

## **Virusresistente transgene Pflanzen – Mechanismen und Nutzungsmöglichkeiten**

### **Mark Varrelmann**

Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Pflanzenvirologie, Georg-August-Universität,  
Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen und Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin,  
Holtensener Landstr. 77, 37079 Göttingen  
(mvarrel@gwdg.de)

### **Einleitung**

Insgesamt existieren weltweit ca. 450 unterschiedliche Virusspezies, die Krankheiten an Pflanzen verursachen (Soosaar et al., 2005). Pflanzenviren stellen infektiöse, invasive Nukleinsäuren dar, die als obligate Parasiten auf den pflanzlichen Wertsstoffwechsel angewiesen sind, um sich zu replizieren und damit Krankheiten zu verursachen. Durch eine effektive Umprogrammierung pflanzlicher Stoffwechselwege für die Synthese viraler Nukleinsäuren, Proteine und weiterer Virusbestandteile erzeugen Pflanzenviren über biochemische, und physiologische Veränderungen im Wirt, auch ohne als Pathogen selbst für das menschliche Auge sichtbar zu sein, erhebliche Schäden. Die wirtschaftliche Bedeutung von Pflanzenviren steht heute an zweiter Stelle nach den phytopathogenen Pilzen/pilzlichen Erkrankungen (Agrios, 1998). Nahezu alle landwirtschaftlich bedeutenden Nutzpflanzen werden von Pflanzenviren infiziert. Dabei kann das Pflanzenwachstum teilweise drastisch reduziert sowie Ertrag und Qualität des Erntegutes extrem verringert werden. Dies kann an verschiedenen Beispielen verdeutlicht werden. So verursacht *Cacao swollen shoot virus* (CSSV) jährlich in Afrika einen geschätzten Ernteverlust von 50.000 t. Kakaobohnen mit einem geschätzten Wert von 28 Mio US \$ (Bowers et al. 2001). In den letzten 40 Jahren mussten ca.  $1,9 \times 10^8$  Kakaobäume vernichtet werden (Hull & Davies, 1992). Weiterhin werden in Asien Verluste durch die Infektion von Reis mit *Rice tungro spherical virus* (RTSV) und *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) in jährlicher Höhe von ca. 1.5 Mrd. US \$ berichtet (Hull, 2002). *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), welches eine Vielzahl von wirtschaftlich bedeutenden Kulturpflanzen wie Tabak, Tomate und Erdnuss befällt und zu den „neuen“ Viruskrankheiten gezählt werden darf, wird auf einen jährlichen weltweiten Verlust von ca. 1 Mrd. US \$ geschätzt (Prins & Goldbach, 1998; Hull, 2002). Die wirtschaftlichen Einbußen im weltweiten Kartoffelanbau durch Viruskrankheiten, trotz intensiver Bekämpfung der Virusvektoren, können auf jährlich etwa 30 Mio. US \$ angesetzt werden

(Schuchert et al., 1996). Die jährlichen Schäden an Gerste und Weizen durch das Gerstengelverzweigungsvirus *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) allein im englischen Getreideanbau belaufen sich auf ca.  $1,1 \times 10^7$  £ (Hull, 2002). Durch zunehmenden Transport landwirtschaftlicher Produkte, Pflanzen, Vermehrungsmaterial, steigender Produktion und wachsender landwirtschaftlich and gartenbaulich genutzter Erzeugungsf lächen ist weltweit mit einer Zunahme von Schäden durch Viruskrankheiten an Kulturpflanzen bzw. deren Ernteprodukte auszugehen (Agrios, 1998).

Da Viruzide für den Pflanzenschutz nicht verfügbar sind und daher eine virusinfizierte Pflanze nicht geheilt werden kann, muss sich die Bekämpfung auf eine Verhinderung oder zumindest Reduktion der Infektion und damit auf die Bekämpfung der virusübertragenden Vektoren (z.B. Insekten, Pilze, Nematoden) und die Beseitigung von ungenutzten Zwischenwirten beschränken (Haddidi et al. 1998). Eine besondere Bedeutung besitzt dabei die Herstellung von **virusfreiem Vermehrungsmaterial**, insbesondere bei vegetativ vermehrten Pflanzen. Die Kontrollmöglichkeit mit größter Bedeutung und Nachhaltigkeit, da ökonomisch und umweltfreundlich, stellt der Anbau von Kulturpflanzen mit **Virusresistenz** dar. Zu bevorzugen ist dabei eine Infektionsresistenz. Um aus Sorten einer Kulturpflanze oder ihren Wild- bzw. Ursprungsformen natürlich vorkommende Resistenzen zu selektieren und für den kommerziellen Anbau in marktfähigen Sorten nutzbar zu machen, muss ein immenser wirtschaftlicher Aufwand betrieben werden. Teilweise sind jahrzehntelange Zuchtprogramme erforderlich, um natürlich vorkommende Virusresistenzgene in den genetischen Hintergrund des entsprechenden Kulturpflanzengenotyps mit Höchstträgen ohne Ertragsverluste bei Nichtbefall einzukreuzen. So sind z.B. in Europa von 1.6 Mio. ha untersuchter Zuckerrübenanbaufläche ca. 38% mit dem bodenbürtigen und pilzübertragbaren *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) infiziert, welches die ökonomisch bedeutende Wurzelbärtigkeit (Rhizomania) erzeugt (Richard-Molard & Cariolle, 2001).

Der wirtschaftliche Anbau von Zuckerrüben ist aufgrund einer Ertragsreduktion von bis zu 40% nur durch den Anbau von resistenten Genotypen möglich. Die hier einzig verfügbare und daher großflächig genutzte Resistenz stammt aus einer Wildform *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. Der Zeitraum von der Initiierung der Resistenzzüchtung um 1970 bis zum kommerziellen Anbau von konkurrenzfähigen Sorten in Deutschland kann mit ungefähr 25 Jahren angegeben werden (Bianchardi et al., 2002). Die Bedeutung und Notwendigkeit der Resistenz wird durch die Tatsache unterstrichen, dass allein in Deutschland mittlerweile auf ca. 65% der ca. 400.000 ha Anbaufläche ausschließlich BNYVV-resistente Zuckerrübensorten angebaut werden (E. Ladewig, pers. Mitt., 2006). Schon seit Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts besteht jedoch eine zusätzliche Möglichkeit, eine Vielzahl von Kulturpflanzen, für die ein Transformationsprotokoll besteht, über die transgene Expression von viralen Nukleinsäuren durch das Pflanzengenom, das pflanzeigene adaptive Virusresistenzsystem, genannt „**RNA silencing**“, bereits vor einer Virusinfektion anzuschalten und eine virusspezifische

Infektionsresistenz zu erzeugen. Dieses Verfahren besitzt großes Potenzial, eine Vielzahl von ernsthaften Virusproblemen in der Pflanzenproduktion dauerhaft lösen zu können. Die Nutzung dieser Biotechnologie ist als nachhaltig einzustufen, weil durch sie in vielen Fällen Pflanzenschutzmittel (Insektizide) zur Vektorbekämpfung eingespart werden könnten. Die Anstrengungen der Pflanzenzüchtung zur Suche nach natürlich vorkommenden Resistenzen sowie der Aufwand für Einkreuzungen in die entsprechenden Kulturformen könnten reduziert werden, weil Hohertragsorten direkt transformiert und mit hoher Effizienz und relativ einfacher Selektion mit der transgenen Virusresistenz ausgestattet werden können.

Kein natürlich vorkommender pflanzlicher Resistenzmechanismus gegenüber Phytopathogenen ist derzeit so detailliert charakterisiert, wie das hier zugrunde liegende und genutzte Prinzip des „RNA silencing“. Um die mögliche breite Nutzbarkeit dieses Verfahrens zur Resistenzzeugung besser beurteilen bzw. abschätzen zu können und mit Verfahren der klassischen Virusresistenzzüchtung zu vergleichen, soll hier versucht werden, eine Übersicht der Entwicklung der Verfahren, der zugrunde liegenden Mechanismen des „RNA silencing“ und der bekannten Beispiele bereits kommerziell genutzter transgener virusresistenter Pflanzen zu vermitteln. Darüber hinaus sollen weitere Prinzipien zur Herstellung transgener virusresistenter Pflanzen, wie die Übertragung von identifizierten pflanzlichen antiviralen Resistenzgenen (R-Gene) und die Pflanzentransformation mit virusspezifischen Antikörpern vorgestellt und erfolgreiche Resistenzzeugung exemplarisch aufgezeigt werden. Die Vor- und Nachteile der Techniken werden diskutiert; indem sie mit Verfahren der konventionellen Virusresistenzzüchtung verglichen werden.

### **Geschichte der Pathogen-vermittelten Resistenz und „Cross-Protection“ (Präimmunisierung)**

Schon seit vielen Jahrzehnten wird die (mechanische) Infektion von Kulturpflanzen mit attenuierten Virusisolaten, die keine oder nur schwache Symptome und Schädigungen verursachen, eingesetzt, um einen Schutz gegenüber Isolaten des gleichen Virus zu verleihen, die bei einer alleinigen Infektion diese Pflanze stark schädigen würden (McKinney, 1929). Dieses als Präimmunisierung („Cross-Protection“) bezeichnete Prinzip wird im praktischen Anbau zum Schutz vor Viruserkrankungen zum Beispiel in Citrus gegenüber *Citrus tristeza virus* (CTV), in Cucurbitaceen wie Gurken und Melonen gegenüber *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) oder in Papaya gegen *Papaya ringspot virus* (PRSV) erfolgreich eingesetzt (Costa & Müller, 1980; Matthews, 1991). Nachteile dieses Verfahrens stellen die Ertragsreduktion durch die milden Isolate, die Bildung eines Virusreservoirs und v.a. das Risiko der Reversion des „milden“ Isolates zu einem „schweren“ Isolat dar. Darüber hinaus ist die Inokulation bei annualen Pflanzen sehr arbeitsaufwändig. Dies sind entscheidende Gründe, warum das Verfahren bisher nicht zu einer breiten Anwendung in anderen landwirtschaftlich bedeutenden Kulturen gefunden hat. Mit der Präimmunisierung wurde jedoch schon unbewusst der pflanzeigene

Resistenzmechanismus, welcher auf „RNA silencing“ (s.u.) basiert, genutzt, der die Grundlage der Erzeugung von transgenen virusresistenten Pflanzen, transformiert mit viralen Sequenzen, darstellt (Covey et al., 1997; Ratcliff et al., 1997, 1999). Schon 1962 konnte von Loebenstein gezeigt werden, dass die alleinige Inokulation des gereinigten Hüllproteins des *Tobacco mosaic virus* (TMV) auf Wirtspflanzen schon einen Schutz gegenüber einer Infektion mit dem Virus verleiht. Das Konzept der Pathogen-vermittelten Resistenz („**pathogen derived resistance**“; **PDR**) durch gentechnische Einführung von Genen des Pathogens in die jeweiligen Wirte wurde erstmals von Sanford & Johnston (1985) am Beispiel von *Escherichia coli* und dem Bakteriophagen Q $\beta$  vorgeschlagen. Sie transformierten das Hüllproteingen von Q $\beta$  in das Genom von *E. coli* und erzeugten damit Virusresistenz. Die Autoren postulierten ein prinzipielles System der Erzeugung von Pathogenresistenz durch Expression eines Gens des Pathogens im Wirt durch die Erzeugung einer Interferenz mit Prozessen der Pathogenvermehrung/Lebenszyklen des Pathogens.

### **Protein-vermittelte Resistenz gegenüber Pflanzenviren**

Dieses Prinzip wurde von Powell et al. (1986) aufgegriffen und das translatierbare Hüllproteingen (CP) des *Tobacco mosaic virus* (TMV) in *Nicotiana tabacum* transformiert und damit eine Schutzwirkung gegen die mechanische Infektion mit TMV erzeugt, die jedoch durch die Inokulation mit viraler RNA überwunden werden konnte (Nelson et al., 1987). Powell et al. (1990) zeigten für das TMV, dass ausschließlich das exprimierte CP des TMV für den Resistenzeffekt verantwortlich ist. Loesch-Fries et al. (1987) demonstrierten für das CP des *Alfalfa mosaic virus* (AIMV) und Hemenway et al. (1988) am Beispiel des *Potato virus X* (PVX), dass die Konzentration des viralen translatierten Hüllproteins einen Einfluss auf den beobachteten Resistenzeffekt ausübt. Darüber hinaus konnte in beiden Fällen die Resistenz nicht mittels Inokulation von viraler RNA überwunden werden, welches darauf hinweist, dass der Mechanismus in Abhängigkeit vom untersuchten Wirt-Virus-System unterschiedlich sein kann (Fitchen & Beachy, 1993; Hemenway et al., 1988; Tumer et al., 1991). Hemenway et al., 1988 vermuteten eine Verhinderung der Freisetzung der viralen RNA nach Zelleintritt durch das transgene Hüllprotein. Yusibov & Loesch-Fries (1995) postulierten eine Interaktion des transgenen Hüllproteins mit einem Wirtsfaktor, welcher für die Disassemblierung des Virus verantwortlich ist. Dies konnte am Beispiel der Hüllprotein-vermittelten Resistenz gegenüber TMV von Wu et al. (1990) bestätigt werden. Bendahmane et al. (1997) konnten zeigen, dass nur intaktes und assemblierungsfähiges TMV CP eine Resistenz vermitteln kann. Daher wurde diese Resistenz in transgenen Pflanzen zunächst als **Hüllprotein-vermittelte Resistenz** („coat protein-mediated resistance; CP-MR) bezeichnet (Fitchen & Beachy, 1993; Hackland et al., 1994; Lomonosoff, 1995). Aber auch mit der Verwendung von translatierbaren viralen Genen für Nichtstrukturproteine wie Transportproteine und Replikasen in transgenen Pflanzen konnte eine Protein-vermittelte Resistenz in verschiedenen Fällen demonstriert werden.

Lapidot et al. (1993) zeigten, dass nur ein defektes Transportprotein des TMV in transgenen Pflanzen Resistenz vermitteln kann, nicht jedoch das intakte. Cooper et al. (1996) zeigten, dass mittels Expression von defekten Transportproteinen u.U. auch eine breiter wirksame Resistenz erzeugt werden kann. Die Verwendung von intakten translatierbaren Transportproteinen ist jedoch nachteilig, da sie Defektmutanten anderer infizierender Viren komplementieren können. Funktionelle Sequenzen, die von viralen Replikasegenen abgeleitet sind, können ebenfalls transgene Virusresistenz vermitteln (zusammengefasst von Palukaitis & Zaitlin, 1997). Die Autoren vermuten eine Interaktion zwischen der Replikase und anderen viralen Proteinen, die hemmende Effekte auf die Virusvermehrung und Ausbreitung haben könnte.

Generell führt jedoch eine Protein-vermittelte Resistenz (nur) zur Verzögerung des Auftretens von Virussympomen und geringeren Virusgehalten, jedoch seltener zu einer Infektionsresistenz. Diese Methode der Erzeugung von transgenen virusresistenten Pflanzen durch Transformation mit vollständigen translatierbaren viralen Genen wurde jedoch mit Entdeckung des „RNA silencing“ und der sich daraus ableitenden RNA-vermittelten Resistenz nahezu aufgegeben, da sie keine Vorteile bietet. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass funktionelle virale Proteine, die in jeder Pflanzenzelle exprimiert werden, möglicherweise eine biologische Funktion übernehmen, welche z.B. die Replikation, Vektorübertragbarkeit, Wirtskreis und Pathogenität von superinfizierenden Viren modifizieren oder Defekte komplementieren kann. Diese Effekte sind als **heterologe Enkapsidierung**, Komplementation und Synergismus beschrieben (Tepfer, 2002) und können als mögliche biologische Risiken von transgenen virusresistenten Pflanzen betrachtet werden. Diese Phänotypen sind jedoch reversibel und verändern nicht das Genom von superinfizierenden Viren.

## **RNA-vermittelte Resistenz und „RNA-silencing“**

### **Der Mechanismus**

Eukaryotische Organismen, zu denen auch Pflanzen gehören, müssen sich gegenüber fremden genetischen Elementen wie Pflanzenviren und Transposons (springenden Genen) schützen (Voinnet, 2001; Hamilton et al., 2002). Generell handelt es sich bei „RNA silencing“ um einen pflanzeigenen Mechanismus zur Unterdrückung der Fremdgenexpression, erzeugt über nukleinsäurespezifische Interaktionen und vermittelt durch RNA (Baulcombe 2004, 2005; Filipowicz et al., 2005). Mittlerweile sind eine Vielzahl von Arbeiten zum Thema des „RNA silencing“ in Pflanzen und dessen Mechanismus publiziert worden. Auf verschiedene exzellente Übersichtsartikel sei verwiesen (Lindbo & Dougherty, 2005, Dunoyer & Voinnet, 2005, Dudley & Goldstein, 2003, Susi et al., 2004, Baulcombe et al., 2004).

Entdeckt wurde der Mechanismus in transgenen Pflanzen, die mit fremden Genen transformiert waren (van der Krol, 1990; Napoli et al., 1990; Elmayan & Vaucheret, 1996). Zunächst wurde das Phänomen als **Cosuppression** bezeichnet, weil über die

zusätzliche Expression eines pflanzeigenen Gens in Form eines Transgens, beide Gene in ihrer Expression abgeschaltet wurden. Durch den Mechanismus des „RNA silencing“ wird die transgene Expression temporär und reversibel herunterreguliert, weil das transgene Transkript von der Pflanze als (virale) invasive Nukleinsäure erkannt wird. Dieser Mechanismus ist innerhalb der meisten eukaryotischen Organismen hochkonserviert. Das Initiator-molekül besteht aus doppelsträngiger RNA (dsRNA) (Wesley et al., 2001), welche jedoch auch aus aberranter und zellfremder einzelsträngiger RNA in der Zelle selbst durch RNA-abhängige RNA Polymerasen produziert werden kann. „RNA silencing“ richtet sich gegen sequenzhomologe invasive zelluläre RNAs und darf daher als ein pflanzeigenes Immunsystem bezeichnet werden, welches jedoch nicht auf der Ebene der Proteine sondern auf Nukleinsäureebene funktioniert. Dieser adaptive Resistenzmechanismus gegenüber Pflanzenviren, führt zu einer sequenzspezifischen Degradation der Nukleinsäure des infizierenden Virus. DsRNA wird bei der Virusreplikation von RNA-Viren temporär produziert und induziert natürlicherweise diesen Resistenzmechanismus bei jeder Virusinfektion in nahezu jedem pflanzlichen System (Ding et al., 2004). Die dsRNA wird durch eine pflanzeigene Endo-Ribonuklease (DICER) in kurze doppelsträngige „**short interfering RNAs**“ (siRNAs) mit definierten Längen von 21 und 24/25 Nukleotiden prozessiert (Hamilton & Baulcombe, 1999; Tang et al., 2003). Die siRNAs werden in einen Multiprotein-Komplex eingebunden, der als ‚RNA-induced silencing complex‘ (RISC) bezeichnet wird und sequenzspezifische Nukleaseaktivität besitzt (Hammond et al., 2000). Ein siRNA Einzelstrang hybridisiert sequenzspezifisch mit komplementärer RNA, wodurch deren Degradation durch endonukleolytischen Verdau gestartet wird (Elbashir et al., 2001). Ein wichtiger Beweis für die antivirale Aktivität dieses Mechanismus ist die Tatsache, das „RNA silencing“ nicht zellautonom ist, sondern mittels eines systemischen Signals (mit hoher Wahrscheinlichkeit verschiedene Klassen der siRNAs) zwischen Zellen und mittels Leitbündeln über längere Distanzen systemisch in der Pflanze induziert bzw. potenziert werden kann (Palauqui et al., 1997; Voinnet & Baulcombe, 1997; Baulcombe, 2004; Voinnet, 2005). Das trotz dieses effektiven adaptiven Resistenzmechanismus nicht alle Pflanzen *per se* virusresistent sind, liegt an der Tatsache, dass Pflanzenviren als Abwehrstrategie Proteine evolviert haben, die dieses „RNA silencing“ unterdrücken können (Silhavy & Burgyan, 2004, Voinnet, 2005). Mittlerweile sind aus mehr als 12 verschiedenen Virusgenera Suppressorproteine des „RNA silencing“ isoliert und identifiziert worden. Auch diese Tatsache stellt einen weiteren wichtigen Hinweis dar, dass es sich bei diesem Mechanismus der RNA Degradation um einen pflanzeigenen Mechanismus der Virusresistenz handelt (Silhavy & Burgyan, 2004, Li & Ding, 2001; Voinnet et al., 1999; Moissiard & Voinnet 2004).

### **Die Erzeugung von transgenen virusresistenten Pflanzen mit RNA vermittelter Resistenz**

Nach der Erzeugung von ersten transgenen virusresistenten Pflanzen, die mit vollständigen translitierbaren Genen viraler Herkunft ausgestattet waren und für die

teilweise auch ein Resistenzmechanismus nachgewiesen werden konnte, der auf Proteinexpression basierte, konnte ein Resistenzphänomen nachgewiesen werden, welches nur auf Anwesenheit der transgenen viralen Nukleinsäure basierte (Lindbo et al., 1993). Lindbo & Dougherty (1992) und Baulcombe (1994) fanden, sowohl unter Verwendung von Nichtstrukturgenen, wie auch von nichttranslatierbaren Hüllproteingenen eine Resistenzwirkung ohne das Vorhandensein von viralem translatierten Protein. Dabei konnten sie einen umgekehrten Zusammenhang zwischen transgener Expression und erhaltener Resistenzwirkung feststellen. Bei diesem Resistenzphänomen ist ausschließlich die transgene RNA für die Resistenzwirkung verantwortlich. Für die Resistenz wurde daher die Bezeichnung RNA-vermittelte Resistenz bzw. „**RNA mediated virus resistance**“ (RmVR) vorgeschlagen. (Dougherty et al., 1994; English et al., 1996). Von Baulcombe (1996) wurde zuerst ein genereller Mechanismus postuliert und in Pflanzen als „**posttranscriptional gene silencing**“ (PTGS) bezeichnet. Aufgrund von Konservierung der Mechanismen in verschiedenen Zelltypen (z.B. Pflanzen, Warmblüter und Pilze), wurde von Baulcombe (2004) vorgeschlagen, den Oberbegriff des „**RNA silencing**“ zu verwenden. Der Mechanismus des „RNA silencing“ kann in transgenen Pflanzen durch verschiedene Konstrukte induziert werden und führt zu unterschiedlichen Formen der Resistenzausprägung. Es können sowohl vollständige nichttranslatierbare virale Gene in „sense“ als auch „antisense“ Orientierung Resistenz erzeugen. Spätere Arbeiten zeigten, dass auch schon Genfragmente für diesen Zweck ausreichend sind. Fragmente viraler Gene müssen jedoch eine Mindestlänge von ca. 400 bps aufweisen, um Resistenz erzeugen zu können (Pang et al., 1997), oder mit einer möglicherweise Transkript stabilisierenden „silencer“ DNA verlängert werden (Jan et al., 2000a und b). Die ausgeprägten Formen der Resistenz variieren unabhängig vom transformierten Konstrukt aber abhängig von der transgenen Insertion im Pflanzengenom zwischen Anfälligkeit, „Recovery“ Resistenz und Infektionsresistenz (Hull, 2002). Bei einer „Recovery“ Resistenz erholen sich die Pflanzen nach anfänglich auftretenden Symptomen von der Infektion und der Neuaustrieb ist virusfrei. Einer möglichen Forderung nach breitwirksamer Resistenz steht die Sequenzspezifität des „RNA silencing“ Mechanismus entgegen. Viren mit einer Sequenzabweichung von mehr als 10% im Bereich der transgenen Sequenz werden von dem Mechanismus nicht mehr erfasst (Prins, 2003). Daher wurde schon früh begonnen, mit aneinander gereihten Genfragmenten verschiedener Virusspezies unter Kontrolle eines Pflanzenpromotors, Resistenz zu erzeugen. Dies gelang erstmalig Prins et al. (1995) und später Jan et al., (2000b).

Ein erhebliches Erschwernis bei der Pflanzentransformation stellte nicht nur die variable zu selektierende Form der Resistenz dar, sondern auch eine mehr oder weniger geringe Anzahl von Transformanden mit dem gewünschten Phänotyp der Infektionsresistenz. Diese Umstände und Beobachtungen führten Waterhouse et al. (1998) zur parallelen Expression von viraler RNA in „sense“ und „antisense“ Orientierung in einem Locus und dem Erhalt einer höheren Anzahl von Transformanden mit Infektionsresistenz. Smith et

al. (2000) verwandten erstmalig virusabgeleitete Sequenzen in Form eines „inverted repeat“ (IR), der durch ein selbstspleißendes Intron oder eine nichthomologe Verbindungsregion getrennt war, zur Expression in transgenen Pflanzen. Dieses IR-Konstrukt führt zur Expression von selbstkomplementärer dsRNA, die den Mechanismus des „RNA silencing“ weitaus effektiver zu induzieren scheint, als „sense“ oder „antisense“ Konstrukte. Die Autoren konnten damit in 100% der regenerierten Transformanten Resistenz etablieren. Wesley et al. (2001) konnten zeigen, dass die minimale Länge der dsRNA zur effizienten Induktion des „RNA silencing“ ca. 100 bps betragen sollte. Durch die transgene Expression von dsRNA viraler Herkunft oder deren Induktion wird der pflanzeigene Resistenzmechanismus bereits vor einer Virusinfektion angeschaltet und somit kann sequenzspezifisch eine Infektionsresistenz erzeugt werden (Chen et al., 2004; Helliwell & Waterhouse, 2005).

Die RNA Viren repräsentieren die größte Gruppe innerhalb der pflanzeninfizierenden Viren. Jedoch werden auch eine Vielzahl von ökonomisch bedeutenden Krankheiten durch DNA Viren verursacht, die sich nicht über replikative dsRNA Intermediate replizieren. Daher waren die Versuche zur Erzeugung von RNA vermittelter Resistenz/RmVR über die Expression von mRNA in „sense“ Orientierung im Vergleich zu RNA Viren weniger erfolgreich (Lomonosoff, 1995). Die Expression von verkürzten oder defekten Struktur- und Nichtstrukturproteinen, die in Wechselwirkung mit der viralen Vermehrung treten, führten häufiger zu resistenten Pflanzen (Duan et al., 1997, Hong et al., 1996, Noris et al., 1996, Brunetti et al., 2001). Da aber auch DNA-Viren ihr Genom über mRNA zur Expression bringen, war die Transformation mit viralen Genen in „antisense“ Orientierung ebenso erfolgreich, wie für RNA-Viren gezeigt (Bendahmane & Gronenborn, 1997; Day et al., 1991; Bejarano & Lichtenstein, 1994). Zusammengefasst stellt somit die dsRNA Expression von viraler genomischer RNA oder mRNA im Falle von DNA-Viren das zurzeit effektivste Konstruktionsprinzip für die Herstellung transgener virusresistenter Pflanzen dar.

### **Dauerhaftigkeit und Risiken von RNA-vermittelter Resistenz**

Ein mögliches Risiko für die Dauerhaftigkeit (neben der hohen Spezifität) ist das Vorhandensein von viralen Suppressoren des „RNA silencing“, die durch wahrscheinlich jedes Virus mit unterschiedlicher Funktion und Effektivität kodiert werden (Moissiard & Voinnet, 2004). Eine Pflanze, die über transgen induziertes „RNA silencing“ Resistenz gegen eine Virusspezies besitzt, kann selbstverständlich weiterhin von anderen Virusspezies, gegen die die Resistenz nicht wirksam ist, wie eine nichttransgene infiziert werden. Exprimiert dieses Virus jedoch ein effizientes Suppressorprotein, kann die „RNA silencing“ basierte Resistenz gegenüber dem Zielpathogen unterdrückt und damit unwirksam werden. Dieses Szenario konnte bereits experimentell belegt werden (Mitter et al., 2001 und 2003; Savenkov & Valkonen, 2001).

Mischinfektionen unterschiedlicher Virusspezies in einer Wirtspflanze treten natürlicherweise häufig auf. Daher ist das skizzierte Risiko nicht unwahrscheinlich und kann möglicherweise nur durch Herstellung von transgenen Pflanzen mit einer auf „RNA

silencing“ basierten Mehrfachresistenz umgangen werden. Ein mögliches biologisches Risiko von transgenen Pflanzen, die in jeder Zelle virale RNA exprimieren, stellt der Mechanismus der viralen Rekombination dar, über den superinfizierende Pflanzenviren sich Funktionen, die vom Transgen kodiert werden, aneignen könnten (Aaziz & Tepfer, 1999, Tepfer et al., 2002). Dies könnte theoretisch zu Viruskrankheiten mit veränderter Qualität führen, wenn das rekombinante Virus einen selektiven Vorteil (z.B. Fitnessgewinn) aus dem Ereignis erhält. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Funktion über Rekombination übertragen wird, hängt von der Art und Länge der transgenen Sequenz viralen Ursprungs ab. Sie muss, um ein mögliches biologisches Risiko definieren zu können, immer mit der Wahrscheinlichkeit für Rekombinationsereignisse in natürlicherweise auftretenden Mischinfektionen in nichttransgenen Pflanzen verglichen werden. Derartige vermutete Ereignisse sind jedoch bisher nicht unter natürlichen Selektionsbedingungen nachgewiesen worden.

### **Die Freisetzung und kommerzielle Nutzung von transgenen virusresistenten Pflanzen**

Nachdem die ersten Arbeiten zur Herstellung von transgenen virusresistenten Pflanzen basierend auf dem Prinzip der pathogenvermittelten Resistenz publiziert und als ein Meilenstein der Virusresistenz erzeugung erkannt waren, wurden transgene virusresistente Pflanzen einer Vielzahl von Pflanzenspezies mit unterschiedlichsten viralen Nukleinsäuren erzeugt und vor allem in den USA zahlreiche Freisetzungsexperimente durchgeführt.

Seit Beginn der Zulassung von transgenen virusresistenten Pflanzenspezies 1994 in den USA für den kommerziellen Anbau, wurden bis heute (Juli 2006) weltweit jedoch nur Kürbis, Papaya und Kartoffeln mit einer Resistenz gegenüber *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon virus 2* (WMV2), *Cucumber mosaic virus* (CMV) und *Papaya ringspot virus* (PRSV) bzw. *Potato leafroll virus* (PLRV) und *Potato virus Y* (PVY) zugelassen. Bis auf die Resistenz gegenüber PLRV durch Expression der viralen Replikase waren alle anderen eingesetzten Gene virale translatierbare Hüllproteinogene (CP) (Tepfer, 2002; <http://www.nbiap.vt.edu/cfdocs/biopetitions2.cfm>). Freisetzungsexperimente von transgenen virusresistenten Pflanzen sind jedoch mit nahezu jeder landwirtschaftlich und vielen gartenbaulich genutzten Pflanzenspezies, transformiert mit unterschiedlichen viralen Genen, durchgeführt worden. Die Internet-Datenbank „Information Systems for Biotechnology“ (<http://www.nbiap.vt.edu/cfdocs/fieldtests3.cfm>, Zugriff Juli 2006) beinhaltet 866 Freisetzungsversuche von transgenen virusresistenten Pflanzen in den USA seit 1987. Darin findet sich eine Vielzahl von Freisetzungsexperimenten der wichtigsten landwirtschaftlichen Nutzpflanzen mit transgen vermittelter Resistenz gegenüber den bedeutendsten Viruskrankheiten (Tabelle 1).

**Tab. 1: Freisetzungsexperimente in den USA von ausgewählten landwirtschaftlich genutzten Kulturpflanzen mit großer wirtschaftlicher Bedeutung, ausgestattet mit transgener Virusresistenz \***

<b>Transgene Kulturpflanzenspezies</b>	<b>Zielvirus</b>
Alfalfa	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)
Erbse	<i>Pea enation mosaic virus</i> (PEMV)
Erdnuss	<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)
	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)
Gerste	<i>Groundnut rosette assistor virus</i> (GRAV)
	<i>Potato spindle tuber viroid</i> (PStV)
	<i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV)
Hafer	<i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV)
Kartoffel	<i>Potato virus Y</i> (PVY)
	<i>Potato leafroll virus</i> (PLRV)
	<i>Potato virus A</i> (PVA)
	<i>Tabacco ratte virus</i> (TRV)
Mais	<i>Maize dwarf mosaic virus</i> (MDMV, MDMV-B)
	<i>Maize chlorotic mottle virus</i> (MCMV)
Paprika	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
Pflaume	<i>Plum pox virus</i> (PPV)
Salat	<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)
	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)
Sojabohne	<i>Bean pod mottle virus</i> (BPMV)
	<i>Soybean mosaic virus</i> (SbMV, SMV)
Süßkartoffel	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV)
Tomate	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)
	<i>Potato virus Y</i> (PVY)
	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
	<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)
	<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)
	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)
	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)
	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)
Wein	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV)
	<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)
Weizen	<i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV)
	<i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV)
Zuckerrohr	<i>Sorghum mosaic virus</i> (SrMV)
	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i> (SCYLV)
Zuckerrübe	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV)

\*Daten extrahiert aus <http://www.nbiap.vt.edu/cfdocs/fieldtests3.cfm> (Juli 2006)

Die hier dargestellte Auswahl zeigt, welche Bedeutung dieser Technologie in der Forschung und modernen Pflanzenzüchtung beigemessen wird und wie weit die

Methodik der Pflanzentransformation für unterschiedlichste pflanzliche Spezies, die eine Voraussetzung für die Nutzung der Technik darstellt, bereits fortgeschritten ist. Die Gründe für die bisher fehlende breite kommerzielle/praktische Nutzung von transgenen virusresistenten Pflanzen sind vielschichtig.

Einerseits fehlt es bisher an gesellschaftlicher Akzeptanz von genetisch modifizierten Pflanzen oder daraus erzeugten Nahrungs- und Futtermitteln. Die dazu geführte politische, ethische und gesellschaftliche Diskussion soll jedoch nicht Gegenstand dieser Übersichtsdarstellung sein. Andererseits sind mit dem Anbau auch von transgenen virusresistenten Pflanzen mögliche biologische Risiken verknüpft (s.o.). Zu einer detaillierten Diskussion dieser möglichen Risiken sei auf exzellente Übersichtsartikel verwiesen (Tepfer & Balázs, 1997; Aaziz & Tepfer, 1999; Tepfer, 2002).

### **Erzeugung von Virusresistenz in transgenen Pflanzen durch Expression von rekombinanten virusspezifischen Antikörpern**

Die Palette der antiviralen Strategien durch Erzeugung von transgenen Pflanzen kann durch Expression von rekombinanten Antikörpern, die ein virales Protein physikalisch binden und damit mit dem Vermehrungszyklus des Virus interferieren, komplementiert werden. Schon 1993 konnten Tavladoraki et al. mit der Expression von rekombinanten „single chain Fragment variable“ (scFv) Antikörpern gegen ein Tombusvirus, die erzeugten transgenen Pflanzen teilweise gegenüber einer Virusinfektion mit dem Virus, gegen dessen Hüllprotein der Antikörper gerichtet war, schützen und die Symptomentwicklung verzögern. Ähnliches konnte von Fecker et al. (1997) am Beispiel von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen transformiert mit spezifischen scFv Antikörpern gegen das Hüllprotein von *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) beobachtet werden. Effektiver kann die transgene Expression von scFv Antikörpern gegen funktionelle Nichtstrukturproteine, wie z.B. das virale Replikationsenzym, die RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRP) oder virale Protease, eine Virusinfektion verhindern (Boonrod et al., 2004; Gargouri-Bouzid et al., 2006). Prins et al. (2005) zeigten jedoch auch, dass unter Umständen mehrere Antikörper selektiert und auf ihre Resistenzvermittlung überprüft werden müssen, bevor effektive Virusresistenz erhalten werden kann. Im Vergleich zu Verfahren der RNA-vermittelten Resistenz besitzt diese Technik Nachteile, weil eine Wirkungssicherheit aufgrund des noch fehlenden Verständnisses der einzelnen Schritte des Lebenszyklus unterschiedlicher viraler Spezies schwerer vorhersehbar ist und weil mögliche biologische Risiken, die sich aus der artübergreifenden Expression von Antikörpern aus Warmblüterorganismen in Pflanzen und damit in Nahrungsmitteln und Tierfutter ergeben können, nur wenig untersucht sind.

### **Herstellung transgener virusresistenter Pflanzen durch Übertragung von Virusresistenzgenen (R-Gene) mittels Pflanzentransformation**

In Gen-für-Gen Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen vermitteln dominante oder semidominante R-Gene Inkompatibilität bei Vorhandensein von korrespondierenden

Avirulenzgenen (*Avr*) auf Seiten des Pathogens. Dieser R-Gen basierte Mechanismus vermittelt Resistenz gegenüber Pilzen, Bakterien, Nematoden und Pflanzenviren. Die natürlich vorhandene monogene Resistenz stellt eine in vielen Fällen züchterisch nutzbare, wertvolle Möglichkeit zur Kontrolle von Pflanzenkrankheiten dar. Für eine Übersicht zu Aufbau und Funktion von R-Genprodukten, die konservierte gemeinsame Eigenschaften aufweisen, sei auf Übersichtsartikel verwiesen (Hammond-Kosack & Jones, 1997; Richter & Ronald, 2000; Soosaar et al., 2005). Zu den R-Gen vermittelten Resistenzreaktionen/Verteidigungsantworten nach einer Virusinfektion gehört die **Extreme Resistenz** (ER) und die **Hypersensitive Resistenz** (HR). ER funktioniert auf Ebene der erstinfizierten Zelle(n), die R-Gen vermittelt die Replikation des infizierenden Virus nicht unterstützen und somit eine Virusausbreitung verhindern. Beispiele stellen *Rx*-Gene der Kartoffel gegenüber *Potato virus X* dar, welche Resistenz auf Protoplastenebene vermitteln (Bendahmane et al., 1997, 1999, 2000). Die HR umfasst programmierten Zelltod im Bereich der Infektion. Dieser Zelltod manifestiert sich als diskrete Lokalläsion. Die Virusreplikation beschränkt sich auf die Zellen der Läsion und des umgebenden Bereiches. Damit ist die Pflanze vor einer systemischen Ausbreitung des infizierenden Virus geschützt.

Das bekannteste Beispiel stellt das *N*-Gen aus *Nicotiana glutinosa* dar, welches eine HR gegenüber *Tobacco mosaic virus* TMV verleiht (Whitham et al., 1994). Pflanzliche R-Genprodukte führen zu einer direkten oder indirekten Erkennung von Avirulenz-Determinanten/Genprodukten des Virus. Nur mittels einer Signaltransduktion, die über spezifische primäre und sekundäre „Messenger“ Substanzen und Effektoren, physiologische Veränderungen und Transkriptionsaktivitäten induziert, werden die Resistenzreaktion und der Zelltod ausgelöst. Wurde ein pflanzliches R-Gen isoliert und ist seine Sequenz bekannt, so besteht prinzipiell die Möglichkeit, es in andere Pflanzenspezies zu übertragen, um dort eine vergleichbare Resistenz zu erzeugen. Dies kann auf klassischem züchterischem Weg, oder über Methoden der Pflanzentransformation erreicht werden. Zum Beispiel konnte das *Rx1* Gen aus Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) isoliert, erfolgreich in *Nicotiana benthamina* und *Nicotinana tabacum* übertragen werden und vermittelte dort Resistenz gegenüber PVX (Bendahmane et al., 1999).

Ein weiterer Beweis für die Funktionalität von isolierten R-Genen in heterologen Spezies konnte von Whitham et al. (1996) am Beispiel der Übertragung des *N*-Gens aus *Nicotinana glutinosa* in Tomate (*Lycopersicon esculentum*) geführt werden. Diese Arbeiten zeigen exemplarisch, dass ein Transfer von R-Genen, in diesen Fällen innerhalb der Familie *Solanaceae*, erfolgreich durchgeführt werden konnte, weil andere Faktoren der Signaltransduktion speziesübergreifend vorhanden und funktionell sind. Auch andere gegenüber pilzlichen oder bakteriellen Pathogenen wirksame R-Gene wie *Cf-9* und *Pto* aus *L. esculentum*, die Resistenz gegenüber *Cladosporium fulvum* (*Cf-9*; siehe auch den Artikel von Stahl, Schmidt und Nehls in diesem Heft) respektive *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) vermitteln, funktionieren nach Transformation in andere Spezies der

gleichen Gattung wie *Pto* in *Nicotiana* spp. (Thilmony et al., 1995) und *Cf-9* in Kartoffel und Tabak (Hammond-Kosack et al., 1998).

Diese Beispiele für die erfolgreiche Übertragung von R-Genen innerhalb einer Familie demonstrieren, welche viel versprechenden Möglichkeiten die direkte Übertragung von pflanzlichen R-Genen mittels Pflanzentransformation zur Resistenzерzeugung im Vergleich zur konventionellen Züchtung bietet. Diese Beispiele lassen jedoch keine verallgemeinernde Rückschlüsse bezüglich der artübergreifenden Funktionalität von Signaltransduktionswegen der Resistenz zu, so dass für jede Übertragung eines identifizierten und isolierten R-Gens das Risiko besteht, im Zielorganismus aufgrund des Fehlens von Einzelfaktoren der Signaltransduktion nicht zu funktionieren.

### **Weitere Verfahren**

Eine Erzeugung von Virusresistenz in transgenen Pflanzen konnte durch die Expression von verschiedenen anderen Genen erzeugt werden. Dazu gehört die Expression von Ribosom-inaktivierenden Proteinen (Tumer et al., 1999) und von dsRNA spezifischen Nukleasen (Watanabe et al., 1995). Auf die einzelnen Wirkungsmechanismen und eine mögliche praktische Nutzung soll hier nicht weiter eingegangen werden, da bisher mit keinem der untersuchten Verfahren eine mit dem „RNA silencing“ vergleichbare Wirkung erreicht werden konnte und keines der Verfahren andere Vorteile bieten kann.

### **Vor- und Nachteile von gentechnisch erzeugter Virusresistenz im Vergleich zu konventioneller Resistenz gegenüber Pflanzenviren**

Die in dieser Übersicht vorgestellten Verfahren zur Erzeugung von Virusresistenz in transgenen Pflanzen sollen an dieser Stelle mit natürlich vorkommenden und mittels klassischen Züchtungsverfahren nutzbaren monogenen und polygenen Resistenzen verglichen werden. Die Betrachtung soll dabei in der Hauptsache auf den Aufwand für die Herstellung bzw. Nutzbarmachung der Resistenz, ihre Dauerhaftigkeit und breite Wirksamkeit der Resistenz beschränkt bleiben. Aspekte der biologischen Sicherheit sollen zusammenfassend betrachtet werden (s.u.), sich auf das Transgen beschränken und Markergene ausklammern. Grundsätze der ethischen Bewertung oder der Akzeptanz von genetisch veränderten Pflanzen in der Gesellschaft können nicht Gegenstand dieser Übersicht sein.

Eine prinzipielle Voraussetzung für die Nutzung von „RNA mediated virus resistance“ (RmVR) ist ein vorhandenes Pflanzentransformationsverfahren (mit akzeptabler Effizienz). Ein entscheidender Vorteil von transgenen virusresistenten Pflanzen ist die im Vergleich zur konventionellen Züchtung relativ einfache Resistenzерzeugung. Um die in Wildformen der Kulturpflanze natürlich vorkommenden Virusresistenzen mittels klassischer Züchtung nutzen zu können, müssen unter Umständen Kreuzungsbarrieren überwunden werden, zumindest jedoch in mehrfachen Rückkreuzungen der genetische Hintergrund der Wildform gegen den der Kulturform ausgetauscht werden, um die in langjährigen Zuchtprogrammen erworbenen Eigenschaften der Hohertragsorten zu

erhalten. Die transgene Virusresistenz kann dagegen direkt in (Hochleistungs-) Zuchtlinien erzeugt werden. Ist die natürlich vorkommende Resistenz polygen und sind nicht alle Einzelfaktoren (Major- und Minorgene) bekannt, so muss selbst bei Vorhandensein von genetischen Markern oder einem einfachen Biotest für die Resistenz ein sehr hoher Selektionsaufwand betrieben werden, um nicht Einzelfaktoren zu verlieren und damit die polygene Resistenz zu schwächen.

Die transgene Virusresistenz geht auf einen bekannten Locus zurück, der, einmal über Pflanzentransformation eingebracht, auch in einer nachfolgenden konventionellen Züchtung leicht selektiert werden kann. Nicht vorhersehbar ist jedoch, ob der zugrunde liegende Mechanismus des „RNA silencing“ auch in späteren Nachkommenschaften aus klassischen Kreuzungen noch induziert sein wird. Auf einen Biotest zur Überprüfung der Virusresistenz kann daher wahrscheinlich auch weiterhin nicht verzichtet werden. Die Vorteile der einfachen und relativ schnellen Resistenzherzeugung gelten ebenfalls für alle anderen Verfahren, die Virusresistenz über Methoden der Pflanzentransformation generieren (R-Gen Übertragung, virusspezifische Antikörper etc.).

Ein klarer Nachteil der RmVR ist die hohe Spezifität bzw. die fehlende Wirksamkeit gegenüber Virusspezies mit einer Divergenz der Nukleinsäuresequenz von ca. mehr als 10%. Vergleicht man jedoch diese Spezifität mit der von natürlichen Resistenzgenen (R-Gene) so wird deutlich, dass in vielen Fällen monogene Resistenzen überwindende Isolate sich in nur wenigen bis sogar nur einer einzigen Aminosäure im Avirulenzgenprodukt unterscheiden und damit die Resistenz überwinden können, weil das Avirulenzgenprodukt zum Pathogenitätsfaktor wird. Beispiele dafür können für die TMV Replikase und *N* (Padgett et al., 1997), das *Tomato mosaic virus* (ToMV) Transportprotein und *Tm-2<sup>2</sup>* (Weber et al., 1993) sowie das PVX Hüllprotein und *Nx* (Santa Cruz & Baulcombe, 1993) genannt werden. Pflanzenviren liegen als dynamische Population einer so genannten Quasi-Spezies vor und sind durch häufige Replikation in der Lage sich sehr schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Roossinck, 1997; Holland & Domingo, 1998; Garcia-Arenal et al., 2003). Ob eine natürlich vorkommende monogene Resistenz schnell durch Isolate mit variablen Avirulenzgenprodukten überwunden werden kann, hängt davon ab, welchen Fitnessverlust das Virus durch die Mutation erwirbt. Dies gilt selbstverständlich auch für die Überwindung einer transgenen Resistenz, die durch Übertragung von R-Genen oder durch Transformation mit virusspezifischen Antikörpern erzeugt wurde. Wie schnell durch den Anbau von transgenen Pflanzen mit RmVR sequenzvariable und damit resistenzüberwindende pathogene Isolate oder Spezies selektiert werden, ist nicht untersucht und kann nicht vorhergesagt werden. Bei Kenntnis eines Isolatspektrums einer Virusspezies kann jedoch über Sequenzvergleiche ein hochkonservierter Bereich des Genoms für die Transformation gewählt und damit die Wahrscheinlichkeit, schnell resistenzüberwindende Isolate zu selektieren möglicherweise reduziert werden. Sollte sich eine Spezifität im Bereich von 10% Sequenzvariabilität (Prins, 2003) in praktischen Studien als reproduzierbar/sicher zeigen, wird sich eine transgene auf „RNA silencing“

basierte Resistenz in diesem Punkt im Vergleich zu einer natürlich vorkommenden Resistenz als möglicherweise dauerhafter erweisen. Unbekannt ist jedoch, wie schnell z.B. aus der Population eines Pflanzenvirus, welches über transgen induziertes „RNA silencing“ an einer systemischen Infektion gehindert wird, Mutanten selektiert werden, die effektivere Suppressorproteine besitzen und damit in der Lage sind, die Resistenz zu überwinden. Trotzdem kann bei etablierten effizienten Pflanzentransformationsverfahren und Kenntnis der Sequenz eines aufgetretenen resistenzüberwindenden Virusisolates, welches avirulente Isolate, in der Viruspopulation verdrängt, weitaus schneller reagiert werden, als mit konventionellen Verfahren. Eine mögliche Achillesferse der Nutzung von RmVR stellt möglicherweise nur die Infektion der transgenen Pflanze mit anderen viralen Spezies dar, gegen die die Resistenz nicht gerichtet ist und die für effektive Suppressorproteine des „RNA silencing“ kodieren. Dies kann wahrscheinlich nur über die Erzeugung von transgenen Mehrfachresistenzen gelöst werden.

### **Gesamtbewertung und Ausblick**

Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass alle hier vorgestellten biotechnologischen Verfahren ohne Zweifel eine Bereicherung und Komplementation der bisher verfügbaren Möglichkeiten zur Bekämpfung von Viruskrankheiten an Kulturpflanzen mittels konventioneller Resistenzzüchtung darstellen. Betrachtet man die möglichen biologischen Risiken von transgenen virusresistenten Pflanzen für die einzelnen vorgestellten Verfahren und Techniken (s.o.) vergleichend, so wird deutlich, daß Hüllprotein- oder Protein-vermittelte Resistenz aufgrund der Expression von viralen Proteinen und den damit möglicherweise verbundenen Risiken im Vergleich zur RNA-vermittelten Expression mehr Nach- als Vorteile aufweisen und daher wahrscheinlich als praktisch nutzbarer Ansatz zukünftig keine wichtige Rolle spielen werden. Die Nutzung von viruspezifischen Antikörpern stellt einen interessanten und eleganten Ansatz dar, der jedoch wahrscheinlich aus Erwägungen der Nahrungsmittelsicherheit nicht genutzt werden wird. Ganz anders dagegen die Übertragung von R-Genen, die jedoch z.Zt. noch einen sehr hohen Arbeitsaufwand für die R-Gen Identifizierung und Isolation erfordern. R-Gene stellen aber einen erfolgversprechenden zukünftigen Weg der (Virus-) Resistenzzüchtung dar, der wahrscheinlich frei von biologischen Risiken ist. Der im Falle der Transformation mit viralen Sequenzen präinfektionell induzierte adaptive pflanzeigene Virusresistenzmechanismus des „RNA silencing“ stellt ein bisher beispiellos elegantes System der Nutzung von biotechnologischen Verfahren zur pflanzlichen Resistenzzeugung dar. Betrachtet man mögliche biologische Risiken dieser Technik, so kann konstatiert werden, dass es sich hier um das Verfahren mit den vergleichbar geringsten biologischen Risiken handelt, da keine funktionellen viralen Proteine, sondern nur kurze Genfragmente exprimiert werden. Damit ist selbst theoretisch nicht davon auszugehen, dass mittels Rekombination Funktionen auf superinfizierende Viren übertragen werden können. Bezüglich Dauerhaftigkeit der Resistenz und Variabilität der Erreger stellen Viren generell die Pathogene mit der höchsten Variabilität

und schnellsten Anpassungsfähigkeit aufgrund der kompakten Genome und häufiger Replikation ohne Fehlerkorrekturfähigkeit dar. Andererseits kann die genetische Variabilität einer Viruspopulation in vielen Fällen im Vergleich zu anderen Pflanzenpathogenen relativ leicht erfasst werden und das Verfahren der RmVR erlaubt unter Umständen zukünftig ein flexibleres Resistenzmanagement als konventionelle Resistenzzüchtungsverfahren.

## Literatur

- Aaziz R, Tepfer M., 1999: Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J Gen Virol* **80**, 1339–46.
- Agrios, G.N., 1998: *Plant Pathology*. 3th ed. Academic Press, San Diego.
- Baulcombe, D., 2004: RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- Baulcombe, D., 2005: RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 290-293.
- Baulcombe, D.C., 1994: Replicase mediated resistance: A novel type of virus resistance in transgenic plants. *Trends in Microbiology* **2**, 60-63.
- Bejarano, E.R., & Lichtenstein, C.P., 1994: Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. *Plant Mol Biol* **24**, 241-248.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. & Baulcombe, D. C. 1999: The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**, 781-791.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K.V., and Baulcombe, D.C. 1997: High resolution and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor Appl Genet* **95**, 153–162.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. & Baulcombe, D.C., 2000 : Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J* **21**, 73-81.
- Bendahmane, M., & Gronenborn, B., 1997: Engineering resistance against *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCU) using antisense RNA. *Plant Mol Biol* **33**, 351-357.
- Bendahmane, M., Fitchen, J.H., Zhang, G., & Beachy, R.N., 1997: Studies of Coat Protein-Mediated Resistance to tobacco mosaic tobamovirus: Correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* **71**, 7942-7950.
- Bianchardi, E., Lewellen, R.T., Biaggi, M., Erichsen, A.W. & Stevanato, P., 2002: The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica*, **127**, 383-397.
- Boonrod, K., Galetzka, D., Nagy, P.D., Conrad, U., & Krczal, G., 2004: Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nat Biotechnol* **22**, 856-862.
- Bowers, J.H., Bailey, B.A., Hebbar, P.K., Sanogo, S., & Lumsden, R.D. 2001: The impact of plant diseases on world chocolate production. Online. *Plant Health Progress* DOI:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV.

- Brommonschenkel, S.H., & Tanksley, S.D. (1997): Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the Sw-5 tospovirus resistance gene in tomato. *Mol Gen Genet* 256, 121-126.
- Brunetti, A., Tavazza, R., Noris, E., Lucioli, A., Accotto, G.P., & Tavazza, M., 2001: Transgenically expressed T-Rep of *tomato yellow leaf curl Sardinia virus* acts as a trans-dominant-negative mutant, inhibiting viral transcription and replication. *J Virol* 75, 10573-10581.
- Chen, Y.K., Lohuis, H., Goldbach, R., & Prins, M., 2004: High frequency induction of RNA-mediated resistance against Cucumber mosaic virus using inverted repeat constructs. *Molecular Breeding* 14, 215-226.
- Cooper, B., Schmitz, I., Rao, A.L.N., Beachy, R.N. & Dodds, J.A., 1996: Cell to cell transport of movement defective cucumber mosaic and tobacco mosaic virus in transgenic plants expressing heterologous movement proteins. *Virology* 216, 208-213.
- Costa, A.S., & Müller, G.W., 1980: Tristeza control by cross protection a U.S. Brazil cooperative success. *Plant Disease* 64, 538-541.
- Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Langara, A., & Turner, D.S. 1997: Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385, 781-782.
- Day, A.G., Bejarano, E.R., Buck, K.W., Burrell, M., & Lichtenstein, C.P., 1991: Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus *tomato golden mosaic virus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6721-6725.
- Ding, S.W., Li, H., Lu, R., Li, F., & Li, W.X., 2004: RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res* 102, 109-115.
- Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S., & Proebsting, W.M., 1994: RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant-Microbe Interact* 7, 544-552.
- Duan, Y.P., Powell, C.A., Webb, S.E., Purcifull, D.E., & Hiebert, E., 1997: Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing mutated BC1 protein. *Mol Plant Microbe Interact* 10, 617-623.
- Dudley, N.R., & Goldstein, B., 2003: RNA interference: silencing in the cytoplasm and nucleus. *Curr Opin Mol Ther* 5, 113-117.
- Dunoyer, P., & Voinnet, O. 2005: The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 415-423.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., & Tuschl, T., 2001: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elmayan, T., & Vaucheret, H., 1996: Single copies of a 35S-driven transgene can undergo post-transcriptional silencing at each generation or can be transcriptionally inactivated in trans by a 35S silencer. *Plant J* 9, 787-797.

- English, J. J. Mueller, E., & Baulcombe, D.C., 1996: Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8, 179-188.
- Fecker, L.F., Koenig, R., & Obermeier, C., 1997: *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Arch Virol* 142, 1857-1863.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A., & Pillai, R.S., 2005: Posttranscriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 331-341.
- Fitchen, J.H., and Beachy, R.N., 1993: Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu Rev Microbiol* 47, 739-763.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J.M., 2003: Variation and evolution of plant virus populations. *Int Microbiol* 6, 225-232.
- Gargouri-Bouazid, R., Jaoua, L., Rouis, S., Saidi, M.N., Bouaziz, D., & Ellouz, R., 2006: PVY-Resistant Transgenic Potato Plants Expressing an Anti-NIa Protein scFv Antibody. *Mol Biotechnol* 33, 133-140.
- Hackland, A. F., Rybicki, E. P. and Thomson, J. A., 1994: Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. *Arch Virol* 139, 1-22.
- Haddidi, A., Khertarpal, R.K., and Koganezawa, H. (eds.). 1998: *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, MN.
- Hamilton, A.J., & Baulcombe, D.C., 1999: A novel species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing. *Science* 286, 950-952.
- Hamilton, A.J., Voinnet, O., Chappell, L., & Baulcombe, D.C., 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21, 4671-4679.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon G.J., 2000: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hammond-Kosack, K. E., Tang, S., Harrison, K., & Jones, J. D. G. 1998: The tomato Cf-9 disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product *Avr9*. *Plant Cell* 10, 1251-1266.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G., 1997: Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 48, 575-607.
- Helliwell, C.A., & Waterhouse, P.M., 2005: Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Enzymol* 392, 24-35.
- Hemenway, C., Fang, R.X., Kaniewski, W., Chua, N.H., & Tumer, N.E., 1988: Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the *potato virus X* coat protein or its antisense RNA. *EMBO J* 7, 1273-1280.
- Holland, J.J., & Domingo, E., 1998: Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* 16, 13-21.

- Hong, Y., Saunders, K., Hartley, M.R., & Stanley, J., 1996: Virus resistance in *Nicotiana benthamiana* conferred by *African cassava mosaic virus* replication-associated protein (AC1) transgene. *Virology* 220, 119-127.
- Hull, R. & Davies, J.W. 1992: Approaches to nonconventional control of plant virus diseases. *Crit Rev Plant Sci* 11, 17-33.
- Hull, R. 2002: *Matthew's Plant Virology*. 4th Edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Jakab, G., Vaistij, F.E., Droz, E. & Malnoe, P., 1997: Transgenic plants expressing viral sequences create a favourable environment for recombination between viral sequences. In: Balacz, E. and Tepfer, M., (Editors), *Virus resistant transgenic plants: potential ecological impact*. pp. 45-50: Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Jan, F. J. Fagoaga, C. Pang, S. Z., & Gonsalves, D., 2000a: A minimum length of N gene sequence in transgenic plants is required for RNA-mediated tospovirus resistance. *J Gen Virol* 81, 235-242.
- Jan, F. J. Fagoaga, C. Pang, S. Z., & Gonsalves, D., 2000b: A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J Gen Virol* 81, 2103-2109.
- Lapidot, M., Gafney, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W.J. & Beachy, R.N., 1993: A dysfunctional movement protein of Tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant Journal* 4, 959-970.
- Li, W.X., & Ding, S.W., 2001: Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* 12, 150-154.
- Lindbo, J.A., & Dougherty, W.G., 1992: Untranslatable transcripts of the Tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with Tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189, 725-733.
- Lindbo, J.A., & Dougherty, W.G., 2005: *Plant Pathology and RNAi: A Brief History*. *Annu Rev Phytopathol* 43, 1-7.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., & Dougherty, W.G. 1993: Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5, 1749-1759.
- Loebenstein, G., 1962: Inducing partial protection in the host plant with native virus protein. *Virology* 17, 574-581.
- Loesch Fries, L.S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L. & Hill, K., 1987: Expression of Alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO Journal* 6, 1845-1851.
- Lomonosoff, G. P. 1995: Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 33, 323-343.
- McKinney, H.H., 1929: Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research* 39, 557-578.

- Mitter, N., Sulistyowati, E., & Dietzgen, R.G., 2003: Cucumber mosaic virus infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to *Potato virus Y* in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 936-944.
- Mitter, N., Sulistyowati, E., Graham, M. W., & Dietzgen, R.G., 2001: Suppression of gene silencing: A threat to virus-resistant transgenic plants? *Trends Plant Sci* 6, 246-247.
- Moissiard, G., & Voinnet, O., 2004: Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Pathol* 5, 71-82.
- Morozov, S.Y., Fedorkin, O.N., Juttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D.C. & Atabekov, J.G., 1997. Complementation of a Potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *Journal of General Virology* 78, 2077-2083.
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. 1990: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Nelson, R. S., P. Powell-Abel, and R. N. Beachy. 1987: Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. *Virology* 158,126-132.
- Noris, E., Accotto, G.P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., & Tavazza, M., 1996: Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* 224, 130-138.
- Padgett,H.S., Watanabe,Y, & Beachy, R.N., 1997: Identification of the TMV Replicase Sequence That Activates the N Gene–Mediated Hypersensitive Response. *MPMI* 10, 709-715.
- Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M., & Vaucheret, H., 1997: Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16, 4738-4745.
- Palukaitis, P., & Zaitlin, M. 1997: Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Adv. Virus Res* 48, 349-377.
- Pang, S.Z., Jan, F.J., & Gonsalves, D., 1997: Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA- mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8261-8266.
- Powell, P.A., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. & Beachy, R.N., 1986: Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743.
- Powell, P.A., Sanders, P.R., Tumer, N., Fraley, R.T. & Beachy, R.N., 1990: Protection against Tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than than coat protein RNA sequences. *Virology* 175, 124-130.
- Prins, M., & Goldbach, R., 1998: The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends. Microbiol.* 6, 31-35.

- Prins, M., 2003: Broad virus resistance in transgenic plants *Trends in Biotechnology* 21, 373-375.
- Prins, M., de Haan, P., Luyten, R., van Veller, M., van Grinsven, M.Q., & Goldbach, R., 1995: Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequence. *Mol. Plant Microbe Interact* 8, 85-91.
- Prins, M., Lohuis, D., Schots, A., & Goldbach, R., 2005: Phage display-selected single-chain antibodies confer high levels of resistance against Tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* 86, 2107-2113.
- Ratcliff, F., Harrison, B. D. & Baulcombe, D.C., 1999. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558-1560.
- Ratcliff, F., MacFarlane, S. and Baulcombe, D.C. 1999: Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207-1215.
- Richard-Molard, M.S. & Cariolle, M., 2001: Stress hydrique et abiotique et amélioration genetique. Proc. IIRB 64th Cong. Bruges, Belgium. pp. 153–158.
- Richter, T.E., & Ronald, P.C., 2000: The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol Biol* 42, 195-204.
- Roossinck, M.J., 1997: Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35, 191-209.
- Sanford, J.C., & Johnston, S.A.. 1985: The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* 113, 395-405.
- Santa Cruz, S., & Baulcombe, D.C., 1993 : Molecular analysis of potato virus X isolates in relation to the potato hypersensitivity gene *Nx*. *MPMI* 6, 707-714.
- Savenkov, E.I., & Valkonen, J.P.T., 2001: Coat protein gene-mediated resistance to *Potato virus A* in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J Gen.Virol* 82, 2275-2278.
- Schuchert, W., Rohde, W., and Peerenboom, E. 1996: Die virusresistente Kartoffel. *MPIZ aktuell* 02,1-4
- Silhavy, D., & Burgyan, J. 2004: Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci* 9, 76-83.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., & Waterhouse, P.M., 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-20.
- Soosaar, J.L., Burch-Smith, T.M., & Dinesh-Kumar, S.P., 2005: Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat Rev Microbiol* 3, 789-798.
- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., & Kilby, N.J. 2004: Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol Biol* 54, 157-174.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., & Zamore, P.D., 2003: A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17, 49-63.

- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A., & Galeffi, P., 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366, 469-472.
- Tepfer, M. & Balázs, E. (editors), 1997: Virus-Resistant Transgenic Plants : Potential ecological Impact. Versailles & Heidelberg : INRA & Springer-Verlag.
- Tepfer, M., 2002: Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu Rev Phytopathol* 40, 467-491.
- Thilmony, R.L., Chen, S., Bressan, R.A., and Martin, G.B., 1995: Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing *AvrPto* *Plant Cell* 7, 1529-1537.
- Tumer, N.E., Hudak, K., Di, R., Coetzer, C., Wang, P., & Zoubenko, O., 1999: Pokeweed antiviral protein and its applications. *Curr Top Microbiol* 240, 139-158.
- Tumer, N.E., Kaniewski, W., Haley, L., Gehrke, L., Lodge, J.K., and Sanders, P., 1991: The second amino acid of alfalfa mosaic virus coat protein is critical for coat protein-mediated protection. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2331-2335.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., & Stuitje, A.R., 1990: Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299.
- Voinnet O. 2001: RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17, 449-459.
- Voinnet, O. 2005: Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6, 206-220.
- Voinnet, O., & Baulcombe, D.C., 1997: Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389, 553.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C., 1999: Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14147-14152.
- Wang, M.-B., & Waterhouse, P.M. 2000: High-efficiency silencing of a  $\beta$ -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but independent of DNA methylation. *Plant Mol Biol* 43, 67-82.
- Watanabe, Y., Ogawa, T., & Takahashi, H., Ishida, I., Takeuchi, Y., Yamamoto, M., & Okada, Y., 1995: Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific Ribonuclease *FEBS Lett* 372, 165-168.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., & Wang, M.B., 1998: Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13959-13964.
- Weber, H., Schultze, S., & Pfitzner, A.J.P., 1993: Amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confers the ability to overcome the *Tm2<sup>2</sup>* resistance gene in tomato. *J Virol* 67, 6432-6438.

- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., & Waterhouse, P., 2001: Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27, 581-590.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., & Baker, B.J., 1994: The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78, 1101-1115.
- Whitham, S., McCormick, S., & Baker, B., 1996: The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8776-8781.
- Wu, X., Beachy, R.N., Wilson, T.M.A., and Shaw J.G., 1990: Inhibition of uncoating of tobacco mosaic particles in protoplasts from transgenic tobacco plants that express the viral coat protein gene. *Virology* 179, 893-895.
- Yusibov, V., and Loesch-Fries, S. 1995: High-affinity RNA-binding domains of alfalfa mosaic virus coat protein are not required for coat protein-mediated resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8980-8984.