. & J. DUNEZ, 1995: The nucleotide sequence of the RNA-2 of an isolate of the English serotype of tomato black ring virus: RNA recombination in the history of nepoviruses. – *Journal of General Virology* 76: 1279–1283
- LECOQ, H., RAVELONANDRO, M., WIPF-SCHEIBEL, C., MONSION, M., RACCAH, B. & J. DUNEZ,

- 1993: Aphid transmission of a non-aphid-transmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus. – *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 403–406
- LINDBO, J.A., SILVA-ROSALES, L. & W.G. DOUGHERTY, 1993: Pathogen derived resistance to potyviruses: working, but why? – *Seminars in Virology* 4: 369–379
- LOMMELE, A. & Z. XIONG, 1991: Reconstitution of a functional red clover necrotic mosaic virus by recombinational rescue of the cell-to-cell movement gene expressed in a transgenic plant. – *Journal of Cellular Biochemistry (suppl.)* 15A: 151
- LOPEZ-MOYA, J.J., CANTO, T., DIAZ-RUIZ, J.R. & D. LOPEZ-ABELLA, 1995: Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox isolate with the aid of potato virus Y helper component. – *Journal of General Virology* 76: 2293–2297
- MAISS, E., KOENIG, R. & D.E. LESEMANN, 1994: Heterologous encapsidation of viruses in transgenic plants and in mixed infections. – In: D.D. JONES (ed): *Proceedings of the 3rd international symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms*. – Oakland, California: 129–139
- MAISS, E., VARRELMANN, M., DIFONZO, C. & B. RACCAH, 1997: OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract
- MATTHEWS, R.E.F., 1991: *Plant Virology*, 3rd ed. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- PALUKAITIS, P. & I.B. KAPLAN, 1997: OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract
- PIRONE, T.P., 1981: Efficiency and selectivity of the helper-component-mediated aphid transmission of purified potyviruses. – *Phytopathology* 71: 922–924
- REVERS, F., LE GALL, O., CANDRESSE, T., LE ROMANCER, M. & J. DUNEZ, 1996: Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. – *Journal of General Virology* 77: 1953–1965
- RISSLER, J. & M. MELLON, 1993: Perils amidst the promise. – *Union of Concerned Scientists*, Cambridge, MA
- ROCHOW, W.F., 1977: Dependent virus transmission from mixed infections. – In: F. HARRIS & K. MARAMOROSCH (eds): *Aphids as virus vectors*. – Academic Press, New York: 253–273
- SAKO, N. & K. OGATA, 1981: Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. – *Virology* 112: 762–765
- SANFORD, J.C. & S.A. JOHNSTON, 1985: The concept of parasite-derived resistance – deriving resistance genes from the parasite's own genome. – *J. Theor. Biol.* 113: 395–405
- SCHOELZ, J.E. & W.M. WINTERMANTEL, 1993: Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. – *The Plant Cell* 5: 1669–1679
- SIMON, A.E. & J.J. BUJARSKI, 1994: RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. – *Annual Reviews of Phytopathology* 32: 337–362
- TASCHNER, P.E.M., VAN DER KUYL, A.C., NEELEMAN, L. & J.F. BOL, 1991: Replication of an alfalfa mosaic virus genome in plants transformed with viral replicase genes. – *Virology* 181: 445–450
- WANG, J.Y., CHAY, C., GILDOW, F.E. & GRAY, S.M., 1995: Readthrough protein associated with virions of barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission. *Virology* 206: 954–962
- WHITE, A.K. & T.J. MORRIS, 1994: Recombination between defective tombusvirus RNAs generates functional hybrid genomes. – *PNAS* 91: 3642–3646
- WILSON, T.M.A., 1993: Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. – *PNAS* 90: 3134–3141
- WINTERMANTEL, W.M. & J.E. SCHOELZ 1996: Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. – *Virology* 223: 156–164
- ZEYEN, R.J. & P.H. BERGER, 1990: Is the concept of short retention times for aphid-borne nonpersistent plant viruses sound? – *Phytopathology* 80: 769–771
- ZHOU, X., LIU, Y., CALVERT, L., MUNOZ, C., OTIM-NAPE, G.W., ROBINSON, D.J. & B.D. HARRISON, 1997: Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. – *Journal of General Virology* 78: 2101–2111
- ZIMMERN, D., 1988: Evolution of RNA viruses. – In: E. DOMINGO, J.J. HOLLAND & P. AHLQUIST (eds): *RNA genetics: retroviruses, viroids and RNA recombination*. – CRC Press, Boca Raton, Florida, 2: 211–240

#### Adresse

Dr. Barbara Weber  
 Dr. Manuela Jäger  
 Dr. Claudia Eckelkamp  
 Öko-Institut e.V.  
 Postfach 6226  
 D-79038 Freiburg

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie](#)

Jahr/Year: 1997

Band/Volume: [28\\_1997](#)

Autor(en)/Author(s): Weber Barbara, Jäger Manuela, Eckelkamp  
Claudia

Artikel/Article: [Ökologische Risiken gentechnisch veränderter  
virusresistenter Pflanzen 345-354](#)