

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von nachfolgend aufgelisteten Vertretern der Familie der *Geminiviridae* als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV:

Barley dwarf virus, Oat dwarf virus, Ageratum yellow vein virus, Tomato yellow leaf curl Sardinia virus, Tomato yellow leaf curl Malaga virus, Indian cassava mosaic virus, Sri Lankan cassava mosaic virus, Cleome leaf crumble virus, Euphorbia mosaic virus, Cabbage leaf curl virus, Sida micrantha mosaic disease associated viruses, Sida yellow vein virus, Squash leaf curl virus, Potato yellow mosaic virus und Abutilon mosaic Brazil virus

Die Vertreter der *Geminiviridae* sind phytopathogene Viren, die mithilfe von Vektoren (Vertreter der *Cicadellidae*, Weiße Fliege *Bemisia tabaci*) übertragen werden und große wirtschaftliche Schäden im Gartenbau und in der Landwirtschaft hervorrufen können. Sie weisen ein einzelsträngiges (ss), zirkuläres DNA-Genom auf, das je nach Genus entweder monopartit oder bipartit in nicht umhüllten ikosaedrischen Viruspartikeln vorliegt. Nach Penetration der Wirtszelle gelangt die virale genomische DNA in den Zellkern. Hier erfolgt die Umschreibung in eine doppelsträngige DNA unter Beteiligung zellulärer Faktoren. Es folgt eine Translation und eine Replikation in einem *rolling circle*-Mechanismus. Die neu generierte ssDNA wird entweder enkapsidiert, oder die ssDNA wird mithilfe der viralen *Movement*-Proteine über Plasmodesmen zu benachbarten Zellen transportiert, um dort zu replizieren. Während sich bei den monopartiten Viren die gesamte Erbinformation auf einem ssDNA-Molekül befindet, kodiert bei den Viren mit bipartiter Genomorganisation die DNA A für 4 oder 5 Proteine, die an der Replikation (Rep, Ren), an der Suppression des RNA-*Silencing* der Pflanze (AC4), an der Transkription (TrAP) und an der Verpackung (CP) beteiligt sind. DNA B kodiert für das *Movement*-Protein (MP) und das *Nuclear shuttle protein* (NSP), welche beide für eine systemische Infektion in der Pflanze nötig sind.

Je nach Genus können verschiedene Pflanzen in verschiedenen Regionen der Erde infiziert werden.

Genus *Mastrevirus*, monopartit

Barley dwarf virus (BDV)

Oat dwarf virus (ODV)

Innerhalb der Familie der *Geminiviridae* verpacken die Vertreter der Mastreviren ihr zirkuläres ssDNA-Genom in zweigeteilte Viruspartikel. Das monopartite Genom kodiert *ambisense* für vier Proteine: das *Movementprotein* (MP;V1) und das Kapsidprotein (CP, V2) in *sense*-Orientierung und die replikationsassoziierten Proteine RepA (C1) und Rep (C1:C2) in *antisense*-Orientierung. Die Transkription erfolgt von zwei divergenten Promotoren bidirektional von den „*long internal regions*“ (LIR).

Die Viren sind phytopathogen, wobei insbesondere monokotyle Pflanzen der Familie der *Poaceae* (Gräser) infiziert werden. Die Viren werden von Pflanze zu Pflanze durch Zikaden übertragen. Wirtschaftlich ursprünglich in tropisch bis subtropischen Gegenden bedeutend, da

auch Feldfrüchte, wie Mais und Zuckerrohr befallen werden, sind die oben genannten Vertreter inzwischen auch in gemäßigten Klimazonen beheimatet und befallen jeweils Gerste (BDV) oder Hafer (ODV)^[1].

Bewertung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV und entsprechend der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zu „Kriterien der Bewertung und der Einstufung von Pflanzenviren, phytopathogenen Pilzen und phytopathogenen Bakterien als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten“ (Az: 6790-10-53)^[2] werden diese Geminiviren als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 1** eingestuft.

Begründung

Die genannten Viren und ihre Vektoren sind in Deutschland und angrenzenden Ländern endemisch. Die Viren sind für Mensch und Tier nicht infektiös. Das nahe verwandte *Wheat dwarf virus* (WDV) mit einer Wirtsspezifität für Weizen wurde von der ZKBS bereits in die **Risikogruppe 1** eingestuft.

Genus *Begomovirus*, monopartit

Ageratum yellow vein virus (AYVV)

Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV)

Tomato yellow leaf curl Malaga virus (TYLCMaIV)

Diese Vertreter des Genus *Begomovirus* verpacken ihre monopartite ssDNA in zweigeteilte quasi-ikosaedrische Viruspartikel. Während bei den *Tomato yellow leaf curl*-Viren (TYLCVs) dieses Genom für eine symptomatische Infektion in der Wirtspflanze ausreichend ist, benötigt das *Ageratum yellow vein virus* eine zusätzliche Satelliten-Komponente, welche als DNA β bezeichnet wird^[3]. Das zirkuläre Genom der Viren kodiert *ambisense* für sechs bzw. sieben Proteine (V1, V2, C1-C4; C5 nur bei AYVV). Dabei kodiert V1 für das Kapsidprotein, V2 funktioniert als viraler Suppressor beim *RNA-Silencing*, C1 kodiert für replikationsassoziierte Proteine, die ORFs C2 und C3 regulieren die *sense*-Genexpression und der ORF C4 ist eine pathogene Determinante, die möglicherweise die Zellteilung der Wirtszelle beeinträchtigt^[4].

Monopartite Begomoviren werden mithilfe der Weißen Fliege (*Bemisia tabaci*) zwischen den Pflanzen übertragen. Zu den Wirtspflanzen von AYVV zählen *Ageratum conyzoides* und *Nicotiana benthamiana*. Die primäre Wirtspflanze der TYLCVs ist die Tomate (*Solanum lycopersicum*). Die Viren können jedoch auch andere Kulturpflanzen, wie Bohnen (*Phaseolus vulgaris*), Paprika (*Capsicum annuum*), Chili-Paprika (*C. chinese*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) infizieren und zu starken Ernteverlusten führen. Innerhalb der TYLCVs treten häufig Rekombinationsereignisse auf. Es entstehen Spezies, die sich in ihrer Wirtsspezifität und bei den Symptomen der Wirtspflanze unterscheiden können^[5,6].

Bewertung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV und entsprechend der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zu „Kriterien der Bewertung und der Einstufung von Pflanzenviren, phytopathogenen Pilzen und phytopathogenen Bakterien als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten“ (Az: 6790-10-53)^[2] werden diese

Geminiviren als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Begründung

Alle drei oben genannten Viren sind in tropischen, subtropischen und gemäßigten Regionen verbreitet und verursachen große wirtschaftliche Schäden bei den genannten Nutzpflanzen. In Deutschland und angrenzenden Ländern wird ein Teil der Wirtspflanzen wirtschaftlich genutzt. Die Viren sind bisher nicht nachgewiesen. Die zur Übertragung notwendigen Vektoren sind in Deutschland zwar nicht verbreitet, jedoch gelegentlich z.B. in Gewächshäusern vorhanden. Das nahe verwandte *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) wurde von der ZKBS bereits in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Genus *Begomovirus*, bipartit

Indian cassava mosaic virus (ICMV)

Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV)

Diese Vertreter des Genus *Begomovirus* zeigen eine hohe Wirtsspezifität für Maniok (*Manihot esculenta*), wobei auch sie mithilfe der Weißen Fliege übertragen werden. Eine mechanische Übertragung ist jedoch auch für *Nicotiana benthamiana* unter experimentellen Bedingungen möglich. Die Viren sind aufgrund geographischer Grenzen in der sogenannten „Alten Welt“ (Afrika, Asien) verbreitet und wurden nach ihrem jeweiligen Isolationsort bezeichnet. Phylogenetische Analysen weisen auf vielfältige Rekombinationsereignisse zwischen den Spezies hin^[7]. Die Cassava-Mosaik-Viren besitzen ein bipartites Genom, welches jeweils als zirkuläre DNA A und DNA B in ein zweigeteiltes Viruspartikel verpackt wird. Die DNA A kodiert die für die Replikation notwendigen Gene. In Protoplasten eingeführt, reicht sie für eine Replikation aus. Die Genprodukte der DNA B werden für eine systemische Infektion der Pflanze benötigt^[7].

Bewertung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV und entsprechend der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zu „Kriterien der Bewertung und der Einstufung von Pflanzenviren, phytopathogenen Pilzen und phytopathogenen Bakterien als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten“ (Az: 6790-10-53)^[2] werden das *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) und das *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 1** eingestuft.

Begründung

Die Viren sind phytopathogene Viren mit einer Wirtsspezifität für *Manihot esculenta*. Diese Wirtspflanze ist in Deutschland und angrenzenden Ländern nicht verbreitet. Die Viren sind für Mensch und Tier nicht infektiös. Die in Afrika beheimateten *African cassava mosaic virus* (ACMV) und *East African cassava mosaic virus* (EACMV) wurden bereits von der ZKBS in die **Risikogruppe 1** eingestuft.

Cleome leaf crumble virus (CILCrV)

Euphorbia mosaic virus (EuMV)

Diese Spezies gehören zur Gruppe der „Neuwelt“-Begomoviren, die ein bipartites Genom aufweisen und mithilfe der Weißen Fliege auf ihre Wirtspflanzen übertragen werden. Das *Cleome leaf crumble virus* wurde erst kürzlich von *Cleome affinis* (Spinnenblume)-Pflanzen mit eingerollten, mosaikförmig verfärbten Blättern isoliert. Die Wirtspflanzen des *Euphorbia mosaic virus* umfassen Gattungen der Wolfsmilchgewächse. Experimentell lassen sich durch Partikelbombardement der viralen ssDNA *N. benthamiana* und *Arabidopsis thaliana* infizieren, wobei die Infektion systemisch erfolgt, jedoch nur milde Symptome hervorgerufen werden. Beide Viren weisen ein bipartites Genom mit der DNA A und DNA B auf. Bei Klonierungsarbeiten mithilfe der *rolling circle amplification* wurden zu diesen Viren assoziierte Satelliten-DNAs entdeckt, die sich von der Satelliten-DNA der monopartiten Begomoviren der Altwelt unterscheiden und als α -Satelliten bezeichnet werden. Diese DNA enthält einen ORF, welcher für ein replikationsassoziiertes Protein (Rep) kodiert^[8].

Cabbage leaf curl virus (CaLCuV)

Dieses Begomovirus mit einem für Geminiviren typischen bipartiten Genom kann ein breites Spektrum von Pflanzen der Familie der *Brassicaceae* (Kreuzblütler), einschließlich Kohl, Blumenkohl und *Arabidopsis thaliana*, infizieren und wird mithilfe der Weißen Fliege übertragen. Es gehört zu den sogenannten „Neuwelt-Viren“, wobei die Viren hauptsächlich in Nord- und Südamerika wirtschaftliche Schäden anrichten^[9, 10].

Sida micrantha mosaic disease associated viruses (n.n. ICTV gelistet)

Sida yellow vein virus (SiYVV)

Diesen bipartiten Begomoviren gemeinsam ist ihre Wirtsspezifität. Zu den infizierten Pflanzen gehören Kräuter der Familie der *Malvaceae*, insbesondere *Sida* ssp, welche als Energie- und Futterpflanzen in Zentralamerika angebaut werden. Sie werden durch die Weiße Fliege übertragen und sind in der „Neuwelt“, insbesondere Zentral-Amerika (Honduras und Costa Rica), verbreitet. Am Beispiel der *Sida micrantha mosaic disease associated viruses* ist die ausgeprägte Rekombinationsfähigkeit der Geminiviren beschrieben. Aus Pflanzenmaterial mit Krankheitssymptomen wurden mehrere DNA A- und DNA B-Genome isoliert, so dass das *Sida micrantha mosaic*-Krankheitsbild mindestens drei bipartiten Begomoviren zugeschrieben wird. Experimentell lassen sich *N. benthamiana*-Pflanzen infizieren, wobei auch ernsthafte Schäden an den Pflanzen verursacht werden^[11-13].

Squash leaf curl virus (SLCV)

Beim SLCV handelt es sich um einen eingetragenen Quarantäne-Organismus der EPPO A1-Liste. Überträger des bipartiten Begomovirus ist die Weiße Fliege. Zu den Wirtsorganismen zählen Pflanzen der *Cucurbitales*, wie z.B. Zucchini, Melone und Kürbis. Das Virus verursacht ernste Schäden an den Pflanzen und führt zu hohen Ernteverlusten, was insbesondere für Gegenden in Nord- und Südamerika und der Karibik beschrieben ist. In Europa ist das Virus bisher nicht verbreitet^[14].

Potato yellow mosaic virus (PYMV)

Das *Potato yellow mosaic virus* (PYMV) ist als Vertreter der mithilfe der Weißen Fliege übertragenen bipartiten Begomoviren beschrieben. Das Virus ist in Mittelamerika, insbesondere Venezuela, verbreitet und infiziert natürlicherweise Kartoffelpflanzen^[16]. Experimentell sind ebenfalls *N. benthamiana*-Pflanzen systemisch infizierbar.

Studien zur Identifizierung eines Geminivirus, welches Tomatenpflanzen in Panama befällt, deuten auf anpassungsbedingte Pseudo-Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen Begomoviren hin. So konnte aus den infizierten Tomatenpflanzen eine für das *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) spezifische DNA A und eine PYMV-spezifische DNA B isoliert werden^[17].

Bewertung

Gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV und entsprechend der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zu „Kriterien der Bewertung und der Einstufung von Pflanzenviren, phytopathogenen Pilzen und phytopathogenen Bakterien als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten“ (Az: 6790-10-53)^[2] werden die Geminiviren CILCrV, EuMV, CaLCuV, die *Sida micrantha mosaic disease* –assoziierte Viren, SiYVV, SLCV und PYMV als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Begründung

Alle oben genannten Viren sind in tropischen, subtropischen und gemäßigten Regionen verbreitet, jedoch nicht in Deutschland und angrenzenden Ländern. Sie verursachen große wirtschaftliche Schäden bei den genannten Nutzpflanzen. In Deutschland und angrenzenden Ländern sind die Wirtspflanzen verbreitet und werden teilweise wirtschaftlich genutzt. Die zur Übertragung notwendigen Vektoren sind in Deutschland nicht verbreitet, treten jedoch gelegentlich z.B. in Gewächshäusern auf. Das *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (SiGMCRV) wurde von der ZKBS bereits in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Abutilon mosaic Brazil virus (AbMBV)

Dieses Begomovirus wurde in Bahia (Brasilien) von Abutilon (Schönmalve)-Pflanzen isoliert, die mosaikförmige Verfärbungen der Blätter aufwiesen. Mithilfe der *rolling circle amplification* wurde das Virus mit einer für Begomoviren typischen bipartiten Genomorganisation isoliert. Dabei werden von der DNA A vier ORFs codiert und von der DNA B zwei weitere. Die DNA A zeigt eine höchste Ähnlichkeit zum *Sida yellow leaf curl virus*, die DNA B ist der des *Okra mottle virus* am ähnlichsten, enthält jedoch auch zwei Fragmente, die vom *Bean golden mosaic virus* stammen. Das Virus wird durch die Weiße Fliege übertragen, kann jedoch auch experimentell auf *Nicotiana benthamiana* und *Malva pariflora* übertragen werden, wobei krankheitstypische Symptome bei den Pflanzen verursacht werden^[18].

Bewertung

Gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV und entsprechend der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zu „Kriterien der Bewertung und der Einstufung von Pflanzenviren, phytopathogenen Pilzen und phytopathogenen Bakterien als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten“ (Az: 6790-10-53)^[2] wird das *Abutilon mosaic Brazil virus* (AbMBV) als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Begründung

Das Virus wurde erst kürzlich in Brasilien entdeckt. Es verursacht Krankheitssymptome bei der Schönmalve, die auch in Deutschland gärtnerisch genutzt wird. Die zur Übertragung notwendigen Vektoren sind in Deutschland nicht verbreitet, treten jedoch gelegentlich z.B. in Gewächshäusern auf.

Literatur

- 1 Schubert, J. et al. (2007) Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany-Diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. *Virus Research* **127** (1): 61-70.
- 2 Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu Kriterien der Bewertung und der Einstufung von Pflanzenviren, phytopathogenen Pilzen und phytopathogenen Bakterien als Spender- und Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten. Az. 6790-10-53; April 2007.
- 3 Saunders K, Norman A, Gucciardo S, Stanley J (2004) The DNA β Satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology* **324**: 37-47.
- 4 Tan, PHN et al. (1995) Genome organization of ageratum yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *J Gen Virol* **76**: 2915-2922.
- 5 Monci F, Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E (2002) A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* **303**(2):317-26.
- 6 Diaz-Pendon JA, Canizares MC, Mariones E, Bejarano ER, Czosnek H, Navs-Castillo J (2010) Tomato yellow leaf curl viruses: *ménage a trois* between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Mol Plant Pathology* **11** (4): 441-450.
- 7 Rothenstein D, Haible D, Dasgupta I, Dutt N, Patil BL, Jeske H (2005) Biodiversity and recombination of cassava-infecting begomoviruses from southern India. *Arch Virol* **151**: 55-59.
- 8 Paprotka T, Metzler V, Jeske H (2010) The first DNA 1-like satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* **404**:148-157.
- 9 Abouzid AM, Hiebert E, Strandberg JO (1992) Cloning, identification and partial sequencing of a new geminivirus infecting *Brassicaceae*. *Phytopathology* **82**: 1070.
- 10 Strandberg JO, et al. (1991) A new geminivirus with a broad host range in the *Brassicaceae*. *Phytopathology* **81**: 1244.
- 11 Frischmuth T, Engel M, Lauster S, Jeske H (1997) Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, Sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *J Gen Virol* **78**: 2675–2682
- 12 Jovel J, Reski G, Rothenstein D, Ringel M, Frischmuth T, Jeske H (2004) Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. *Arch. Virol.* **149**: 829–841.
- 13 Jeske H, Gotthardt D, Kober S (2010) In planta cloning of geminiviral DNA: The true Sida micrantha mosaic virus. *J Virol Meth* **163**: 301–308.
- 14 Lazarowitz SG, Lazdins IB (1991) Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a bipartite squash leaf curl Gemini virus with a broad host range phenotype. *Virology* **180**: 58-69.
- 15 Paprotka T, Boiteux LS, Fonseca MEN, Resende RO, Jeske H, Faria JC, Ribeiro SG (2010) Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Res* **149**: 224-233.
- 16 Coutts RH, Coffin RS, Roberts EJ and Hamilton WD (1991) The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of potato yellow mosaic virus *J Gen Virol* **72** (PT 7): 1515-1520.
- 17 Engel M., Fernandez O, Jeske H and Frischmuth T (1998) Molecular characterization of a new whitefly-transmissible bipartite geminivirus infecting tomato in Panama. *J. Gen. Virol.* **79** (PT 10): 2313-2317.
- 18 Prapotka T, Metzler V, Jeske H (2010) The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting Abutilon. *Arch Virol* **155**: 813-816.