

# Expression viraler Sequenzen in holzigen Nutzpflanzen zur Induktion von Resistenzen gegen Viren

A. DA CÂMARA MACHADO und M. LAIMER DA CÂMARA MACHADO

Seit einiger Zeit nimmt der Zustand der Umwelt im Bewußtsein der Bevölkerung einen immer höheren Stellenwert ein. Auch bezüglich unserer Nahrungs- und Genußmittelproduktion breitet sich ein neues Umwelt- und Qualitätsbewußtsein aus. Aus ökonomischen und ökologischen Gründen wäre es daher wünschenswert, die Kulturpflanzen mit eigenen Abwehrmechanismen auszustatten und den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zu reduzieren. Die Sicherung von Ertrag und Qualität bei Obstgehölzen und Weinreben ohne Einsatz von Pestiziden ist derzeit jedoch nur schwer vorstellbar.

Pflanzenbiotechnologie als interdisziplinäre Wissenschaft erlaubt es, die Ziele der Pflanzenzüchtung mit neuen Methoden auf kürzerem Weg zu erreichen. Aus dem Zusammenwirken von Disziplinen wie pflanzlicher Gewebekultur und Molekularbiologie ist zu erwarten, daß sich der Züchtung von holzigen Pflanzen, wie auch des Steinobstes und der Rebe, neue Perspektiven eröffnen.

Die Züchtung und Kultivierung virusresistenter Pflanzen ist eine wesentliche Maßnahme zur Kontrolle viraler Krankheiten. Die herkömmliche Kreuzungszüchtung ist limitiert durch die beschränkte Verfügbarkeit geeigneter Resistenzgene im Genpool und, die Züchtung von Holzigen nimmt große Zeiträume in Anspruch durch die lange Generationsdauer, durch den hohen Grad an Heterozygotie und durch die Tatsache, daß viele Rückkreuzungen nötig sind, um unerwünschte Eigenschaften zu eliminieren. In vielen Fällen sind Resistenzgene gegen biotische und abiotische Faktoren bei Obstgehölzen in nahe verwandten Sorten nicht vorhanden, sondern meist kommen sie in Wildsorten oder in nicht kultivierten Sorten vor, die meistens nur eine geringere Fruchtqualität aufweisen (Scorza, 1991).

Durch den Einsatz gentechnischer Methoden werden neue Resistenzgene verfügbar und es ist vorstellbar, daß Züchtungen viel weniger Zeit in Anspruch nehmen, wenn bestimmte Eigenschaften gezielt in Hochleistungssorten eingebracht werden, ohne daß der gesamte Hintergrund an unerwünschten Eigenschaften mitübertragen wird.

Die Notwendigkeit betrifft aber nicht nur neue wichtige Marktsorten. Dies trifft auch für die Erhaltung von alten Lokalsorten zu, die durch die Ausbreitung der Pathogene bedroht werden.

## Pathogen-vermittelte Virusresistenz

In den letzten Jahren wurden bei der Aufklärung von viralen Pflanzenkrankheiten und bei der Vermittlung von Virusresistenz von Pflanzen große Fortschritte erzielt. Grundsätzlich sind dafür zwei Wege möglich. Der erste Weg für eine Therapie ist das Einschleusen eines attenuierten viralen Genoms in die gesunde Pflanze. Dadurch wird einer Infektion mit infektiösen Stämmen vorgebeugt. Dieser Schutzmechanismus wird ursprünglich als „cross protection“ bezeichnet (McKinney, 1929).

Auch die alleinige Expression des Hüllproteingens in transgenen Pflanzen führt zu einem Schutz der Pflanze gegen infektiöse Stämme (Beachy et al. 1990, Laimer da Câmara Machado et al. 1992). In vielen Fällen wird durch diese Methode auch eine Infektion durch mehrere pathogene Viruspartikel derselben Gruppe verhindert (Stark and Beachy 1989, da Câmara Machado et al. 1991, Laimer da Câmara Machado et al. 1992).

Die ursprünglich von Beachy vertretene Hypothese, daß das Hüllprotein selbst in den Schutz involviert sei, scheint heute vielleicht noch für einige Viren, wie z.B. das TMV zu gelten (Beachy et al. 1998). Sonst hat sich aber das Verständnis

durchgesetzt, daß der Hemmechanismus eher auf der RNA-Ebene zu liegen scheint (Baulcombe, 1998), wozu auch Ergebnisse mit Antisense und nicht translatierbaren Konstrukten beigetragen haben.

Eine weitere Möglichkeit ist der Transfer von „antisense-RNA“ in die Pflanzen. Die Sequenz dieser Fragmente ist komplementär zu einem Teil des viralen Genoms und verhindert so die Bildung der viralen Proteine.

## Die wirtschaftliche Bedeutung von Plum Pox Virus

Die Sharka-Virose des Steinobstes wurde 1932 von Atanassov zum ersten Mal in Bulgarien beschrieben und das Plum Pox Virus (PPV) 1964 von Kegler als Erreger beschrieben. Heute ist PPV im gesamten süd- und mitteleuropäischen Raum stark verbreitet und richtet beträchtlichen Schaden an Steinobstkulturen an.

Die Verbreitung erfolgt zum Teil durch die Übertragung durch Blattläuse, zum Teil durch vegetative Vermehrung. Gerade die Blattlausübertragbarkeit stellt ein Problem für die Eindämmung der Krankheit dar, da virusfreie Neuanlagen nach einigen Jahren wiederinfiziert werden können, wenn der Abstand zu infizierten Anlagen nicht groß genug ist. Auch infizierte Wildformen bzw. Einzelpflanzen in Hausgärten stellen große Reinfektionsquellen dar. Die chemische Vektorbekämpfung erfolgt dreimal im Jahr: im April - Mai zur Erstbesiedelung, im Juni bei Befall durch die Hopfenblattlaus und im September bis Oktober beim Wechsel der Blattläuse von Sommer- auf Winterwirte (Petruschke und Schröder, 1994), vermag aber die Virusverbreitung nicht effizient zu verhindern.

Aus diesem Grund wären virusresistente Sorten von großem Interesse. PPV-resistente Steinobstsorten, die auch wirt-

**Autoren:** Dr. Artur DA CÂMARA MACHADO und Dr. Margit LAIMER DA CÂMARA MACHADO, Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität für Bodenkultur, Nußdorfer Lände 11, A-1190 WIEN



schaftlich interessant sind, sind nicht verfügbar.

Das Hüllproteingen eines nicht Blattlaus-übertragbaren Isolates von PPV wurde identifiziert, sequenziert und in einen Transformationsvektor kloniert, mit dem verschiedene Explantate von Aprikosen und Zwetschgen transformiert wurden (Laimer da Câmara Machado et al. 1992) und hat über mehrere Jahre einen deutlichen Schutz erbracht (da Câmara Machado et al. 1995 a).

### Die wirtschaftliche Bedeutung verschiedener Rebviren

Die Reisigkrankheit der Rebe wird von einem Komplex von Nematoden-übertragenen Viren verursacht, wie das Grapevine Fanleaf Virus (GFLV), das Arabis Mosaic Virus, das Raspberry Ringspot Virus, das Strawberry Latent Ringspot Virus (Bovey et al. 1980). GFLV ist aufgrund seiner weltweiten Verbreitung und des ökonomischen Schadens, den es anrichtet, das bedeutendste Rebvirus (Bovey et al. 1980). Eine Infektion mit GFLV beeinträchtigt sowohl die Ertragsleistung als auch die Lebensdauer der Reben. Außerdem sind mit GFLV infizierte Reben anfälliger gegen andere Pathogene, was zum vermehrten Einsatz von Pestiziden in befallenen Beständen führt.

GFLV wird durch die Nematoden *Xiphinema index* und *X. italiae* übertragen. ArMV wird auf die Rebe durch *X. diversicaudatum* übertragen. Da die Bekämpfung der Vektoren durch eine Bodenentseuchung aus ökologischen Gründen nicht vertretbar ist und nach Rodungen im Boden verbleibende Wurzeln infizierter Pflanzen bei Wiederausplantungen selbst bei der Verwendung von virusfreiem Pflanzmaterial eine bleibende Infektionsquelle darstellen, wurde von Experten des ICV (International Virus Committee) die Empfehlung ausgesprochen, 6 Jahre Brache einzulegen, bevor auf ehemals nematodenverseuchten Böden wieder Reben gepflanzt werden können.

Die genomischen Sequenzen einiger rebenpathogener Viren und daher auch die entsprechenden Sequenzen für die Hüllproteine, wie z.B. von ArMV (Steinkellner et al. 1989, 1992) und GFLV (Sergini et al. 1990) wurden sequenziert.

Grapevine Virus A und B gehören zu den Trichoviren (Minafra et al. 1994). Die

enge Verbindung von GVA mit den Symptomen von „Kober stem growing“ (Minafra et al. 1997) und von GVB mit „Corky bark“, Krankheiten der „Holzrunzeligkeit“ der Rebe, konnte nachgewiesen werden (Saldarelli et al. 1996). Diese beiden Rebkrankheiten treten wahrscheinlich in fast allen weinbautreibenden Ländern der Welt auf. Sie verursachen eine Verminderung der Wüchsigkeit und führen zu einer erheblichen Ertragsreduktion und zu einer Verkürzung der Lebensdauer der befallenen Reben. Überträger für diese Viren sind Wollläuse: für GVA konnten *Pseudococcus longispinus*, *Planococcus citri* und *Planococcus ficus* nachgewiesen werden.

### Konstruktion von Vektoren mit verschiedenen Formen der Hüllproteingene unter besonderer Berücksichtigung von Sicherheitsaspekten

Was die verwendete Sequenz aus dem Plum Pox-Virusgenom betrifft, so handelt es sich um ein Hüllproteingen PPV CP (Coat Protein) (Abbildung 1), dem ein bestimmter Abschnitt, der für die Blattlausübertragbarkeit verantwortlich ist, fehlt. Dies entspricht internationalen Definitionen gemäß einem „Biological containment“.

Für die Vermittlung einer erweiterten Resistenz gegen die Reisigkrankheit der Rebe wurden die Hüllproteingene von ArMV (Arabis Mosaic Virus) (Steinkellner et al. 1992) und GFV (Grapevine Fanleaf Virus) verwendet. Überlegungen bezüglich der Sicherheit bei der Freisetzung solcher transgener Pflanzen führten dazu, verschiedene Konstrukte zu konzipieren, in denen teilweise kein oder ein modifiziertes Protein gebildet wird. Wir entschieden uns für die Konstruktion von Varianten des GFLV-Hüllprote-

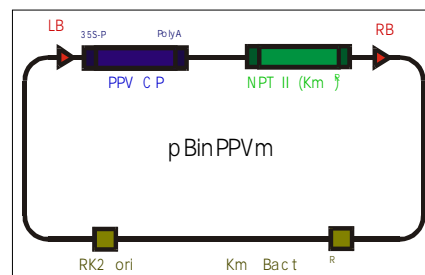


Abbildung 1: Binäres Plasmid pBinPPVm mit dem PPV-CP-Gen und dem NPTII (Kanamycin-Resistenz) Markern zur Selektion

ingens, die am 5'- bzw. am 3'-Ende verkürzt waren. Weiters stellten wir Vektoren her, die nicht translatierbare Formen des GFLV-Hüllproteingens in sense- oder antisense-Orientierung tragen (Gölles et al. 1996, 1998). Mit solchen Genkonstrukten kann die Möglichkeit der Heteroencapsidierung (Farinelli et al. 1992; Tepfer 1993, Maiss et al. 1995, Hammond et al. 1995) bzw. der Bildung leerer Pseudovirionen (Bertioli et al. 1991) reduziert werden. Die Konstrukte, die die Hüllproteingene von GVA bzw. GVB enthalten, wurden in Zusammenarbeit mit der Universität Bari (Italien) hergestellt und zur Transformation von krautigen Modellpflanzen sowie von Reben verwendet (da Câmara Machado et al. 1995 d,e, Minafra et al. 1994, 1998).

### Erzielter Virusschutz

Die zunächst an transformierten krautigen Modellpflanzen durchgeführten Challenge-Infektionsversuche sind positiv verlaufen und haben Hinweise auf unterschiedliche Mechanismen, aber auch auf das wesentliche Momentum gebracht, daß zum Erreichen eines brauchbaren Schutzes keine hohe Expression des transgenen Hüllproteins notwendig ist: dies bei PPV (da Câmara Machado et al. 1995a,b), ebenso bei ArMV und GFLV (Gölles et al. 1996, Moser, 1997) und bei GVA und GVB (Minafra et al. 1998). Dies steht in deutlichem Kontrast zu der von Beachys Gruppe (1990) zunächst postulierten Wirkungsweise. Aber auch international tendiert man jetzt eher dazu, den Schutzmechanismus gegen Viren auf einer RNA-Interaktionsebene zu suchen (Baulcombe, 1998).

Transformierte Pflanzen von *Prunus* (Laimer da Câmara Machado et al. 1992, da Câmara Machado et al. 1995c, Druart et al. 1997) und *Vitis* (da Câmara Machado et al. 1995d,e, Gölles et al. 1996, 1998) wurden regeneriert. Vielversprechend ist die Schutzwirkung durch das PPV-Hüllproteingen, die in Challenge-Infektionsversuche durch *in vivo*- und *in vitro*-Veredelung transgener Edelreiser auf virusfreie Unterlagen beobachtet werden konnte (da Câmara Machado et al. 1995a,b). Im Vergleich zu ursprünglich virusfreien Kontrollreiseren, die bald infiziert wurden, was mit-

tels Tissue Printing (Knapp et al. 1995) bzw. mittels ELISA festgestellt werden konnte, blieben die transgenen Reiser über den gesamten Beobachtungszeitraum (bei Bäumen im Glashaus über 2 Jahre) virusfrei.

Weitere schlüssige Beobachtungsdaten können wir allerdings nur noch von Versuchen unter Freilandbedingungen erwarten, um deren Zulassung wir uns derzeit aktiv bemühen.

## Literatur

- Atanassov, D. 1932. Plum Pox, a new virus disease. Yearbook University of Sofia, Agronom. Faculty. 11: 49.
- Baulcombe D.C. 1998. Resistance against viruses in plants: natural and artificial mechanisms. In: Invited papers Abstracts, ICPP 98 9.-16. August 1998, Edinburgh, Scotland: Vol. 1
- Beachy R.N., Loesch-Fries L.S. & Tumer N.E. 1990. Coat Protein-Mediated Resistance against Virus Infection. Annual Rev. of Phytopath. 451-474.
- Beachy R. N., Bendahmane M., Lim C.-O. and Reichel C. 1998. Increasing the efficacy of coat protein- and movement protein-mediated resistance requires an understanding of mechanisms of resistance. In: Invited papers Abstracts, ICPP 98 9.-16. August 1998, Edinburgh, Scotland: Vol. 1
- Bertioli D.J., Harris D.R., Edwards M.L., Cooper J.I. and Hawes W.S. 1991. Transgenic plants and insect cells expressing the coat protein of arabis mosaic virus produce empty virus-like particles. J. Gen. Virol. 72:1801-1809
- Bovey R., Gärtel W., Hewitt W.B., Martelli G.P. and Vuittenez A. 1980. Virosen und virusähnliche Krankheiten der Rebe. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
- da Câmara Machado A., Steinkellner H., Laimer da Câmara Machado M., Hanzer V., Weiss H., Knapp E., Mattanovich D., Regner F. and Katinger H. 1991. Transformation and Regeneration of different Host Plants of Arabis Mosaic Virus. MHLV-Meeting, Budapest, September 1991: 138-139
- da Câmara Machado A., Knapp E., Pühringer H., Hanzer V., Weiss H., Wang Q., Katinger H. and Laimer da Câmara M. 1995a. Progress in pathogen mediated-resistance breeding against Plum Pox Virus. XVI ISHS Symposium on Fruit Tree Viruses. Rome, 1994. Acta Hort 386: 318-326.
- da Câmara Machado A., Knapp E., Seifert G., Pühringer H., Hanzer V., Weiss H., Wang Q., Katinger H. and Laimer da Câmara M. 1995b. Gene transfer methods for the pathogen mediated resistance breeding in fruit trees. XXIV ISHS Congress, Kyoto, 1994. Acta Hort 392:193-202.
- da Câmara Machado A., Puschmann M., Katinger H. and Laimer da Câmara Machado M. 1995c. Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Reports 14: 335-340.
- da Câmara Machado A., Tsolova V., Gölles R., Pühringer H., Atanassov A., Katinger H. and Laimer da Câmara Machado M. 1995d. *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of *Vitis vinifera* L. genotypes as a method for production of transgenic plants. VII Intl. Symp. on Vine and Wine, Plovdiv, Bulgaria, 6. - 8. 2. 1995.
- da Câmara Machado A., Tsolova V., Gölles R., Pühringer H., Atanassov A., Katinger H. and Laimer da Câmara Machado M. 1995e. Transformation des embryos somatique de *Vitis vinifera* L. par *Agrobacterium* et Regeneration des plantes transgeniques. 3. Symp. de Vitivinicultura do Alentejo, Evora, Portugal, 17. - 19. 5. 1995.
- Druart Ph., Delporte F., Brazda M., Ugarte-Ballon C., da Câmara Machado A., Laimer da Câmara Machado M., Jaquemin J. and Watillon B. 1997. Genetic Transformation of Cherry Trees. ISHS Cherry Meeting, Norway 1997. Acta Hort. in press.
- Farinelli L., Malnoe P. and Collet G.F. 1992. Heterologous encapsidation of potato virus strain O (PVYO) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVYN) in *Solanum tuberosum* cv. Bintje. Bio/Technology 10:1020-1025
- Gölles R., da Câmara Machado A., Tsolova V., Bouquet A., Moser R., Katinger H. and Laimer da Câmara Machado M. 1996. Transformation of somatic embryos of *Vitis* sp. with different constructs containing nucleotide sequences from nepovirus coat protein genes. 3. Intl. Symp. In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Jerusalem, June 1996. Acta Hort.447: 265-272.
- Gölles R., da Câmara Machado A., Minafra A., Savino V., Saldarelli G., Martelli G.P., Pühringer H., Katinger H. and Laimer da Câmara Machado M. 1998. Transgenic grapevines expressing coat protein gene sequences of grapevine fanleaf virus, arabis mosaic virus, grapevine virus A and grapevine virus B. VII<sup>th</sup> International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding, Montpellier (France), 6 - 10 July 1998. Acta Hort. in press.
- Hammond J., Pühringer H., Steinkellner H., da Câmara Machado A., Laimer da Câmara Machado M. 1995. Transcapsidation in transgenic plants expressing potyvirus coat proteins. Phytopathology 85: 1151.
- Knapp E., da Câmara Machado A., Pühringer H., Wang Q., Hanzer V., Weiss H., Weiss B., Katinger H. and Laimer da Câmara M. 1995. Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* and *Prunus* sp.. J. Virol. Meth. 55(2): 157-173.
- Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., Hanzer V., Weiß H., Regner F., Steinkellner H., Mattanovich D., Plail R., Knapp E., Kalthoff B., Katinger H. 1992. Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. Plant Cell Reports 11(1): 25-29.
- Maiss, E., Koenig, R., and Lesemann, D.-E. 1995. Heterologous encapsidation of viruses in transgenic plants and in mixed infections. 3rd International Symposium on The biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms, Monterey, California United States. 14.-16.11.1994; p 129-140.
- McKinney H.H. 1929. Mosaic disease in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. Journal of Agricultural Research 39:557-578.
- Minafra A., Saldarelli P., Grieco F. and Martelli G.P. 1994. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of two filamentous grapevine virus. Arch. Virol. 137:249-261
- Minafra A., Saldarelli P. and Martelli G.P. 1997. Grapevine virus A: nucleotide sequence, genome organization and relationship in the *Trichovirus* genus. Arch. Virol. 142:417-423.
- Minafra A., Goelles R., da Câmara Machado A., Saldarelli P., Buzkan N., Savino V., Martelli G.P., Katinger H. and Laimer da Câmara Machado M. 1998. Expression of the coat protein gene of grapevine virus A and B in *Nicotiana*, and evaluation of the resistance conferred to transgenic plants. Journal of Plant Pathology: 80(3):197-202.
- Moser R. 1997. Evaluierung des Schutzes gegen Grapevine Fanleaf Virus in transgenen *Nicotiana benthamiana*. Diplomarbeit der Universität für Bodenkultur.
- Petruschke M. and Schröder M. 1994. Pflaumen- und Zwetschkenanbau mit Scharka-frucht-toleranten Sorten. Landesanstalt für Pflanzenschutz Stuttgart.
- Saldarelli P., Minafra A. and Martelli G.P. 1996. The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B. J.Gen.Virol. 77:2645-2652.
- Scorza, R. 1991. Gene transfer for the genetic improvement of perennial fruit and nut crops. Hort-Science 26:1033-1035.
- Serghini M.A., Fuchs M., Pinck M., Reinbolt J., Walter B. and Pinck L. 1990. RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. J. Gen. Virol. 71:1433-1441.
- Stark M.D. and Beachy R.N. 1989. Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. Biotechnology 7:1257-1262.
- Steinkellner H., Himmler G., Laimer da Câmara Machado M., Mattanovich D. and Katinger H. 1989. Construction and analysis of cDNA from Arabis Mosaic Virus for Diagnosis. EMBO workshop on the Molecular Biology of Plant Virus Pathogenity at Wye College, Kent, UK.
- Steinkellner H., Weinhäusl A., Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A. and Katinger H. 1992. Identification of the coat protein gene of Arabis Mosaic Nepovirus and its expression in transgenic plants. Acta Hort. 308: 37-41.
- Tepfer M. 1993. Viral genes and transgenic plants. What are the potential environmental risks? Bio/Technology 11:1125-1131

