

Untersuchungen über den Einfluss von Zuckerrüben, die Genom-Teile des A-Typs des *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) exprimieren, auf Populationen anderer BNYVV-Stämme und anderer Viren

Renate Koenig¹ und Georg Büttner²

¹ Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA),
Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit,
Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

² Institut für Zuckerrübenforschung,
Holtenser Landstr. 77, 37079 Göttingen

Zusammenfassung

Durch Expression viraler Genomteile in transgenen Pflanzen lässt sich oft ein hoher Grad von Virusresistenz erreichen. In zunehmendem Maße wird jedoch auch auf Gefahren dieser Strategie hingewiesen, zu denen es durch Rekombinationen zwischen der viralen *messenger* RNA (mRNA) aus dem Transgen und der genomischen RNA von mehr oder weniger entfernt verwandten anderen Virusstämmen oder anderen Viren kommen könnte. Derartige Rekombinationen können zur Entstehung von Viren mit veränderter Pathogenität führen. Computeranalysen von veröffentlichten Virusgenomsequenzen haben ergeben, dass bei einigen Viren die Genome stärker zu Rekombinationen neigen als bei anderen. Auf Freisetzungsfeldern und in Modellversuchen im Gewächshaus, in denen versucht werden soll, die Evolution zu beschleunigen, soll geprüft werden, ob Zuckerrüben, die Genomteile des A-Typs des *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) exprimieren, einen Einfluss auf Populationen anderer BNYVV-Stämme und anderer bodenbürtiger Viren haben und ob Rekombinationen auch in mischinfizierten nicht-transgenen Pflanzen zu beobachten sind.

Abstract

Transgenic plants which express parts of viral genomes often show a high degree of virus resistance. There is a certain risk, however, that the expressed viral genome sequences may recombine with the genomes of other strains of the same virus or of other viruses. Recombinations may also occur under natural conditions in mixed infections, and in rare occasions it has been found that viruses with a recombined genome show an increased pathogenicity. Computer analyses of published virus sequences have revealed that with some viruses recombinations occur much more frequently than with others. So far it is not known whether recombinations may take place between the various types of the rhizomania virus (*beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV) in natural mixed infections or in transgenic plants which express the coat protein of one BNYVV type and become infected with another BNYVV type. In order to obtain information of whether recombinations are

likely to occur with BNYVV in transgenic plants and in mixed infections, we plan model experiments in the greenhouse in which several generations of sugar beets are grown per year in the same soil. In addition, we will check whether an uptake of A-type coat protein gene by B- and P-type populations of BNYVV has taken place in fields in which transgenic beets expressing A-type BNYVV coat protein gene have previously been grown.

Einleitung

Von einer deutschen Züchterfirma wurden transgene Zuckerrüben hergestellt, die das Hüllproteingen des A-Typs des Rhizomania-Virus (*beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV) enthalten. In den deutschen Rübenanbaugebieten ist der B-Typ des BNYVV vorherrschend, allerdings werden auch Mischinfektionen mit A- und B-Typ in zunehmendem Maße beobachtet (Koenig et al., 1995). Im Gebiet um die französische Stadt Pithiviers kommt der P-Typ des BNYVV vor (Koenig et al., 1997). Wir wollen prüfen, ob es langfristig zu Rekombinationen zwischen der aus dem Transgen transkribierten BNYVV-A-Typ mRNA und der genomischen RNA anderer BNYVV-Typen oder anderer bodenbürtiger Viren kommen kann und ob derartige Vorgänge auch in mischinfizierten, nicht-transgenen Pflanzen zu beobachten sind. Dazu sollen sowohl Untersuchungen auf Freisetzungsfeldern als auch Modellversuche im Gewächshaus durchgeführt werden.

Stand der Wissenschaft

Rekombinationen von Virusgenomteilen haben bei der Evolution von Viren anscheinend eine wichtige Rolle gespielt. Sequenzanalysen haben deutlich gemacht, dass die meisten Virusgenome ein Mosaik von Genomelementen unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft darstellen (z.B. Morozov *et al.*, 1989; Simon und Bujarski, 1994). Austausch von Genomelementen wurden nicht nur zwischen verschiedenen genomischen viralen RNAs festgestellt, sondern auch zwischen viralen DNAs oder RNAs und viralen Transgenen bzw. ihren Transkripten (Schoelz und Wintermantel, 1993; Wintermantel und Schoelz, 1996; Greene und Allison, 1994; 1996; Frischmuth und Stanley, 1998). Für ein DNA-Virus konnten Wintermantel und Schoelz (1996) zeigen, dass es in 36% (!) der untersuchten Pflanzen zu Rekombinationen zwischen dem Virusgenom und dem Transgen kam. Zhou *et al.* (1997) haben über ein Rekombinationsprodukt von zwei Cassava-infizierenden Geminiviren berichtet, in dem das Hüllproteingen zum Teil aus Sequenzen des einen und zum anderen Teil aus Sequenzen des anderen „Elternvirus“ besteht, und das eine wesentlich höhere Pathogenität zeigt als die beiden Elternstämme. Wahrscheinlich ist dieses Hybridvirus in einer natürlicherweise mischinfizierten Pflanze entstanden. Computeranalysen von veröffentlichten Virusgenomsequenzen haben ergeben, dass bei einigen Viren die Genome stärker zu Rekombinationen neigen als bei anderen, und dass Rekombinationen an den verschiedensten Stellen im Genom erfolgen können (Revers *et al.*, 1996; Simon and Bujarski, 1994).

```

U
1  AAUUCUAACUAUUAUCUCCAUGAAUAGAAUUCACCGUCUGUCCGGUUC 50
51  UUAUUUUGUUCUGGGGGCAUUUUUAUUCAGGGCCCUACUUAAAUAUAGG 100
101 UGCGAGUAAUAAGUAGCCGCGUCCAGAAAGAUAGUACCAACAUGUCG 150
151 AGUGAAGGUAGAUAUAUGACAUGGAAGGAUAUGUCACAUAAUAAGUUUAU 200
201 GACCGAUCGAGUGGGCCUGUUUUCGGACGUCGUGAGUGUUUAUAAACAAU 250
251 CGCAUGCUAUGGACUUGUCCAAGGCUGCGAAUCUAUCUAUAAUJAAAACU 300
301 GCUUUGGCAAGAUUAGGCUCGGGUUGGACUGACAGAUAAUCCUUUUGUGUC 350
351 CUCCGAUGACCCGUUUUCCACAGACACUAACUAUGUACUGGUGCACUUGUGU 400
401 UUAUUGUUACUGUCCGACCCAGAAUUUGCGUUGAUAAUGACUAAGGUA 450
451 GAAUACUUUACUGAUUCAGGGUJAGCAGAUAAUGCAUCUGCUAAUGUGACG 500
501 UAGAGAUGUGGUGUCCUGAAAUAAAGCCUGAAUCAUCCGGUAAAACUGCUG 550
551 CGUACUAAUGAGAUACUCUGCUUUAUACGCUUACUGUCAGUCUUGCUGGUUUG 600
601 GCUCAAGCUCUJAGGCUUGAGAGAAUAAUUGGACCCGGGAUAAGUUUGA 650
651 GGACCGGUCAAGUUACCAUGGACACCUGUJCAAGGUAGAACCAGUCCAC 700
701 CCGGACAUACstopCAUJAGCUGCUGCUCGGGUGACGGCACACAUUCGAGCG 750
751 GCGAAGCGGGCACUAUUAUAUCCUGGUGAUAGUCCCGAGUGGGUUGGUUG 800
801 GAAACAUUUCUAUCCUCCUCACCAUAUGAUCGUGUACGAUGUGCCACCGC 850
851 UGGAUGUUAUAAUGCCAAUUGGCGUCUGAUGAUCUGGCGGUCUUGUU 900
901 ACUCCUCACACCGGCAUCCUCACAUGGUUCCUUUUGAAGUUUCCGAGGA 950
951 AGUUG 955

```

Abb. 1: Nukleotid-Sequenz der 955 5'-terminalen Nukleotide der RNA 2 des B-Typs des BNYVV. Nukleotide, die in der A-Typ-Sequenz anders sind, sind über der B-Typ-Sequenz vermerkt. 'Start' und 'stop' geben die Start- und Stopcodons des Hüllproteingens an. Der Sequenzbereich oberhalb von Nukleotid 831 (kursiv gedruckt) ist im Transgen nicht mehr enthalten. In einem entsprechenden PCR-Produkt muss er also aus dem Virus stammen.

Beim BNYVV ist bisher noch nicht über Rekombinationen berichtet worden. Am ehesten wären sie zwischen verschiedenen BNYVV-Stämmen (A-Typ, B-Typ, P-Typ etc.) zu erwarten, die von uns molekularbiologisch identifiziert worden sind (Kruse *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 1995). Die Nukleotidaustausche zwischen dem A- und dem B-Typ des BNYVV im 5'-terminalen Bereich der RNA 2 sind in Abb. 1 dargestellt.

Geplante Untersuchungen

Zum Nachweis von Rekombinationen soll der in Abb. 1 dargestellte Genombereich in der PCR amplifiziert werden. Er enthält die 5'-untranslatierbare Region (Nukleotid 1-144), das gesamte Hüllproteingen (Nukleotid 145-708) und den Beginn der Durchlesedomäne (Nukleotid 711-955). Der Bereich, in dem sich die letzten 6 Basenaustausche befinden (Nukleotid 831-906), ist im Transgen nicht mehr enthalten. Bei Infektionen mit B-Typ BNYVV müssten die PCR-Produkte in diesem Bereich also die B-Typ-spezifische Sequenz aufweisen. Im Falle von Rekombinationen würde dann in den davor liegenden Bereichen die A-Typ-spezifische Sequenz feststellbar sein. Wie groß der A-Typ-spezifische Anteil jedoch ist, lässt sich nicht vorhersagen, da bei anderen Viren festgestellt wurde, dass der Matrizenwechsel der viralen Replikase, der wahrscheinlich für die Rekombinationen verantwortlich ist, an unterschiedlichen Stellen erfolgen kann (Simon and Bujarski, 1994; Revers *et al.*, 1996). Rekombinationsprodukte könnten also unterschiedliche Anteile von A- und B-Typ-spezifischen Sequenzen enthalten (Abb. 2). Ein wirklich zuverlässiger Nachweis von Rekombinationen erfordert also sehr aufwendige und teure Sequenzanalysen.

Nach Viruspopulationen mit möglicherweise rekombiniertem Genom soll auf früheren Freisetzungsfeldern an zwei verschiedenen Orten gesucht werden, nämlich in Süddeutschland, wo der B-Typ des BNYVV vorkommt, und in der Umgebung von Pithiviers, wo der P-Typ des BNYVV vorkommt.

Da der Infektionsdruck des bodenbürtigen BNYVV und anderer bodenbürtiger Viren auf den Freisetzungsfeldern oft sehr niedrig ist und aufgrund der Fruchtfolge Rüben nur in jedem dritten Jahr angebaut werden, sollen außerdem im Gewächshaus Modellversuche durchgeführt werden, in denen eine Beschleunigung der Evolution von eventuell veränderten Viruspopulationen angestrebt wird. Im Gewächshaus kann mit Boden gearbeitet werden, der ein sehr hohes Inokulum-Potential aufweist. Außerdem ist die Anzucht von vier aufeinanderfolgenden Rübengenerationen pro Jahr bzw. 12 aufeinanderfolgenden Rübengenerationen während der dreijährigen Laufzeit des Forschungsvorhabens im gleichen Boden (der nach jeder Generation mit gesundem Boden angereichert wird, um eine „Bodenmüdigkeit“ zu vermeiden) möglich. Im Freiland würde der Anbau von 12 Generationen im Zuge der üblichen Fruchtfolge (Rüben in jedem dritten Jahr) 36 Jahre erfordern! Unter den Bedingungen derartiger Modellversuche könnten sich eventuell entstehende Populationen von Viren mit rekombiniertem Genom im Boden wesentlich schneller aufbauen und würden daher leichter zu erkennen sein. Neben den Versuchen mit transgenen Pflanzen sollen unter den gleichen Gewächshausbedingungen auch Versuche mit

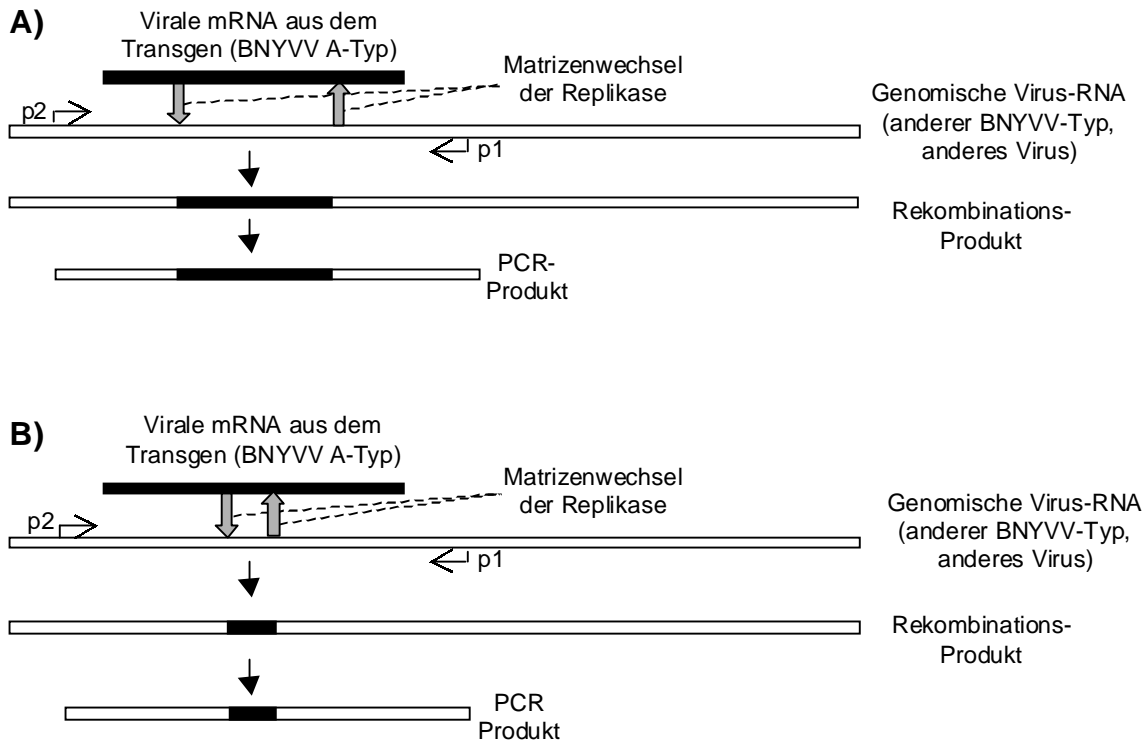


Abb. 2: Schematische Darstellung von Rekombinationen zwischen viraler *messenger* RNA (mRNA) aus dem Transgen und genomischer Virus-RNA. Der Gehalt von Sequenzbereichen aus dem Transgen in der rekombinierten RNA kann unterschiedlich groß sein (Fall **A** und **B**). p1 und p2 – Primer für die RT-PCR.

nicht-transgenen Rüben durchgeführt werden, die über den Boden auf natürliche Weise mit verschiedenen Typen des BNYVV oder anderen bodenbürtigen Viren gleichzeitig (misch-) infiziert werden. Dadurch kann die Häufigkeit von Rekombinationen, falls sie überhaupt vorkommen, in transgenen und in mischinfizierten Pflanzen verglichen werden.

Falls Viruspopulationen mit veränderten Genomeigenschaften nachgewiesen werden, muss geprüft werden, ob sie eine erhöhte Pathogenität für Rüben besitzen, denn nur dann könnten sie ein Gefahrenmoment darstellen.

Literatur

Frischmuth, T., Stanley, J.:

Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of cassava mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* 79, 1265-1271, 1998.

Greene, A.E., Allison, R.F.:

Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 263, 1423-1425, 1994.

Greene, A.E., Allison, R.F.:

Deletions in the 3' untranslated region of cowpea chlorotic mottle virus transgene reduce recovery of recombinant viruses in transgenic plants. *Virology* 225, 231-234, 1996.

Koenig, R., Lüddecke, P., Haeberlé, A.M.:

Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *J. Gen. Virol.* 76, 2051-2055, 1995.

Koenig, R., Haeberlé, A.M., Commandeur, U.:

Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Arch. Virol.* 142, 1499-1504, 1997.

Kruse, M., Koenig, R., Hoffmann, A., Kaufmann, A., Commandeur, U., Solovyev, A.G., Savenkov, I., Burgermeister, W.:

RFLP analysis of RT-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.* 75, 1835-1842, 1994.

Morozov, S.Y., Dolja, V.V., Atabekov, J.G.:

Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *J. Mol. Evol.* 29, 52-62, 1989.

Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M., Dunez, J.:

Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *J. Gen. Virol.* 77, 1953-1965, 1996.

Schoelz, J.E., Wintermantel, W.M.:

Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *Plant Cell* 5, 1669-1679, 1993.

Simon, A.E., Bujarski, J.J.:

RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32, 337-362, 1994.

Wintermantel, W.M., Schoelz, J.E.:

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, 1996.

Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G.W., Robinson, D.G., Harrison, B.D.:

Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J. Gen. Virol.* 78, 2101-2111, 1997.