

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 87 (1996)

**Heft:** 3

  

**Artikel:** Gentechnologisch veränderte pflanzliche Lebensmittel : Stand der anwendungsorientierten Forschung und potentielle Nachweismöglichkeiten mit molekularbiologischen Methoden = Genetically engineered food plants : research and detection with DNA-analytical ...

**Autor:** Niederhauser, Christoph / Gilgen, Michael / Meyer, Rolf

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-982086>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 27.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

## **Gentechnologisch veränderte pflanzliche Lebensmittel: Stand der anwendungsorientierten Forschung und potentielle Nachweismöglichkeiten mit molekularbiologi- schen Methoden**

Genetically Engineered Food Plants: Research and Detection with DNA-  
Analytical Methods

*Key words:* GMOs, DNA, PCR, RAPD

*Christoph Niederhauser<sup>1</sup>, Michael Gilgen und Rolf Meyer<sup>2</sup>*  
Universität Bern, Institut für Biochemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, Bern

### **Einleitung**

Beinahe unter Ausschluss der Öffentlichkeit vollzieht sich mit der Gentechnologie eine Revolution im Bereich der menschlichen Ernährung. Bereits ist es gelungen, auf experimenteller Stufe alle unsere wichtigen Lebensmittel wie Getreide, Gemüse, Obst, Fisch und Nutztiere gentechnologisch zu verändern. Die stabile Einführung von fremden Genen in Pflanzen stellt in der Landwirtschaftstechnologie neben modernen Pflanzenzüchtungsmethoden, Hybridsaaten-Produktion, Einsatz von Maschinen und dem Gebrauch von Herbiziden, Insektiziden und Fungiziden eine weitere Innovationsstufe dar. Das Vorantreiben der Erkenntnisgewinnung über genetische Veränderungen von Pflanzen wird vorwiegend durch die agrochemische Industrie betrieben, welche als führender Geldgeber von biotechnologischer Agrokulturforschung auftritt. Genetisch veränderte Pflanzen und Mikroorganismen eröffnen der lebensmittelverarbeitenden Branche Möglichkeiten, neue Produkte zu entwickeln oder kostensparendere Verfahren einzuführen.

Es fällt auf, dass sich heute die Erfolge sehr viel langsamer und spärlicher einstellen, als noch vor einigen Jahren prognostiziert worden ist. Der Grund dafür liegt darin, dass sich gentechnologische Veränderungen an Pflanzen in der Durch-

<sup>1</sup> Gegenwärtige Adresse: Mikrobiologisches Institut, Kantonsspital, CH-5000 Aarau

<sup>2</sup> Gegenwärtige Adresse: Nestlé Research Center, Department of Quality & Safety, Nestlé Ltd, P.O. Box 44, CH-1000 Lausanne 26



führung als schwieriger erwiesen haben als bis anhin angenommen wurde. Das gilt vor allem für die sogenannten «multifaktoriellen» Pflanzeigenschaften; Eigenschaften also, die nicht durch ein einziges Gen, sondern durch mehrere verschiedene Gene, die auf verschiedenen Chromosomen und an verschiedenen Orten liegen können, in komplexen Wechselwirkungen zueinander hervorgerufen werden. Wohl fast alle Anpassungsleistungen von Pflanzen an spezielle Umweltbedingungen, wie Trockenresistenz, Kälteresistenz, Resistenz gegen Schwermetalle, Anpassung an salzreiche oder stickstoffarme Böden oder ähnliches, sind multifaktorielle Eigenschaften, die z. T. in langen evolutionären Entwicklungsprozessen, z. T. durch den Menschen in Jahrtausenden durch Züchtung entstanden sind.

Tabak war die erste Pflanze, welche mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert wurde, um ein fremdes Gen zu exprimieren (1, 2). Die frühen Transformationsexperimente bedienten sich der Protoplasten als Empfängerzellen. Mit der Zeit wurden dann Pflanzenzellen von Blättern, Stengeln und Wurzeln eingesetzt, da sich diese Zellen viel besser als Protoplasten regenerieren lassen. Pflanzenzellen sind weitgehend totipotent, d. h., aus einer einzelnen Zelle, auch einer gentechnisch veränderten, kann gewöhnlich eine komplette, sexuell fortpflanzungsfähige Pflanze herangezogen werden. Heute wird mit verschiedenen Methoden wie der Mikroinjektion, der Elektroporation oder der Partikelbeschussung die DNA in «nackter» Form in die Pflanzenzellen eingeschleust. Diese Methoden lassen sich mit Erfolg auch bei den Monokotyledonen (Einkeimblättrige, zu denen die wichtigsten Getreidearten gehören) anwenden. Gerade die Monokotyledonen konnten mittels *Agrobacterium tumefaciens* nur sehr schlecht transformiert werden.

Bei der Frage nach dem heutigen Stand der Forschung sind verschiedene Schwerpunkte festzustellen. Angestrebte Einsatzbereiche sind Resistenzzüchtungen von Pflanzen gegen Viren, Herbizide, Insekten und Pilze (wobei zwischen monofaktoriellen und multifaktoriellen Resistenzen zu unterscheiden ist) sowie limitierte Toleranzen von Kulturpflanzen gegen Hitze, Kälte, Dürre oder Salz. Von grösstem Interesse ist sicherlich die Erhöhung der Produktivität (Grösse und Gewicht der Körner) und die Beschleunigung des Reifungsprozesses. Weitere Forschungsbereiche erstrecken sich auf qualitätsverbessernde Parameter, so zum Beispiel die Anhebung der biologischen Wertigkeit von Samenproteinen (Getreide, Samenfrüchte), Veränderungen des Spektrums von Fettsäuren in pflanzlichen Ölen und von Kohlenhydraten. Bis zur technischen Realisierung dieser Ziele ist allerdings noch ein weiter Weg zurückzulegen, weil viele dieser Eigenschaften nicht mono- sondern polygenetisch verankert sind und man noch weit davon entfernt ist, all die Gene zu kennen, welche diese Eigenschaften kontrollieren (Expressionskontrolle). Um das richtige Niveau der Expression neuer transgener Eigenschaften zu erreichen, müssen passende Promotoren dem Transgen vorgeschaltet sein. Obwohl heute schon mehr als 50 verschiedene Kulturpflanzen transformiert werden können (3, 4) und diese Tatsache auch Illusionen zu wecken scheint, sind weiterhin grosse Schwierigkeiten zu überwinden, a) die Transformation, b) die Regeneration der transformierten Zellen und c) die gewünschte Expression der transgenen Eigenschaft. Die gentechnische Veränderung von Pflanzen ist zudem

ein sehr arbeitsintensiver Vorgang; um heutzutage 100 transformierte Maispflanzen zu regenerieren, ist eine Person ein ganzes Jahr beschäftigt. Grösste Schwierigkeiten bietet nach wie vor die Wirtsspezifität; d. h., wenn man eine Pflanze transformieren kann, ist noch lange nicht sicher, dass von dieser Pflanzenart die kommerziell wichtigen Varietäten auch transformiert und regeneriert werden können. Der einzige Ausweg, der sich in diesem Fall anbietet, ist die Rückkreuzung einer leicht transformierbaren Varietät, in welche die gewünschte Eigenschaft transformiert wurde, mit der kommerziell einsetzbaren aber nicht transformierfähigen Varietät.

Seit 1984 wurden mehr als 50 Pflanzenarten gentechnisch verändert (4). In über 500 Feldversuchen (3) wurden transgene Pflanzen auf Qualitätsverbesserungen, Insektenkontrolle, Resistenzen gegen Pflanzenkrankheiten usw. getestet und es zeigte sich in den meisten Fällen, dass die Integrationen von fremder DNA stabil waren. *Fraley* (3) rechnet damit, dass transgene Sojabohnen, Baumwolle, Reis, Raps, Zuckerrübe, Tomaten, Alfalfa, Kartoffeln und Mais zwischen 1995 und 2000, d. h. in naher Zukunft, auf den Markt kommen werden. Seit 1994 ist als erste transgene Pflanze die Flavr Savr<sup>TM</sup>-Tomate für den amerikanischen Markt zugelassen (5).

### Transformationssysteme

Methoden, die dazu dienen, fremde Gene in Pflanzenzellen stabil zu integrieren, sind auch heute noch nicht sehr einfach zu handhaben. Einige Transformationssysteme benutzen biologische Vektoren wie Retroviren (6) oder *Agrobacterium tumefaciens*, um Gene stabil ins Wirtsgenom integrieren zu können. Andere Systeme beruhen auf chemisch-vermittelten Methoden (Calciumphosphat-Präzipitation, Polyethylenglykol, Liposomen). Heute werden vermehrt physikalische Methoden wie Mikroinjektion, Elektroporation oder Partikelbeschuss eingesetzt, um den DNA-Transfer durch Zellwände und Zellmembranen hindurch zu erleichtern. Um Gene erfolgreich in Pflanzen integrieren und stabil exprimieren zu können, ist es essentiell, über effiziente Transformations- und Regenerationssysteme zu verfügen. Obwohl heute verschiedenste Pflanzen transformiert werden können, variieren die Transformationsfrequenzen beträchtlich. Brauchbare Transformationssysteme sollten die folgenden fünf Eigenschaften erfüllen:

1. Stabile Integration von exogener Fremd-DNA ins Zellgenom des Wirtsorganismus, und zwar ohne strukturelle Veränderung der transformierenden DNA
2. Integration der exogenen DNA in der gewünschten Anzahl, in den meisten Fällen eine Kopie
3. Gewünschte Expressionsrate der integrierten DNA im richtigen Gewebe des Wirtsorganismus (Wurzel, Blätter, Stengel usw.) und zum richtigen Zeitpunkt in der Entwicklung der Pflanze
4. Strukturelle Stabilität des Merkmals der integrierten DNA



5. Stabile Expression des transgenen Merkmals über mehrere sexuelle und vegetative Generationen hinweg.

Methoden zur Transformation von Dikotyledonen werden schon seit mehr als 10 Jahren entwickelt. Bis heute ist es jedoch noch nicht gelungen, die meisten wichtigen Nutzpflanzen, die beinahe ausnahmslos zu den Monokotyledonen gehören, mit *A. tumefaciens* zu transformieren (Ausnahme Reis). Mit der DNA-Partikelbeschiessungsmethodik, angewendet auf embryonale Gewebekulturzellen, konnte dieses Transformationsproblem einigermaßen gelöst werden, doch die Regeneration transformierter Protoplasten zu vollen Pflanzen erweist sich als äusserst schwierig. Eine kritische Übersicht über alle existierenden Transformationssysteme findet man bei Potrykus (7). Bis 1990 konnten bei Getreide ausser Protoplasten keine Gewebezellen transformiert werden, weder mit Partikelbeschiessung, Elektroporation, Mikroinjektion noch mittels *A. tumefaciens*. Zudem waren Meristemzellen (embryonale Zellen) bis anhin nicht transformierbar. Die Transformation von Meristemzellen aus Getreide wäre aber ein wichtiger Punkt, da die Regeneration aus Nicht-Meristemzellen sehr zeitaufwendig und schwierig ist. Falls eine Methode entwickelt würde, um zygotische Proembryonen transformieren zu können, bestünde die Hoffnung, mit dieser Methode alle Varietäten aller Getreidearten einfach und stabil zu transformieren.

Meristemgewebe ist ein undifferenziertes, im Gegensatz zu den Dauergeweben noch teilungsfähiges pflanzliches Gewebe. Bei allen höheren Pflanzen entstehen die primären Meristemgewebe, die als Urmeristeme, Promeristeme oder Histogene bezeichnet werden, bei der Entwicklung des Embryos, sobald das Teilungswachstum nur noch an den Enden der Spross- und Wurzelanlage vor sich geht. Diese Apikalmeristeme bestehen beim Embryo und allen entwickelten Pflanzen aus embryonalen Zellen, deren Zellwände dünn sind, wenig Zellulose enthalten und ohne Zwischenräume aneinanderliegen.

Die Integration der fremden DNA erfolgt unabhängig von der Transformationsmethode meistens über den Mechanismus der illegitimen (nicht homologen) Rekombination. Das wiederum hat zur Konsequenz, dass die Integration der fremden DNA, oftmals in mehreren Duplikationen, irgendwo im Genom der Zielzelle erfolgt. Die Problematik ist hier, dass einerseits durch solche Integrationen funktionelle Gene zerstört werden könnten, andererseits die Expression vom Integrationsort abhängig ist. Oftmals wird die integrierende DNA während des Vorgangs der nicht homologen Rekombination rearrangiert, dupliziert oder durch Methylierung in sogenannte «stille» DNA verwandelt. Einmal integriert, wird die DNA vielmals Ziel von verschiedenen Reparaturprozessen, die vorwiegend an den Übergängen von exogener und genomischer DNA stattfinden und so zum Ausfall der exogenen DNA führen können (8). Falls die transformierte DNA einmal ins Wirtsgenom integriert hat, ist es noch lange nicht sicher, ob die Pflanze die integrierte Eigenschaft auch wirklich exprimiert.

### *Agrobacterium*

Das zuerst verwendete und auch heute noch meistbenutzte System zur gentechnologischen Veränderung von Pflanzen bedient sich des pflanzenschädlichen Bodenbakteriums *Agrobacterium*, das einen bestimmten Teil seiner DNA in Pflanzenzellen einzuschleusen vermag. Es gibt verschiedene *Agrobacterium*-Spezies, von welchen *A. tumefaciens* und *A. rhizogenes* zur Transformation von Pflanzen eingesetzt werden können. Beide Bakterienspezies haben ihre eigenen Genfähren, die sogenannte T-DNA (transferierte DNA). Diese T-DNA liegt auf einem Plasmid, dem Ti-Plasmid (tumor inducing) bei *A. tumefaciens* und dem Ri-Plasmid (root inducing) bei *A. rhizogenes*. Die T-DNA integriert sich in die Chromosomen der infizierten Pflanzenzellen, und die mit ihr eingeschleusten Gene sorgen dafür, dass die Zellen vermehrt bestimmte Pflanzenhormone produzieren. Unter deren Einfluss bildet die Pflanze Tumore aus, sogenannte Wurzelhalsgallen. Damit sich das Plasmid als Vektor zum gezielten Einschleusen bestimmter Gene im Labor eignete, wurden die krebserzeugenden Gene entfernt. Diese Vektoren können der Pflanze nicht mehr schaden, enthalten aber dennoch all die Faktoren, die zur DNA-Übertragung nötig sind. Die Transformation von Pflanzen (vorwiegend Dikotyledonen) mit fremdem Genmaterial mittels *A. tumefaciens* wird heute weltweit in Hunderten von Forschungslabors eingesetzt. Allein bei der Firma Monsanto wurden auf diese Weise mehr als 45 000 eigene transgene Pflanzenlinien geschaffen (9). Da *Agrobacterium* bestimmte Getreide, so die Grundnahrungsmittel Reis, Mais und Weizen, normalerweise nicht befällt, lassen sich diese mit dieser Methode nicht ohne weiteres transformieren.

*Agrobacterium*-Transformationen werden heute in grossem Masse in der Grundlagenforschung eingesetzt. Diese Transformationen werden in den meisten Fällen mit Tabak durchgeführt. In den letzten Jahren wurde auch eine immer grösser werdende Anzahl Arbeiten betreffend Herbizidresistenz, Insektizidresistenz, Bakterienresistenz, Virusresistenz, Pilzresistenz, Inhaltsstoffveränderungen und Reifungshinauszögerung publiziert (Tabelle 1).

Das Hauptproblem bei der *Agrobacterium*-Transformation ist die Spezifität der Bakterien-Wirt-Wechselwirkung. Deshalb können die wichtigsten Kulturpflanzen noch nicht mit dieser Methode transformiert werden. Die Anzahl der integrierten DNA-Sequenzen, d. h. die Kopienzahl der transformierten Gene im Pflanzengenom, ist verschieden hoch und kann je nach Transformationslinie von einer Kopie bis zu mehr als 10 Kopien variieren. Oftmals sind aber die Konzentrationen des transgenen Genproduktes ähnlich hoch, unabhängig davon, ob eine oder 10 Kopien vorhanden sind. Man vermutet, dass in diesen Fällen viele stille Kopien vorhanden sind, die nicht exprimiert werden (10).

### *Retroviren*

In der Literatur finden sich zwei Methoden, Pflanzenzellen mit viraler DNA zu transformieren. Virale DNA kann einerseits in die T-DNA des Ti-Plasmides von



Tabelle 1. *Agrobacterium* Transformation

Anwendungen	Pflanze	Gen/Reportergen	Plasmid/Promotor/Terminator	Literatur
Grundlagen	Tabak	NPT II	pMON120, NOS Promotor und Terminator	(36)
	Tabak	NPT II	pLGV, NOS Promotor und Terminator	(198)
	Tabak	APH II	pABDII, CaMV 35S Promotor und Terminator	(199)
	Tabak	APH II	pGV3850, NOS Promotor	(2)
	Tabak, Tomate	GUS	pMON120, pMON200, NOS Promotor und Terminator	(200)
	Tabak	ACC	pMON, NOS Promotor und Terminator	(183)
	Tabak	Sh-Ble	pGA492, CaMV 35S, NOS Promotor und Terminator	(181)
	Tabak	GUS	pIG221, CaMV 35S, 1. intro castor bean catalase, NOS	(108)
	Tabak	Invertase	pBIN19, CaMV 35S, ocs	(201)
	Tabak	GUS	pMON128, AoPR1 Promotor, CaMV 35S, Polyad.	(202)
	Tomate	Reifungsgen, Gegensinn	pTOM5, CaMV 35S, NOS	(203)
Herbizid-resistenz	Luzerne	<i>bar</i> , <i>hpt</i> , <i>neo</i>	pGSFR780A, pGSFR761A, CaMV 35S, NOS, ocs, T-DNA Gen (3'g7)	(204)
	Soja	EPSP, GUS, KAN	pMON, CaMV 35S, NOS	(203)
	Tabak	<i>aroA</i>	pPMG55, pPMG85, ocs, mas, tml	(82)
	Tabak, Tomate, Kartoffel	<i>bar</i>	pGSFR1, CaMV 35S, ocs	(49)
	Tabak	<i>psbA</i>	pSSU-S-ATR, pSSU-L-ATR, ss3.	(83)
	Tabak	ALS ( <i>csr1</i> )	pMON	(187)
	Tabak	<i>bxn</i>	CaMV 35S, ocs	(46)
	Tabak	<i>tfdA</i>	pMK110, CaMV 35S, OCS-3'	(47)

Anwendungen	Pflanze	Gen/Reporter/gen	Plasmid/Promotor/Terminator	Literatur
Insektizid-resistenz	Tabak	<i>tfdAk</i>	pGA470, CaMV 35S, NOS	(185)
	Tomate	<i>aroA</i>	pPMG, NOS Promotor und Terminator	(206)
	Zuckerrübe	<i>bar</i> , ALS	pGSFR, pTHW95, CaMV 35S, TR-2', CaMV 35S, NOS	(207)
	Tabak	<i>cryIA(a)</i> , NPT II	pTV4AMVBTS, CaMV 35S, NOS	(97)
	Tabak	<i>cryIA(b)</i> , <i>neo</i>	pGS1151, pGS1152, T-DNA Promotor und Terminator	(96)
	Tabak	CpTI,	pROK/CpTi, CaMV 35S, NOS	(208)
	Tabak, Tomate	<i>cryIA(a, b, c)</i> , NPT II	pMON, 2xE CaMV 35S, NOS	(109)
	Tabak	<i>cryIA(b)</i> , NEO	pCiB1010, CaMV 35S, NOS	(276)
	Tabak	<i>cryIA(b,c)</i> NPT II	pCIB770, pCIB300, CaMV 35S Promotor und Terminator, CaMV 35S Promotor, AMV Leader 35S Terminator	(102)
	Tomate	<i>cryIA (b)</i> , NPT II	pMON, CaMV 35S, NOS	(99)
Bakterien-resistenz	Tomate	<i>cryIA(b)</i> , NPT II	pMON9711, CaMV35S, NOS, MAS Promotor	(100)
	Tabak	<i>ttr</i> , NPT II	pARK21, CaMV 35S, NOS Promotor und Terminator	(129)
Virus-resistenzen	Hafer	WDV	pJIT (pBIN), <i>A. rhizogenes</i> , CaMV 35S, NOS	(66)
	Kartoffel	PVY (CPM)	pPCV702, CaMV 35S, NOS	(158)
	Kartoffel	2'-5' oligoadenylate synthase (sense, antisense)	pHT2-5A+, CaMV 35S, NOS, NPT II	(118)
	Tabak	TMV (CPM)	pMON316, CaMV 35S, NOS	(113)
	Tabak	STobRV (RNA), <i>kan</i>	pGA470, CaMV 35S, NOS	(115)
	Tabak	CMV (RNA), <i>kan</i>	CaMV 35S	(114)
	Tabak	PVX (CPM, sense, antisense)	pMON, CaMV 35S, kleine UE E9 3'	(117)

Anwendungen	Pflanze	Gen/Reportergen	Plasmid/Promotor/Terminator	Literatur
	Tabak	CMV (CPM, sense, antisense), NPT II, Spc <sup>R</sup>	pMON, CaMV 35S, rbcS-E9	(116)
	Tabak	TMV (CPM), NPT II	pMON, CaMV 35S, NOS	(113)
	Tabak	PRV (CPM), NPT II, GUS, Gent, Tet	pGA482GG/cpPRV-4, CaMV 35S, cos	(209)
	Tabak	TSWV (Nucleoprot.)	pBIN19, CaMV 35S, NOS	(210)
	Tabak	TSWV (RNA)	pBIN19, pBI525 CaMV 35S, NOS	(211)
	Tabak	Ab gegen AMCV, NPT II	pGB-scFv (F8-BIN, CaMV 35S, NOS)	(119)
	Tomate	TMV	pTM319	(212, 279)
	Tomate	TYLCV (CPM), NPT II	pTY52, CaMV 35S Promotor und Terminator	(213)
Bakterien-resistenzen	Tabak	Phaseolotoxin	pSSOCT, SSU*, 35S Polyad.	(128)
Pilzresistenz	Tabak	Chitinase	pKNK 8	(123)
	Canola		CaMV 35S, NOS	
Inhaltsstoffe	Tabak	RIP, NPT II	pBIN 19, <i>wun-1</i> 3' Ende	(125)
	Kartoffel	GBSS (Gegensinn), NPT II, <i>kan</i>	pGB, CaMV 35S, NOS	(146)
	Kartoffel	AGPase (Gegensinn), NPT II	pBin-AntiAGP, CaMV 35S, ocs	(147)
	Kartoffel		pCGN, Patatin Promotor, Bohnen SSU, NOS	(159)
	Tabak	Fettsäuren-Desaturase aus Ratte	pDs3-358, CaMV 35S	(167)
	Tabak	$\alpha$ -Amylase	pMOG, CaMV 35S, NOS	(160)



Anwendungen	Pflanze	Gen/Reporter-gen	Plasmid/Promotor/Terminator	Literatur
Reifung	Tabak	<i>SacB</i>	pMOG, CaMV 35S, NOS	(162)
	Tomate	SPS	pCGN3812, <i>rcbs</i> Promotor	(163)
	Tomate, Lattich	Monellin	pBIN19 und pMLJ11, CaMV 35S und E8, NOS	(164)
	Tomate	Gegensinn-PG	pJR16A, CaMV 35S, NOS	(214)
	Tomate	Gegensinn-PG	pCGN1410, CaMV, Transkript 7 3' Terminator	(175)
	Tomate	Gegensinn, ACC-oxidase	BIN19, CaMV 35S, pDH51 Terminator	(172)
	Tomate	ACC-desaminase	pMON893, CaMV 35S, pea <i>rcb S-E9</i> gene 3'	(177)
	Tomate	Gegensinn-ACC synthase	pPo35, CaMV 35 S, NOS	(174)
	Tomate	PG und PE Gegensinn, NPT II	pPGPE, CaMV 35S Promotor und Terminator	(176)
Stress-resistenz	Tabak	Glycerol-3-phosphat, Acyltransferase	pBI-121, CaMV 35S	(135)

ACC: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid

Rubisco small subunit (SSU) transit peptide from the ss3.6 pea gene

Barley ribosome inactivating protein (RIP)

AoPR1 wound-induced promotor from *Asparagus officinalis*

*tfdA* Gen des Bodenbakteriums *Alcaligenes eutrophus*, welches für eine Resistenz gegen 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase (DPAM) kodiert: heute weiss man, dass ein Multienzym pathway für den Abbau von 2,4D verantwortlich ist, 3 Gene *tfdA*, *c*, *d* konnten schon bestimmt werden (185).

TMV tobacco mosaic virus

WDV wheat dwarf virus

TSWV tomato spotted wilt virus

TYLCV tomato yellow leaf curl virus

STobRV satellite RNA tobacco ringspot virus

CMV cucumber mosaic virus

*sacB* levansucrase von *Bacillus subtilis*

PG polygalacturonase

PE Pectinesterase

Sh-Ble Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*, welches Resistenz gegen Bleomycin und Phleomycin verleiht. ACC bakterielle gentamycin-3-N-acetyltransferase, welche Aminoglycosidantibiotika durch Acetylierung inaktiviert.

*mas* manopine synthase gene promotor

*tml* polyadenylation



*psbA* Chloroplastengen aus *Amaranthus hybridus*, welches für photosynthetisches quinone-binding Membran Protein Q<sub>B</sub> kodiert; dieses Gen macht Pflanzen resistent gegen Atrazin.  
 223.6 Gen für SSU ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase von Bohnen  
 AMV Leader alfalfa mosaic virus nicht-translierter Leader  
 MAS Promotor Mannopine synthase (198)  
 CpTI cowpea trypsin inhibitor (Protease Inhibitor)  
 S/S spectinomycin, streptomycin  
 rbcS-E9 von Bohnen  
 pBIN19 ist ein von Clontech kommerziell erhältliches Plasmid.  
 Ab Antikörper (IG2b) gegen Hüllprotein des artichoke mottled crinkle virus (AMCV)

*A. tumefaciens* eingebaut werden. Das Virus gelangt dann als blinder Passagier der Ti-Plasmid-DNA in die Pflanzenzelle. Dort entsteht ein funktionelles Virus, das sich replizieren und sich über die Pflanze ausbreiten kann (11). Ein zweiter Ansatz ist die direkte Infizierung von Pflanzen mit Retroviren. Da die Integration der viralen DNA ins Pflanzengenom schwierig ist (6, 12–15), werden die transgenen Eigenschaften sehr oft nicht stabil weitervererbt. Aus diesem Grund wird diese Methode im allgemeinen kaum mehr eingesetzt.

### Physikalische Methoden

#### Partikelbeschiessung

Die Partikelbeschiessung von Pflanzenzellen mit DNA ist ein Verfahren, mit dem viele Zellen gleichzeitig mit Genmaterial bombardiert werden können. Metallpartikel von einem bis zwei Mikrometer Durchmesser werden mit DNA beschichtet und gerade so stark beschleunigt, dass sie intakte Zellwände durchstossen und die DNA ins Zellinnere hineinkatapultieren können. Die Partikel befinden sich auf der Spitze eines Geschosses aus Kunststoff, das mit einer Pulverladung beschleunigt wird und von einer Abfangvorrichtung rechtzeitig abgestoppt wird. Durch den Bewegungsimpuls fliegen die Partikel weiter durch ein Loch in der Abfangvorrichtung direkt bis in die Pflanzenzellen hinein. Die entstandenen Löcher schliessen sich schnell von alleine wieder. Auch die Metallpartikel, obwohl sie in der Zelle bleiben, stören wegen ihrer geringen Grösse die Zellfunktionen kaum. Diese Methode wurde im wesentlichen mit zwei verschiedenen Ansätzen entwickelt. Einerseits werden mit einer DNA-Partikelpistole, welche eine Platzpatrone vom Kaliber 0,22 abfeuert, Wolframpartikel, die mit DNA überzogen sind, in die Pflanzenzellen gebracht. Ein ähnliches Schussgerät existiert, um mit DNA beladene Goldpartikel, die durch Verdampfen eines Wassertropfens beschleunigt werden, in die Zellen zu katapultieren (16). Heute existiert diese Methode in verschiedensten Variationen (Gold- oder Wolframpartikel, Gewehrpuder, Glaspuder, elektrisches Abfeuern, DNA in Lösung und nicht an die Partikel gebunden, wobei die Partikel nur Löcher machen). Diese Partikelbeschiessung erlaubt auch Kotransformation von zwei oder mehreren Plasmiden, d. h. zwei oder mehrere völlig unabhängige genetische Eigenschaften können gleichzeitig in eine Pflanzenzelle eingebracht werden.

Die Methode der Partikelbeschiessung wird heute eingesetzt, um genetisches Material bei Mikroben, Pflanzen und Tieren direkt in die Zellen einzuführen. Mit dieser Methode sollte es in Zukunft möglich sein, auch wirtschaftlich wichtige Kulturpflanzen wie Mais, Weizen, Reis und Soja routinemässig gentechnisch verändern zu können. Weitere Vorteile dieser Methode sind die Transformation von Zell-Organellen wie Mitochondrien oder Chloroplasten (17–20) sowie die Möglichkeit, verschiedene Pflanzengewebe wie unreife zygotische Embryonen und somatische Embryonen (21) zu transformieren, was die Regeneration von transformierten Zellen zu ganzen Pflanzen erleichtern könnte.

Die Partikelbeschiessungsmethode besitzt ein grosses Potential, weil sie generell applizierbar und einfach zu handhaben ist. Verschiedene Zielzellen von Pollen, Organen, Zellkulturen und Meristemen können mit dieser vektorunabhängigen Methode transformiert werden. Der einzige nennenswerte Nachteil dieser Methode ist die tiefe Transformationsfrequenz.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Partikelbeschiessung heute die Methode der Wahl ist. Auch Monokotyledonen wie Weizen, Mais und Reis, die mit der *Agrobacterium*-Methode nicht transformiert werden konnten, können wohl in Zukunft routinemässig transformiert werden. In allen Bereichen, wie Herbizidresistenzen, Insektizidresistenzen, Virusresistenzen, Veränderungen von Inhaltsstoffen, Anpassungsleistungen an veränderte Umweltbedingungen usw., wurde die Partikelbeschiessungsmethode schon erfolgreich eingesetzt (Tabelle 2).

### *Mikroinjektion*

Eine weitere physikalische Methode zur Transformation von Pflanzenzellen ist die Injektion kleinster DNA-Mengen (Mikroinjektion). Aus verschiedenen Gründen hat sich dies nicht als sonderlich praktikabel erwiesen. Die erforderlichen, sehr feinen Injektionsnadeln brechen bei der Manipulation des Injizierens leicht ab und verstopfen oft. Da die Zellen einzeln injiziert werden müssen, erfordert diese Methode viel Zeit und Geschick und eignet sich daher weniger für eine kommerzielle Produktion. Da der Einbau fremder DNA ins Genom ein seltenes Ereignis darstellt, wären mitunter mindestens 10 000 Zellen einzeln zu behandeln, um mit Sicherheit transgene Transformanden zu erhalten.

Die Mikroinjektion hat aber auch Vorteile:

- a) Die DNA-Menge pro Zelle kann genau abgestimmt werden.
- b) Der Experimentator kann entscheiden, in welche Zelle die DNA injiziert werden soll.
- c) Die DNA kann präzise in die Zelle, ja sogar in den Zellkern gebracht werden.
- d) Verschiedene Zellarten, die nur in kleinen Mengen vorkommen, können mit dieser Methode transformiert werden (Mikrosporen, Proembryonen).

Die Mikroinjektion wird heute nur in wenigen speziellen Fällen eingesetzt. Ein Beispiel für diese Methodik ist bei *Verhoeven* und *Blaas* (22) zu finden. Diese Autoren haben Organellen mittels Mikromanipulation aus Protoplasten entfernt und anschliessend die Organellen mit Hilfe der Mikroinjektion transformiert.



Tabelle 2. Partikelbeschiessung

Anwendungen	Pflanze	Gen/Reportergen	Plasmid/Promotor/Terminator	Literatur
Grundlagen (Antibiotika)	Gerste	CAT, CaMV 35 S, Adh Intron1, NOS	pCaMVI <sub>1</sub> CN	(169)
	Mais	CAT, CaMV 35S, Adh Intron 1, NOS	pCaMVI <sub>1</sub> CN	(140)
	Mais	GUS, Adh1 promotor, Adh1 Intron, NOS	pAI	(215)
	Mais	NPT II, GUS, CaMV 35S, NOS	pNGI	(216)
	Mais, Reis	GUS	pAI <sub>1</sub> GusN, pZ01016	
	Weizen		Adh prom. Mais, MaisADh Intron 1, NOS, CaMV 35S, Mais Adh Intron 6, NOS	(217)
	Mais	<i>C1, B, R</i> Gene von Mais	pMF6 Expressionsvektor, CaMV 35S, Adh 1 Intron, NOS	(218)
	Papaya	NPT II, GUS	pGA, CaMV 35S, NOS	(21)
	Reis	<i>phy</i> , CAT	pGP403, pAHC18 <i>phy</i> 5'-nicht kod. und Terminator, CaMV 35S, NOS	(219)
	Soja	NPT II	pCMC, CaMV 35S, NOS	(220)
	Soja	NPT II, GUS	pCMC, CaMV 35S, alfalfa 5' nicht transl., NOS	(221)
	Sorghum	NPT II, UIDA, <i>hph</i>	pBC, pNG, Adh1, CaMV 35S, NOS, CaMV 35S, NOS	(222)
	Tabak	GUS, NPT II, 35S cab 22 L, OCS	pJJ, pLGV	(223)
	Tabak	GUS, LAT52 5', CaMV 35S, NOS	pLAT52-7, pBI221	(224)
	Tabak	GUS, NPT II	pMON9909, 9749, CaMV 35S, NOS, eCaMV 35S, 7S3' polyad.	(225)
	Tabak	GUS, NPT II	pHW14, pSH1913, CaMV 35S, 3' CaMV	(226)

Anwendungen	Pflanze	Gen/Reportergen	Plasmid/Promotor/Terminator	Literatur
Herbizid-resistenz	Weizen	GUS, <i>hpt</i>	pBI1221, CaMV 35 S, 3xEnhancer, Adh Mais, Intron 1	(227)
	Zwiebel	TMV	p35S-CAT, CAT, TMV RNA	(228)
	Hafer	<i>bar</i> , <i>uidA</i> , GUS	pBARGUS CaMV 35S, Adh 1 Intron, NOS, Adh 1 Promotor	(68)
	Mais	ALS, <i>bar</i> , LUC, GUS	pALSLUC, pBARLUC, CaMV 35S, Adh 1 Intron, NOS	(229)
	Reis	<i>bar</i> , <i>hmr</i> , GUS	WRG, CaMV 35S, 5' nichttranslierte Leaderseq., NOS	(69)
	Weizen	EPSP, NPT II, GUS	pMON, E35S, Adh 1 Intron, NOS	(230)
	Weizen	<i>bar</i> , GUS	pBARGUS, CaMV 35S, Adh 1 Intron, NOS	(72)
	Weizen	<i>bar</i> , GUS	pBARGUS, pAHC, pMON, CaMV 35S, Adh 1 Promotor, Adh 1 Intron, NOS	(231)
Insektizid-resistenz	Mais	<i>cryIA(b)</i> , <i>bar</i> , GUS	pCIB4418, pCIB4431, CaMV 35S, PEPC Promotor, Pollen-Promotor	(105)
Virus-resistenz	Gerste	BYDV (CMP), <i>bar</i> , <i>uidA</i>	pRsa1ByyDVcp, CaMV 35S, NOS	(76)
	Hafer	WDV, Kan	pJITI (pBIN)	(66)
	Papaya	PRV, GUS	pGA, CaMV 35 S, NOS	(232)
	Mais	MDMV-B (CPM), NPT II	pZO (pNGI), Mdmv-cp cassette, 35S, Adh 1 Intron NOS	(233)
Plastiden-transformation				
Grundlagen	Tabak	CAT	pHD, pAC, psbA, rbcL, atpB Promotoren	(17)
	Tabak	16SrDNA	pZS148	(18)
	Tabak	GUS, CAT	pHD203, <i>psbA</i> Promotor, RNA T1, T2 Terminator	(19)
	Tabak	16SrGen	pJS75	(234)
	Weizen	GUS	pBI121, pHD203-GUS, CaMV 35S, NOS, psbA Promotor, RNA T1 und T2 Terminator	(2)



TMV (tabacco mosaic virus)  
 MDMV-B (maize dwarf mosaic virus strain B)  
 PRV (papaya ringspot virus)  
 WDV (wheat dwarf virus)  
 PVX (potato virus X CP: coat protein, CP antisense)  
 E35S (enhanced 35S promotor CaMV)  
 NOS (nopaline synthase gene)  
 NPT II (neomycin phosphotransferase gene)  
 16SrDNA Gene für Spectinomycin, Streptomycinresistenz  
 psbA Chloroplasten-Promotor einerseits von Bohnen, andererseits von Mais  
 rbcL, atpB, Promotoren von Mais  
 LAT52 Pollenspezifisches Gen von Tomaten, Promotor und 5' Ende des Genes als Promotor  
*phy* Phytochrom von Hafer  
 Reportergene:  
 GUS  $\beta$ -glucuronidase *nidA* Lokus in *E. coli* katalysiert die Hydrolyse verschiedener  $\beta$ -glucuronid substrate  
 PPT phosphinothricin, *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*  
 NPT II, gen von Tn5 neomycin phosphotransferase  
*bar*: Resistenz gegen das Herbizid Basta. Das *bar*-Gen kodiert für das Enzym phosphinothricin acetyltransferase (PAT), welches das (PPT) inaktiviert. Phosphinothricin ist die aktive Substanz von Basta  
 GUS: (*UidA*), welches für die  $\beta$ -glucuronidase kodiert.  
 ALS<sup>r</sup>: Gen, welches Acetolactate-synthase resistent macht gegen Sulfonylharnstoff Herbizide. Acetolactatesynthase ist das erste Enzym im Biosyntheseweg der verzweigten Aminosäuren und ist auch Ziel von vielen Herbiziden einschliesslich der Sulfonylharnstoff-Herbizide.

### *Chemische Methoden (PEG, CaCl<sub>2</sub> mit und ohne Elektroporation)*

Fremd-DNA kann auch mittels chemischer Methoden in Pflanzenzellen eingeschleust werden. Dabei werden zuerst Protoplasten hergestellt. Protoplasten sind Pflanzenzellen, deren Zellwände enzymatisch aufgelöst wurden, so dass sie nur noch von einer Plasmamembran umhüllt sind. Während die dicke, starre Zellwand mit ihren engen Poren DNA normalerweise nicht passieren lässt, kann durch die Plasmamembran der Protoplasten ein Komplex aus Polyethylenglykol (PEG) und DNA in die Zelle eindringen. Polyethylenglykol ist ein dickflüssiges, organisches Polymer und wird oft für die Transformation von Zellen verwendet. Alternativ kann an Stelle des PEGs Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) eingesetzt werden, welches ähnliche Eigenschaften besitzt wie PEG.

Eine weitere physikalische Methode ist die Elektroporation. Kurze elektrische Impulse hoher Spannung erzeugen kurzzeitig Poren in der Membran, durch die Genmaterial in die Zelle gelangen kann. Für die Transformation von Pflanzenzellen wird die Elektroporation oft mit PEG oder mit CaCl<sub>2</sub> kombiniert angewandt. Eine starke Limitierung dieser Methode besteht darin, dass es bei vielen Pflanzenarten Probleme bereitet, aus isolierten Protoplasten wieder komplette Pflanzen zu regenerieren. Dies gilt im besonderen für die verschiedenen Getreidearten. Bei Mais und Weizen entstehen, wenn die Regeneration überhaupt gelingt, in der Regel unfruchtbare Gewächse. 1988 gelang es zum erstenmal, Mais mittels Elektropora-

tion mit dem Neomycin Phosphotransferase II (*npt II*) Gen zu transformieren und anschliessend die Maispflanzen zu regenerieren (23). Zuvor wurden schon etliche Maispflanzen mit der Elektroporationsmethode stabil transformiert, ohne jedoch ganze Pflanzen regenerieren zu können (24, 25). Kurze Zeit später gelangen die erfolgreichen Regenerationen von transgenem Reis (*Oryza sativa* var. japonica und *indica*) und transgenem Mais (26–30) (Tabelle 3).

Die Fusion von DNA-enthaltenden Liposomen mit Protoplasten (Liposomenfusion) ist eine weitere Methode, mit deren Hilfe Pflanzenzellen transformiert werden können. Obwohl diese Methode in anderen Bereichen etabliert ist, weist sie gegenüber dem direkten Gentransfer in Pflanzen keinen Vorteil auf (31–33).

Tabelle 3. Chemische Transformationen

Anwendungen	Pflanze	Gen/Reportergen	Plasmid/Promotor/Terminator	Literatur
Grundlagen	Hafer	$\alpha$ -Amylase, GUS	p $\alpha$ 2GT, $\alpha$ -Amy Promotor, NOS Terminator	(234)
	Mais Elektroporation	NPT II	pCaMVNEO, CaMV 35S, NOS	(24)
	Mais nackte DNA	NPT II	pDP23, pMP1, CaMV 35S, 3' ocs	(27)
	Mais Elektroporation	CAT	pDH, CaMV 35S, oc	(235)
	Mais Elektroporation	CAT	pUBI-CAT, Ubi Promotor, CaMV 35S Promotor, NOS	(236)
	Mais Elektroporation	<i>neo</i>	pDE108, CaMV 35S, 3' ocs	(207)
	Mais PEG	<i>dhfr</i>	pMP, PDMP, CaMV 35S Promotor und Terminator	(180)
	Mohrrübe, Tabak Elektroporation	CAT, AMP <sup>R</sup>	pNOSCAT, pCaMVCAT, NOS Promotor und Terminator, CaMV 35S, NOS	(229)
	Reis Elektroporation	<i>hph</i>	pGL2, CaMV 35S Promotor und Terminator	(26)
	Reis Elektroporation	<i>hph</i> , GUS	pUC12-O12-GUS, pCH, <i>rolC</i> , NOS, CaMV 35S, NOS	(194)

Anwendungen	Pflanze	Gen/Reportergen	Plasmid/Promotor/Terminator	Literatur
Herbizidresistenz Insektizidresistenz Virusresistenz Plastiden	Reis PEG	<i>hph</i>	pGL2, CaMV 35S Promotor und Terminator	(237)
	Reis Elektroporation	GUS	pGL2, CaMV 35S	(238)
	Reis Elektroporation	GUS, <i>hph</i>	pAIGN, CaMV 35S, Intron 1 von <i>Adh1</i> , NOS	(190)
	Soja Elektroporation	APH II	pCMC, NOS Promotor und Terminator	(239)
	Rohr-Schwingel PEG	<i>bar</i> , <i>hph</i>	pGL2, CaMV 35S, pDH51 Terminator	(240)
	Reis Elektroporation	<i>cryIA(b)</i> , <i>hph</i>	pBT1291, CaMV 35S, Bohnen-Katalase Int 1, NOS	(106)
	Mais Elektroporation	MDMV-B, NPT II	pZO (pNGI), Mdmv-cp cassette, 35S, AdH intron NOS	(233)
	Reis	RSV (CPM), GUS	pLAN150, CaMV 35S, 1 Intron castor bean cat., NOS	(107)
Plastiden	Tabak PEG	Spectinomycin-resistenz	pZS148	(24)

PEG: Polyethylenglykol  
 Int: erstes Intron der castor bean catalase 1  
*rolC*: Promotoren Region (5'upstream nicht-kodierende Region) von ORF 12 (*rolC*) des Ri Plasmides.  
 RSV: rice stripe virus

## Expression fremder Gene in Pflanzen

### Markergene für transgene Pflanzen

Die stabile Integration fremder DNA in das pflanzliche Genom ist ein recht seltenes Ereignis, welches ungefähr in einem von hunderttausend Fällen auftritt. Aus diesem Grund werden zusätzlich zu den gewünschten transgenen Merkmalen sogenannte Markergene eingeschleust, damit transformierte Pflanzenzellen leichter



identifiziert werden können. Diese Markergene erlauben die Vorselektion von transformierten Pflanzenzellen auf einfache Weise. In den meisten Fällen werden Antibiotikaresistenzgene oder Herbizidresistenzgene als Markergene eingesetzt (Tabelle 4).

Tabelle 4. Heute gebräuchliche Markergene

Markergen	Genprodukt	Quelle	Selektion	Literatur
<i>nptII</i>	Neomycin Phosphotransferase	Tn5	Kanamycin, G418, Paromycin, Neomycin	(35–37)
Ble	Bleomycin Resist.	Tn5 und <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	Bleomycin Phleomycin	(44, 181)
<i>dhfr</i>	Dihydrofolat Reduktase	Plasmid R67	Methotrexate	(37)
<i>cat</i>	Chloramphenicol Acetyltransferase	Tn9	Chloramphenicol	(38)
<i>aphIV</i>	Hygromycin	<i>E. coli</i> Phosphotransferase	Hygromycin B	(42, 182)
SPT	Streptomycin Phosphotransferase	Tn5	Streptomycin	(43)
<i>aacC3</i> <i>aacC4</i>	Gentamycin-3-N Acetyltransferase	<i>Serratia marcescens</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gentamycin	(183)
<i>bar</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Phosphinothricin Bialophos	(52, 184)
EPSP	5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphat- synthase	<i>Petunia hybrida</i>	Glyphosate	(48)
<i>bxn</i>	Bromoxynil spezifische Nitrilase	<i>Klebsiella ozaenae</i>	Bromoxynil	(46)
<i>psbAk</i>	QB Protein	<i>Amaranthus hybridus</i>	Atrazin	(83)
<i>tfdA</i>	2, 4-D monooxygenase	<i>Aliccaligenes eutrophus</i>	2, 4 Dichlorphenox acetic acid	(185)
DHPS	Dihydrodipicolinate Synthase	<i>E. coli</i>	S-aminoethyl L-cysteine	(186)
AK	Aspartatkinase	<i>E. coli</i>	hohe Konzentration an Lysin und Threonin	(186)



Markergen	Genprodukt	Quelle	Selektion	Literatur
<i>sul</i>	Dihydropteroate	Plasmid R46	Sulfonamide	(45)
<i>csr1-1</i> (ALS <sup>r</sup> )	Acetolactate Synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sulfonylharnstoff Herbizide	(187)
<i>tdc</i>	Tryptophandecarboxylase	<i>Catharanthus roseus</i>	4-methyl tryptophan	(188)

Kanamycin:	bindet an die Untereinheit 30S RNA und inhibiert so die Initiation der Translation.
Hygromycin:	Interaktion mit EF-2 (Elongationsfaktor), was zu einer Proteinsyntheseinhibition führt.
PPT:	Glutamatanalogon, inhibiert die Glutamatsynthese, was zu einer Akkumulation von Ammoniak führt.
Sulfonylharnstoffe:	Inhibition der ALS, was zu einer Aushungerung von verzweigten AS führt.
PPT:	Phosphinothricin <i>bar</i> -Gen aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .
NPTII:	Gen von Tn5 neomycin phosphotransferase.
<i>bar</i> :	Resistenz gegen das Herbizid Basta. Das <i>bar</i> -Gen kodiert für das Enzym phosphinothricin acetyltransferase (PAT), welches das (PPT) inaktiviert. Phosphinothricin ist die aktive Substanz von Basta.
GUS:	( <i>UidA</i> ), welches für die $\beta$ -glucuronidase kodiert.

Unter diesen Markergenen wird das *npt II* (*kan*) aus dem bakteriellen Transposon Tn5, welches für die Neomycin-Phosphotransferase II (NPT II) kodiert, am meisten eingesetzt (34). Das Enzym NPT II vermittelt Resistenz gegenüber den Aminoglycosid-Antibiotika Kanamycin (35), Neomycin (36) und G-418 (37, 38). Das Resistenzgen *npt II* hat aber verschiedene Nachteile: 1. Viele wichtige Kulturpflanzen, wie z. B. Weizen, haben für Kanamycin und seine Derivate eine schlechte Sensitivität, 2. das Ausmass der Kanamycin-Resistenz korreliert schlecht mit der Expression des *npt II*-Genes und ist deshalb ein schlechter Indikator für die Expression des co-transformierten Genes. Zudem wird das *npt II* in verschiedenen Transformationslinien nicht gleich stark exprimiert (39). Aus diesen Gründen wurde die Entwicklung weiterer Selektionsmarker vorangetrieben. Folgende Resistenzgene dienen heute als Markergene: Chloramphenicol (38), Methotrexat (38, 40, 41), Hygromycin (42), Streptomycin (43), Bleomycin (44), Sulfonamid (45), Bromoxynil (46), 2,4-D (47), Glyphosphat (48) und Phosphinothricin (49). Diese Selektionsmarker lösen die oben erwähnten Probleme des *npt II*-Selektionsmarkergenes aber nur zum Teil.

Aus verschiedenen Gründen ist es erstrebenswert, die Markergene nach der erfolgreichen Transformation wieder aus dem Pflanzengenom zu entfernen (50). Hochertragssorten von Kulturpflanzen werden in Zukunft laufend gentechnologisch verändert werden. Zu diesem Zweck werden solche Pflanzen immer wieder mit neuen Genen transformiert werden müssen. Damit aber nicht bei jeder gentechnologischen Veränderung neue Markergene eingesetzt werden müssen, wur-

den Methoden entwickelt, um die Markergene nach erfolgter Transformation wieder aus dem Pflanzengenom zu entfernen. Ein zweiter Grund, Markergene aus transgenen Pflanzen zu entfernen, ist die Beobachtung, dass homologe Rekombination zwischen Markergenen dazu führen kann, dass die stabil integrierten Gene nicht mehr exprimiert werden (51). Da die benutzten Markergene oftmals für Antibiotikaresistenzen kodieren und die Frage, ob solche Gene horizontal auf andere Organismen weitergegeben werden können, immer noch nicht abgeklärt ist, sollten diese Markergene grundsätzlich wieder aus dem Genom der transgenen Pflanze entfernt werden.

Markergene können mit verschiedenen Methoden wieder aus dem Pflanzengenom entfernt werden:

1. Cotransformation mittels doppelter *Agrobacterium tumefaciens*-Injektion, d. h. gleichzeitige Transformation durch zwei verschiedene Ti-Plasmide. Zwei Voraussetzungen müssen hier erfüllt sein: Einerseits muss die Transformationsrate hoch sein, andererseits müssen die cotransformierten DNA-Moleküle genetisch voneinander unabhängig sein. Solche Systeme wurden mehr oder weniger erfolgreich angewandt (41, 52, 53).
2. Ortsspezifische DNA-Rekombination: Es gibt heute 4 Systeme, die z. T. schon bei Pflanzen eingesetzt werden.
  - a) Am häufigsten wird ein vom Bakteriophagen P1 abgeleitetes System verwendet. In diesem System katalysiert die Cre-Rekombinase die Rekombination zwischen zwei 34 bp langen *lox P*-Sequenzen, welche in direkt repetierter Anordnung vorliegen. Dabei werden die zwischen den *lox P*-Stellen liegenden DNA-Sequenzen herausgeschnitten (54, 55). Dieses System wurde bei *Arabidopsis* und bei Tabak mit Herbizidresistenzgenen angewandt. Falls die *lox*-Sequenzen in repetierter Anordnung zueinander liegen, wird die dazwischenliegende Sequenz mit Hilfe der Cre-Rekombinase umgekehrt (54).
  - b) Das 2 µm Plasmid aus *Saccharomyces cerevisiae* kodiert für ein ortsspezifisches Rekombinationssystem (56). Markergene werden dabei zwischen die asymmetrischen, umgekehrt repetierten Sequenzen (FRTs), welche Substrate sind für die ortsspezifische Rekombinase (FLP), kloniert. Die Transformation von transgenen Pflanzenzellen mit einem Plasmid, welches für diese FLP-Rekombinase kodiert, resultiert in der Entfernung des Markergenes. Dieses System wurde bei *Pichia pastoris*, Mais- und Reis-Protoplasten angewandt (57).
  - c) Viele Mais-Transposons behalten ihre Fähigkeit, von einem Ort an einen anderen Ort zu transponieren, wenn sie in andere Pflanzen, wie zum Beispiel Tabak (58, 59) oder Tomate (60), eingeführt worden sind. Diese Beobachtungen führten zur Entwicklung einer Serie von Transformationsvektoren, welche mittels Mais-Transposons die Entfernung von Markergenen aus dem Genom ermöglichen. Das *Ac/Ds* Transposon Modellsystem wurde benutzt, um die beiden Gene *npt II* und *gus* in das Genom der Tomate zu integrieren und anschliessend wieder daraus zu entfernen. *Ac/Ds* und *Spm/dSpm* sind die am häufigsten eingesetzten Mais-Transposons (61, 62).



- d) Das System mit der Gin-Rekombinase vom Bakteriophagen Mu ist eine weitere Methode, um DNA-Sequenzen wieder aus dem Genom zu entfernen. *Maeser* und *Kahmann* (63) konnten zeigen, dass mit diesem System einerseits die Richtung des *gus*-Genes geändert und andererseits das *gus*-Gen wieder aus dem Genom der Tabakpflanze entfernt werden kann.

Mit diesen vier kurz vorgestellten Rekombinationssystemen wird es in Zukunft möglich sein, Markergene problemlos wieder aus transgenen Pflanzen zu entfernen.

### *Kontrolle der Expression von fremder DNA*

#### *Integrationsort*

Die Expression von transgenen Merkmalen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst:

- a) Von der Position des Gens im Genom,
- b) von Promotoren und Terminatoren des Transkripts,
- c) von der Struktur des Transkripts,
- d) von der Stabilität des Transkripts,
- e) durch post-transkriptionelle Modifikationen (Polyadenylierung),
- f) durch die Translationseffizienz (64). Angestrebt wird eine stabile Expression des transgenen Merkmals zur richtigen Zeit am richtigen Ort.

Damit in der Pflanze die gewünschte Eigenschaft exprimiert wird, muss das eingeschleuste DNA-Stück in subtiler Weise auf die Pflanzenzelle abgestimmt sein. Gene weisen generell drei in ihrer Funktion verschiedene Abschnitte auf: die Promotorsequenz, die den Anfang markiert und das Startsignal für das Ablesen des Gens setzt, die kodierende Region mit dem Bauplan des Proteines und schliesslich ein kurzer Abschnitt, der dafür sorgt, dass an das Ende des mRNA-Transkriptes bei der anschliessenden Prozessierung enzymatisch eine Poly-A-Sequenz angefügt wird. Bei der Kombination dieser drei Teile hat man recht grosse Freiheiten. Werden Abschnitte verschiedener Gene neu zusammengestellt, spricht man von Genchimären. Bei passender Start- und Endregion kann der kodierende Abschnitt im Prinzip von jedem beliebigen Organismus stammen. Die Wahl der Promotoren kann bestimmen, wo ein Genprodukt entsteht, ob in den Blättern, den Wurzeln, den Samen oder den Knollen oder sogar nur in bestimmten Zelltypen der entsprechenden komplexen Gewebe. Die Lokalisierung des Gens, d. h. seine Integrationsstelle im Genom, spielt dabei eine grosse Rolle (65). Diese Tatsache kann bei transgenen Merkmalen mit Hilfe von Transposons ausgenützt werden. Transposons vermögen nicht nur Markergene wieder aus den transgenen Pflanzen zu entfernen, sondern sie können Gene von einem Genort zum anderen translozieren. Dadurch kann die Expression der transgenen Eigenschaften gesteuert werden. Mit dieser Technik ist es möglich, Pflanzenlinien herzustellen, welche die transgene DNA in optimaler Konzentration exprimieren. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von transgenen Pflanzen.



Arbeiten mit den DS-Elementen von Mais zeigen, dass in verschiedenen Zelllinien die Expressionen von *gus*, das unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors steht (siehe unten), stark variieren. Obwohl Linien mit erhöhter Expression oft mehrere Integrationen des *gus*-Genes aufwiesen, gibt es auch starke Hinweise, dass der Integrationsort für eine erhöhte Expression wichtiger ist als die Anzahl der integrierten *gus*-Gene. Sobald Zelllinien gefunden werden, welche das Gen in gewünschter Menge exprimieren, kann dann mittels genetischer Segregation das Transposonelement wieder entfernt werden, so dass die transgene Eigenschaft stabil an die Nachkommen weitervererbt wird. Heute ist die Tendenz zu Mehrfachintegrationen von transgenen Eigenschaften (66–70) vorhanden. Solche Mehrfachintegrationen könnten benutzt werden, um gentechnologische Pflanzen nachzuweisen (zum Beispiel mit RAPD-Analysen oder RFLP).

### Promotoren

Die Expression eines transgenen Merkmals hängt neben dem Integrationsort auch sehr stark von seinem vorgeschalteten Promotor ab. Hohe Expressionsraten eines Gens werden durch die Verwendung konstitutiver Promotoren, wie zum Beispiel des Cauliflower Mosaic Virus Promotor (CaMV 35S), erzielt. Der CaMV 35S Promotor wird erfolgreich in Dikotyledonen eingesetzt, hingegen zeigt dieser Promotor in Monokotyledonen sehr niedrige Expressionsraten (64).

Die Kombination des 1. Introns des Mais-Alkohol-Dehydrogenase-1-Gens (*Adh1*) und des CaMV 35S Promotors verbesserte die Effektivität dieses Promotors, so dass das *bar*-Gen in Mais (71), Hafer (68) und Weizen (72) exprimiert wurde. Der Gebrauch von konstitutiven Promotoren in transgenen Pflanzen ist vorwiegend auf die Expression von Antibiotika oder Herbizidresistenzgenen in Dikotyledonen beschränkt (64).

Eine andere Strategie, die Expression transgener Eigenschaften zu kontrollieren, besteht darin, die 5'-nicht kodierenden Sequenzen von Genen, welche in hohem Masse in spezifischem Pflanzengewebe exprimiert werden, zu isolieren und als Promotorsequenzen vor die Fremdgene zu klonieren. Als Beispiel sei der Emu-Promotor, welcher für die Expression gewisser Gene verantwortlich ist, die bei der Photosynthese eine wichtige Rolle spielen, erwähnt. Die Modifikation durch diesen Promotor erlaubte die Expression der Neomycin-Phosphotransferase (NPT II) in transformiertem Reis (73) und Zuckerrohr (74).

In der letzten Zeit wurden Anstrengungen unternommen, um Promotoren aus Monokotyledonen zu isolieren, welche natürlicherweise hohe konstitutive Expressionsniveaus zeigen. Beispiele dafür sind die Promotoren der Gene für Actin (*Act1*) von Reis und Ubiquitin (*Ubi1*) von Mais, welche zur Expression des *bar*-Reportergens in transgenem Weizen (75), Gerste (76) und Reis (66, 77) verwendet wurden (Tabelle 5). Solche pflanzlichen Promotoren werden in den nächsten Jahren sicher immer häufiger benutzt werden, um transgene Eigenschaften in Pflanzen zu exprimieren. Die Sequenzen dieser Promotoren könnten als Sonden dienen, um gentechnologisch veränderte Pflanzen nachzuweisen.

Tabelle 5. Pflanzliche Promotoren

Promotor	Gen	Quelle	Literatur
<i>Adh1</i>	Alkohol Dehydrogenase 1 ( <i>Adh1</i> )	Mais	(189, 190)
<i>His 3</i>	Histon 3	Weizen	(191)
<i>LHCP</i>	Chlorophyll a/b Bindungsprotein des Photosystemes II	Reis	(70)
<i>rbcS</i>	kleine Untereinheit der Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase	Reis, Tomate	(192)
<i>PinII</i>	Wund induzierbares Gen II	Kartoffel	(193)
<i>rolC</i>	ORF 12 der Ri Plasmid TL-DNA Region	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	(194, 195)
<i>EMU</i>	<i>Adh1</i> von Mais	Reis, Zuckerrohr	(73, 74)
<i>RTBV</i>	Rice tungro bacilliform virus major transcript	Rice tungro bacilli-from virus	(197)

### Gegensinn-RNA (*Antisense-RNA*)

Die Gegensinn-RNA-Technik ist eine Methode, die in den letzten Jahren vor allem wegen des Beispiels der Reifeverzögerung von Tomaten Bekanntheit erlangt hat.

Expressionsregulation von spezifischen Genen mittels Gegensinn-RNA ist ein natürlicherweise vorkommender Mechanismus in Bakterien (78, 79). Die Gegensinn-RNA-Technologie wurde Ende der 70er Jahre entwickelt, um in der Grundlagenforschung die Aktivität von spezifischen Genen zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Technik können Gene gezielt ausgeschaltet werden. Während der Genexpression wird die DNA zuerst in mRNA transkribiert, welche ihrerseits dann wiederum in die Form eines Proteines translatiert wird. Die Idee der Gegensinn-technik ist die *In vivo*-Synthese eines Stücks RNA, welches eine komplementäre Sequenz zu einer Ziel-mRNA aufweist. Diese Gegensinn-RNA hybridisiert an die mRNA und unterdrückt so die Translation. Heute werden zwei verschiedene Strategien verfolgt: einerseits wird ein Gen, welches in inverser Richtung von einem Promotor gelesen wird, in das Genom integriert, andererseits kann man synthetische Gegensinn-RNA in Zellen injizieren, um ebenfalls eine Inhibition der Translation einer Ziel-mRNA zu erhalten. Aufgrund neuester Beobachtungen wird die Theorie der Hybridisierung der beiden RNA-Moleküle in Frage gestellt. Vielmehr nimmt man an, dass der Positionierungseffekt eine wesentlich wichtigere Rolle spielt und dass es nicht von Bedeutung ist, ob Sinn- oder Gegensinn-RNA produziert wird. Eine andere Hypothese besagt, dass Antisense-RNA unübliche dreidimensionale Strukturen bildet und so die Transkription der Sinn-RNA stört (51).

Die Technik der Gegensinn-RNA wird bei Pflanzen vorwiegend eingesetzt um  
a) Reifungs- und Weichwerdungsprozesse in Pflanzen zu manipulieren,



- b) um in den Pflanzenmetabolismus einzugreifen und z. B. die Struktur oder Konzentration von bestimmten Kohlenhydraten und Fettsäuren zu verändern und
- c) um Pflanzen resistent gegen Viren zu machen.

## Anwendungsbereiche der Gentechnologie bei Pflanzen

### *Herbizidresistenz*

Unkräuter sind Konkurrenten der Nutzpflanzen und machen ihnen Wasser, Nährstoffe und Licht streitig, wodurch der Ernteertrag wesentlich verringert werden kann. Ausserdem mindern sie, wenn sie die abgeernteten Feldfrüchte verunreinigen, deren Wert. Zusätzlich können Unkräuter auch noch Schädlingsservoir sein. Mit Herbiziden und sorgfältiger Bodenbearbeitung lässt sich Unkrautwuchs meist gut unter Kontrolle halten. Weil aber ein einzelnes Herbizid jeweils nur ein begrenztes Wirtsspektrum hat, also nur wenige Unkrautsorten tilgt, muss man während der Wachstumsperiode oft mehrere verschiedene Mittel ausbringen. Mit Hilfe der Gentechnik können Pflanzen erzeugt werden, denen ein bestimmtes Breitbandherbizid nicht schaden kann. Heute ist es möglich, Pflanzen gegen ungefähr ein Dutzend Herbizide resistent zu machen (3). Verschiedene Herbizide sind auf dem Markt, gegen welche schon resistente, transgene Pflanzen hergestellt worden sind. Die kommerziell gebräuchlichen Herbizide sind den folgenden Wirkstoffklassen zuzuteilen:

*Glean* von Dupont (Sulfonylharnstoff; Chlorsulfuron)

*Oust* von Dupont (Sulfonylharnstoff; Sulfometuron-methyl, (80))

*Triasulfuron* von Ciba-Geigy (Sulfonylharnstoff, (81))

*Roundup* von Monsanto (Glyphosate, (9))

*Basta* von Hoechst (Glyphosinate, Phosphinothricin (PPT) (49))

*Herbiace* von Meiji Seika Ltd. (PPT Fermentation durch *S. hygroscopicus*; (49))

*Buctril* von Rhône-Poulenc (Bromoxynil)

Herbizidresistenz kann auf verschiedene Arten bewirkt werden:

1. Überproduktion des herbizidsensitiven Zielmoleküles,
2. strukturelle Veränderung des Zielmoleküles, was zu einer reduzierten Affinität führt und
3. Detoxifizierung oder Degradierung des Herbizides, bevor es das Zielmolekül erreicht.

Das Herbizid Roundup, mit dem Zielmolekül 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphat-Synthase (EPSP), ist ein Beispiel für die erste Strategie. Resistenzen gegen Sulfonylharnstoffe wie Glean und Oust beruhen auf einer mutanten Version von Acetolactate-Synthase (ALS), welche in Canola und Baumwolle eingeführt wurde. Resistenzen gegen Herbizide, die mit den ersten zwei Ansätzen erreicht worden sind, richten sich gegen Glyphosate (48, 82), Atrazin (83), Sulfonylharnstoffe (80)



und Phosphinothricin (84). Auch die Detoxifizierung von Herbiziden ist beschrieben worden, z. B. für Phosphinothricin in Tabak, Tomaten und Kartoffeln (49).

In den nächsten Abschnitten wird kurz auf die Wirkungsmechanismen einiger Herbizide und Herbizidresistenzgene eingegangen. Das Herbizid Bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitril) ist ein Photosyntheseinhibitor des Photosystemes II in Pflanzen. Bromoxynil bindet an eine Komponente des Quinonbindungsproteinkomplexes des Photosystemes II und inhibiert so den Elektronentransport. Das *bxn*-Gen aus *Klebsiella ozaenae* kodiert für eine spezifische Nitrilase, welche Bromoxynil in seine primären Metaboliten 3,5-dibromo-4-hydroxybenzoioc Säure konvertiert. *Stalker et al.* (46) setzten das *bxn*-Gen unter die Kontrolle eines durch Licht regulierten gewebespezifischen Promotors, der die kleine Untereinheit der Ribulose-Bisphosphate-Carboxylase exprimiert (85). Gene der kleinen Untereinheit der Ribulose-Bisphosphate-Carboxylase-Familie werden nur in photosynthetisch aktiven Geweben exprimiert. Der Grund, diesen Promotor zu verwenden, ist der folgende: da das primäre Ziel des Herbizides die Photosynthese ist, wird das Herbizid direkt an seinem Wirkungsort inaktiviert. Mit transgenen Tabakpflanzen und Baumwollpflanzen wurden Feldversuche durchgeführt, die die Bromoxynilresistenz bestätigten (3).

Erste Schritte in Richtung Glyphosatoleranz wurden bereits im Jahre 1983 unternommen. Damals isolierten verschiedene Forscherteams aus Bakterien und Pflanzen die Gene für die 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphat-Synthase (EPSP-Synthase) (82, 86). Ausserdem identifizierten sie Varianten dieser Gene, deren Proteinprodukte weniger empfindlich gegen Glyphosate (N-Phosphonomethylglycine) sind. Diese Gene wurden schliesslich in verschiedene Nutzpflanzen wie Tomate, Sojabohne, Baumwolle und Raps eingeführt. Das Herbizid Glyphosate (N-Phosphonomethylglycine) inhibiert die EPSP-Synthase, welche ihrerseits die Formation von 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphat aus Phosphoenolpyruvate und Shikimate-3-Phosphat katalysiert. Die Inhibition dieses Shikimate-Biosyntheseweges verhindert die Synthese von bestimmten aromatischen Aminosäuren und deren sekundären Metaboliten. Zusätzlich führt die Akkumulation von Shikimate eventuell zum Zelltod (82). Das *aroA*-Gen aus *Salmonella thyphimurium* ist auch eine EPSP-Synthase. Eine Missense-Mutation im *aroA*-Gen (die aus Prolin Serin macht) führt zu einer wesentlich geringeren Affinität für Glyphosate, ohne andererseits die kinetische Effizienz des Enzymes zu verändern (86). Dieses *aroA*-Gen wurde in Tabak transformiert und die transgenen Tabakpflanzen wurden resistent gegenüber Glyphosate (82). Glyphosate tötet sowohl Gräser als auch krautige Blattgewächse ab. Bis heute konnten Soja, Mais und Canola gegen Glyphosate resistent gemacht werden. Die oben erwähnten Kulturpflanzen wurden auch in Feldversuchen gegen Glyphosate erfolgreich getestet (3).

Unkrautvernichtungsmittel, die auf der Grundlage der Sulfonylharnstofftoleranz basieren, sind Mitosehemmer. Sie blockieren das Enzym Acetolactatsynthase (ALS). Acetolactatsynthase ist das erste Enzym im Biosyntheseweg der verzweigten Aminosäuren und ist verantwortlich für die Synthese der drei essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Transgene Kulturpflanzen, welche Resistenzgene gegen die Sulfonylharnstoffe tragen, wurden entwickelt. Das

*bra*-Gen verleiht transgenen Pflanzen eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide (87).

Glyphosinat und Phosphinothricin sind weitere Wirkstoffe, die zur Unkrautbekämpfung eingesetzt werden. Diese Herbizide beeinträchtigen das Wachstum von Kräutern, indem sie die Glutaminsynthetase (GS) hemmen, die das Zellgift Ammoniak unschädlich macht. Das Genprodukt des *bar*-Gens, welches aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde, kann diese beiden Wirkstoffe inaktivieren. Das *bar*-Gen, welches gegen Bialaphos eine Resistenz zeigt, kodiert für eine Phosphinotricin-Acetyltransferase (PAT). Bialaphos ist ein tripeptidisches Antibiotikum, welches von *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird. Es besteht aus Phosphinothricin (PPT), einem Analogon der L-Glutaminsäure, und zwei L-Alaninresten. Werden diese zwei Alaninreste entfernt, entsteht PPT. PPT ist ein starker Inhibitor der Glutaminsynthetase. Inhibition der GS durch PPT führt zu einer schnellen Akkumulation von Ammoniak, was schlussendlich zum Zelltod führt. PPT ist in Pflanzen und Bakterien aktiv (Tabelle 8).

### *Insektizidresistenz*

In den üblichen Monokulturen der heutigen Landwirtschaft finden verschiedene Schädlinge ideale Nahrungsbedingungen vor. Die Schädlinge vermehren sich oft explosionsartig und können einen grossen Teil der Ernte vernichten. Die Agrodustrie reagierte mit der Entwicklung zahlreicher chemischer Schädlingsbekämpfungsmittel, welche heute in der Landwirtschaft breiten Eingang gefunden haben.

*Bacillus thuringiensis*, ein Gram-positives, Sporen bildendes Bodenbakterium, wurde 1911 vom deutschen Forscher Ernst Berliner erstmals beschrieben. Eine seuchenhafte Erkrankung bei Mehlmotten war der Anlass der Entdeckung. Während der Sporulationsphase bilden die Bacillen in grossen Mengen ein sogenanntes  $\delta$ -Endotoxin aus, welches spezifisch pathogen auf Larven von Schmetterlingsraupen wirkt. Ein im Jahr 1970 isolierter Stamm (*Bacillus thuringiensis* subspec. *kurstaki*) ist besonders virulent. Inzwischen sind Hunderte von Pathotypen bekannt, die selektiv gegen Schmetterlingsraupen eingesetzt werden können.

Verschiedene *Bacillus thuringiensis*-Stämme produzieren kristalline Proteine, welche eine insektizide Wirkung haben. Diese Kristallproteine werden typischerweise als grosse Protoxine vom Bakterium produziert, im Magentrakt des Insekts solubilisiert und anschliessend proteolytisch gespalten. Durch die Spaltung werden diese Proteine in eine toxische Form übergeführt (aktiviert). Die aktivierten Toxine binden sich an spezifische Rezeptoren im Darm der Insekten und stören den Ionentransport durch die Epithelzellen oder führen mittels Bildung von Poren zur Lyse der Epithelzellen. Diese sogenannten Frassgifte werden heute in Form von Bakteriensuspensionen routinemässig auf die Pflanzen gesprüht. Leider werden sie aber auch, etwa durch Regen, leicht von den Pflanzen abgewaschen. Ausserdem bleiben sie im Freien nur kurze Zeit wirksam und sind wegen ihrer hohen Spezifität nur sehr beschränkt gegen eine Vielzahl von Schadinsekten einsetzbar. Vor allem die Schmetterlinge (Lepidoptera-Raupen), Zweiflügler (Diptera-Larven) und Kä-



fer (Coleoptera) werden durch die  $\delta$ -Toxine abgetötet. Mitte der achtziger Jahre gelang es, die Gene für die insektentötenden Proteine zu isolieren und sie in Tomaten-, Kartoffel- und Baumwollpflanzen einzuschleusen. Obwohl in vielen Feldversuchen transgene, *Bt*-Toxingene enthaltende Pflanzen getestet wurden, konnte nur in wenigen Fällen von erfolgreichen Meldungen gegenüber Lepidopteren resistenten Pflanzen berichtet werden. Von Dipteren und Coleopteren resistenten Pflanzen konnte trotz intensiven Feldversuchen noch nicht berichtet werden (88). In einer gross angelegten Studie wurde gezeigt, dass nur ungefähr 60% von über 1000 *Bt*-Toxinisolaten toxische Wirkung auf Insekten zeigten (89). *Bt*-Toxine können aufgrund ihrer DNA-Sequenz und ihres Wirkungsspektrums in zwei Hauptgruppen aufgeteilt werden. Die Gruppe der *cry*-Gene kodiert für Toxine, welche für Insektenzellen *in vivo* und *in vitro* toxisch sind, und die Gruppe der *cyt*-Genprodukte tötet Dipteren und hat *in vitro* ein breites Spektrum. Die *cry*-Gruppe besteht aus einer grossen Familie von verwandten Proteinen (88). Cry I-Proteine töten Lepidopteren, Cry II-Proteine töten Lepidopteren und Dipteren, Cry III-Proteine töten Colepteren und Cry IV-Proteine töten Dipteren. Die Cry-Familie kann aufgrund der Proteingrösse in 2 Gruppen eingeteilt werden: eine Gruppe von 130–140kD (Cry I, Cry IVA, Cry IVB) und eine Gruppe mit ungefähr 70kD (Cry II, Cry III, Cry IVD). Die DNA-Sequenzhomologie von *cryIA* (a), *cryIA* (b) und *cryIA* (c) ist grösser als 80%. Die erst kürzlich isolierten und sequenzierten Gene *cryIB*, *cryIC* und *cryID* weisen wesentlich grössere Basenpaardifferenzen untereinander sowie auch zur *cryIA* Gruppe auf. Um ein generelles Nachweissystem für transgene Pflanzen zu erhalten, welche *Bt*-Gensequenzen enthalten, könnten hochkonservierte Sequenzblöcke der *Bt*-Toxingene benützt werden (90), um darauf ein entsprechendes PCR-System aufzubauen. Im folgenden wird weiterführende Literatur, die sich mit den Mechanismen der *Bt*-Toxine befasst, aufgeführt (88, 90–93).

Die Insektentoxine werden in *B. thuringiensis* stark exprimiert. Bis zu 50% des Totalproteingehaltes von sporulierenden *B. thuringiensis*-Kulturen besteht aus Toxinproteinen, welche in kristalliner Form in den Zellen vorliegen. Hohe Expressionsraten dieser Gene werden problemlos in anderen Bakterien, wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas* erreicht (94, 95). In Pflanzen hingegen werden die nativen *Bt*-Proteine so schlecht exprimiert, dass nur die allerempfindlichsten Laborinsekten daran zu Grunde gingen (96–98). Die Probleme mit der Expression von *B. thuringiensis*-Toxinen haben verschiedene Ursachen: Die DNA-Sequenz der *B. thuringiensis*-Gene ist AT-reich, während Pflanzen in der Regel höhere GC-Gehalte (50–70%) aufweisen. Pflanzen benützen aus diesem Grund andere Codons als *Bacillus thuringiensis* (Codon usage). Zudem scheint die Sekundärstruktur der RNA von Bakterien und Pflanzen verschieden zu sein. Um die Genstruktur dieser Toxine zu verändern, wurde in einem ersten Ansatz nur noch ein Teil der gesamten codierenden Sequenz in die Pflanze eingeführt (96, 97, 99–102). Deletionen am 3'-Ende wurden besser exprimiert als das ganze Gen, doch nicht in dem Masse, wie eigentlich anhand der eingesetzten starken Promotoren zu erwarten gewesen wäre (103, 104). Das *cryIA(b)*-Gen wurde ebenfalls fragmentiert, ohne dass die entsprechenden Genprodukte ihre toxische Wirkung verloren. Transgene Pflanzen mit



kürzeren *Bt*-Toxinfragmenten zeigten eine höhere Toxizität gegenüber den Insekten als Pflanzen mit unveränderten ganzen *Bt*-Genen (99). Die ursprünglichen Bakteriengene wurden so umkonstruiert, dass sie Pflanzengenen ähnlicher waren (GC-Gehalt 65%). Solche Konstruktionen führten zu einer 10- bis 100fachen Erhöhung der Toxinkonzentration in den Pflanzen. Die Toxinerhöhung andererseits erhöhte die Resistenz der Pflanzen gegenüber den Insekten (105).

Die höchsten Expressionsraten von *Bt*-Toxinen wurden mit synthetischen Genen erreicht. *Fujimoto et al.* (106) benutzten ein synthetisches *cryIA(b)*, um Reis zu transformieren. Eine Kombination des CaMV Promotor und dem 1. Intron des Katalasegenes aus Rizinussamen zeigte bei transgenem Reis eine starke Expression (107, 108). Die hohen Expressionsraten wurden durch mRNA-Hybridisierung bestätigt und keine Degradation der «synthetischen» mRNA konnte festgestellt werden. Auch auf der Stufe des Proteinniveaus konnten erhöhte Konzentrationen nachgewiesen werden (109). *Koziel et al.* (105) benutzten ebenfalls ein synthetisches *cryIA(b)*-Gen, um Mais zu transformieren. Einerseits wurde der CaMV-Promotor eingesetzt, andererseits zwei gewebespezifische Promotoren aus Mais, der Phosphoenolpyruvate-Carboxylase (PEPC) Promotor (277) und ein pollenspezifischer Promotor (105).

Mit insektizidresistenten Pflanzen wurden schon verschiedenste Feldversuche durchgeführt, so in den Jahren 1987 und 1988 mit transgenen Tomaten, welche ein verkürztes *cryIA(b)*-Gen (99) enthielten. Diese gentechnologisch veränderten Tomaten waren resistent gegenüber dem «tobacco hornworm». Diese Experimente zeigten für die Zukunft vielversprechende Resultate bezüglich der Resistenz gegen die ökonomisch wichtigen Pflanzenschädlinge wie den «tomato fruitworm» und den «tomato pinworm» (100). Feldversuche, welche über einen Zeitraum von 2 Jahren durchgeführt wurden, bestätigten die Resistenz gegen Raupen von «bollworm, budworm and pink bollworm» von Baumwollpflanzen (3, 101). Im Jahr 1992 führten *Carozzi et al.* (102) zudem Feldversuche mit transgenem Tabak, welcher die *cryIA(b,c)*-Gene enthielt, durch.

### Virusresistenz

Pflanzenviren können zu gravierenden Schäden bei Pflanzen führen. Viren werden oft durch Insekten auf die Pflanzen übertragen. Das Erbmateriale der Pflanzenviren besteht bei 98% der Viren aus RNA. Bei den restlichen 2% der Viren, die für Pflanzen pathogen sind, besteht das Genom aus DNA. Die RNA-Viren können grob in die 2 Gruppen Caulimoviren und Geminiviren unterteilt werden. Caulimoviren bestehen aus zirkulären, doppelsträngigen Genomen, die über ein RNA-Intermediat repliziert werden. Geminiviren bestehen aus zirkulären, einzelsträngigen Genomen. Diese Viren werden via «whitefly» auf Dikotyledonen und via «leafhoppers» auf die Monokotyledonen übertragen. Die Geminiviren haben ein zweiteiliges Genom. Um Pflanzen erfolgreich infizieren zu können, müssen beide Genome in die Pflanzen gelangen. Geminiviren können zu signifikanten Ertragsverlusten (20–100%) und Qualitätsverminderungen führen und sind ver-

antwortlich für Erkrankungen in den Hauptgetreidearten (110). Virusinfizierte Nutzpflanzen kann man bisher nicht direkt behandeln. Traditionelle Massnahmen wie Fruchtwechsel und die Beseitigung von befallenen Unkräutern und Kulturpflanzen dienen dazu, die Verbreitung der Viren einzudämmen, jedoch gelingt dies nur teilweise. Zudem wird versucht, mit Insektiziden Viren übertragende Schadinsekten unter Kontrolle zu bringen.

Transgene Pflanzen, welche DNA-Sequenzen von Pflanzenviren integriert haben, können Resistenzen gegenüber viralen Infektionen zeigen. Dieses Phänomen wird als Kreuzprotektion bezeichnet. Viele verschiedene virale Sequenzen verleihen den Pflanzen unterschiedlich starke Resistenzen gegenüber einer Infektion oder führen zu einer Abschwächung von Krankheitssymptomen. Verschiedenste virale Sequenzen, die für folgende Merkmale kodieren, wurden bisher eingesetzt:

- Hüll- oder Kapselproteine (Tabelle 6)
- Untereinheiten der Replikasen
- ganze Viren-Genome von defekten oder abgeschwächten Virenstämmen
- Satelliten-Viren (111)
- nicht kodierende Sequenzen.

Diese transgenen Sequenzen können auf verschiedenste Art auf eine Infektion durch einen pathogenen Virus einwirken. So können verschiedene Schritte der Infektion durch diese transgenen Sequenzen gestört werden, wie zum Beispiel:

- die Initiation der Infektion
- Replikation des Virus
- Duplexformation mit der Templat-DNA, was zu einer Inhibition der Transkription führt
- Inhibition des Intronsplittings
- Verhinderung des Transportes der mRNA aus dem Kern ins Cytoplasma
- Unterstützung eines raschen mRNA-Abbaus
- Initiationsblockierung der Translation
- Verhinderung der Verbreitung des Virus in der Pflanze und allgemein Verhinderung des Ausbrechens von Krankheitssymptomen.

Aufgrund der vorliegenden, zum Teil sehr kontroversen Daten über die Virusvermehrung in Pflanzen weiss man, dass die Virusreplikation in Pflanzenzellen eine subtile Abstimmung von Virus- und Pflanzenproteinen benötigt. Diese Proteine müssen in bestimmten Konzentrationen und zu bestimmten Zeiten an bestimmten Orten miteinander in Kontakt kommen. Eine externe Einmischung, wie z. B. transgene DNA-Sequenzen oder deren Proteinprodukte, kann dieses subtile Gleichgewicht ausser Kontrolle bringen und zu einer gewissen Virusresistenz in den Pflanzen führen. Auf die genauen molekularen Grundlagen dieser Mechanismen soll hier nicht näher eingegangen werden; nähere Angaben sind bei *Bejarano* und *Lichtenstein* (110), *Fitchen* und *Beachy* (111) und bei *Sandford* und *Johnston* (112) zu finden. In den nächsten Abschnitten werden einige Beispiele von transgenen, virusresistenten Pflanzen aufgezeigt.

1986 wurden erste Experimente über transgene Tomaten, welche resistent gegen bestimmte Viruserkrankungen waren, beschrieben (113). Diesen Tomaten wurde das Gen für ein Hüllprotein des Tabakmosaikvirus ins Genom integriert, was zu



**Tabelle 6.** Beispiele von transgenen Pflanzen, bei welchen eine Virusresistenz aufgrund von viralen Hüllproteinsequenzen (CMP) zustande kam

Pflanze	virales Hüllprotein	Literatur
Tabak, Tomate	Tobacco mosaic virus Virus (TMV)	(10, 212, 242–245)
Tomate	Tomato mosaic virus (ToMV)	(245)
Tabak, Kartoffel	Tobacco rattle virus (TRV), Potato virus X (PVX)	(117, 246–252)
Kartoffel	Potato virus S (PVS)	(253, 254)
Tabak	Soybean mosaic virus (SMV)	(255)
Kartoffel	Potato virus Y (PVY)0	(250, 251, 256)
Papaya, Tabak	Papaya ringspot virus (PRV)	(209, 232)
Tabak	Tobacco etch virus (TEV)	(257, 258)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Watermelon mosaic virus II (WMVII)	(259)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	(259)
<i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i>	Plum pox virus (PPV)	(260)
Reis	Rice strip virus (RSV)	(107, 261)
Tabak, Alfalfa, Tomate	Alfalfa mosaic virus (ALMV)	(243, 247, 246, 247, 262, 264)
Tabak	Tobacco streak virus (TSV)	(247)
Tabak, Gurke	Cucumber mosaic virus (CMV)	(116, 265–267)
Tabak	Arabis mosaic virus (ArMV)	(268)
Kartoffel	Potato leafroll virus (PLRV)	(269–272)
Tabak	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	(210, 273–275)
Reis	Rice tungro spherical virus (RTSV)	(261)
Mais	Maize dwarf mosaic virus (MDMV)	(233)
Gerste	Barley yellow dwarf virus (BYDV)	(76)

einer erhöhten Resistenz gegen das Tabakmosaikvirus führte. Dieses Phänomen wird «coat protein mediated» (CPM)-Resistenz genannt. Neben den Hüllprotein-Sequenzen wurden auch viele Pflanzen mit Satelliten-RNA-Sequenzen gegen Viren geschützt (114, 115). Satelliten-RNA kann als Parasit angesehen werden, welcher die Krankheitssymptome in den Pflanzen noch verstärken kann, falls er während der Virusinfektion vorhanden ist.



Das Konzept der Kreuzprotektion ergab sich aus der Beobachtung, dass der Gebrauch von milden, symptomlosen oder abgeschwächten Virenstämmen Kulturpflanzen wie Tomaten, Apfel, Zitrusfrüchte oder Papaya gegen eng verwandte virulente Virenstämmen schützte. Trotz vielen eleganten Experimenten konnten die molekularen Mechanismen, welche zu dieser viralen Kreuzprotektion führen, noch lange nicht vollständig aufgeklärt werden. In einigen Fällen scheint ein Hüllprotein, welches transgen exprimiert wird, primär für den Schutz verantwortlich zu sein, einerseits durch Verhinderung der Partikelentfaltung und andererseits durch Wiedereinkapselung der hereinkommenden RNA des pathogenen Virus. Viroide (nackte, einzelsträngige RNA) und mutierte Viren, welche einen Defekt haben und keine Virenpartikel mehr bilden können oder keine detektierbare Menge an Hüllproteinen zeigen, können ebenfalls eine Kreuzprotektion gegenüber pathogenen Virenstämmen hervorrufen. Solche Beobachtungen führten zur Hypothese, dass sowohl Gegensinn-RNA wie auch Sinn-RNA die entsprechende RNA-Maschinerie des pathogenen Virus stören könnten. Bis heute ist nicht bekannt, welche regulatorischen oder kodierenden Sequenzen und welche Polypeptidprodukte der aktiv replizierenden transgenen Virussequenz verantwortlich sind, um eine erfolgreiche Symptomminderung des pathogenen Virus zu stören oder zu verhindern. Seit der ersten durch Hüllprotein ausgelösten Protektion (10) wurde von über 20 verschiedenen Viren berichtet, gegen welche resistente Pflanzen «konstruiert» worden sind. Diese erfolgreichen Kreuz-Protektionen bezogen sich beinahe ausnahmslos auf Dikotyledonen. Bis Ende 1992 war noch von keiner durch Hüllprotein ausgelösten Protektion in Monokotyledonen berichtet worden, was hauptsächlich auf technische Probleme bei der Transformation und Regeneration von Monokotyledonen zurückzuführen ist.

Verschiedene Gruppen versuchten, Pflanzen mit Hilfe von Antisense-RNA resistent gegen Viren zu machen. Da 98% der pflanzenpathogenen Viren ein RNA-Genom haben und wahrscheinlich nur im Cytoplasma der Pflanzenzellen replizieren, müsste die Antisense-RNA durch die Kernmembran ins Cytoplasma gelangen, wobei die Wahrscheinlichkeit der RNA-Degradierung durch RNasen im Cytoplasma relativ hoch wäre. Die Degradierung von Gegensinn-RNA, bevor sie mit Sinn-RNA hybridisiert hat, ist wahrscheinlich einer der Gründe, weshalb viele Experimente mit Gegensinn-RNA-Konstrukten nicht erfolgreich waren (113, 116, 117).

Nachteil der oben erwähnten Strategie der Kreuzprotektion ist das Fehlen eines generellen Einsatzbereichs. Die transgene DNA-Sequenz vermittelt der Pflanze Resistenz gegen ein sehr enges Spektrum von Viren. Daher wurden in den letzten Jahren andere Ansätze gesucht, um virenresistente Pflanzen zu züchten.

In Säugetieren erzeugt das Interferonsystem eine universelle antivirale Antwort. Interferone, welche nach einer Virusinfektion während der Zellproliferation und bei einigen immunologischen Prozessen sezerniert werden, induzieren die Synthese von Proteinen, welche dann direkt die Virusvermehrung hemmen. Eines dieser Proteine ist die 2'-5' Oligoadenylat-Synthetase, welche eine Endoribonuclease (RNase L) zu aktivieren vermag, die ihrerseits wiederum virale und zelluläre RNA degradieren kann. Das 2'-5' Oligoadenylat Synthetase-Gen wurde mit Hilfe von

*A. tumefaciens* in Kartoffeln eingeschleust (118). Diese transgenen Pflanzen wurden mit anderen transgenen Kartoffeln, welche ein Hüllprotein von PVX (potato virus X) synthetisierten, auf die Resistenz gegen das PVX verglichen. Beide Pflanzen zeigten ähnliche PVX-Resistenz. Die 2'-5' Oligoadenylat-Synthetase scheint also auch in Pflanzen generell anwendbar zu sein. Ein solches, generell einsetzbares System wäre auch einfacher nachzuweisen, da nur eine Sequenz und nicht Hunderte verschiedener Virensequenzen zu detektieren wären.

Weitere Strategien bestehen darin, Antikörper gegen Virusbestandteile in Pflanzen exprimieren zu lassen (119) oder Pflanzenviren so zu verändern, dass sie einerseits der Pflanze nicht schaden und andererseits pathogene Viren, welche die Pflanze befallen, zerstören oder deren Verbreitung in der Pflanze verhindern. Die gentechnisch veränderten Viren werden auf Pflanzen gespritzt, wo sie sich anschliessend ausbreiten und die infizierten Pflanzen vor pathogenen Viren schützen.

### *Resistenzen gegen pathogene Pilze und Bakterien*

Pflanzen verfügen über verschiedene Mechanismen, um pathogene Pilze abzuwehren. Einerseits versuchen die Pflanzen, ihre Zellwand so zu modifizieren, dass sie gestärkt wird und dem Eindringen von Pilzen entgegenwirken kann. Die Synthese von toxischen antimikrobiischen Substanzen, wie zum Beispiel Phytoalexine, sowie die Induktion von Proteinaseinhibitoren und lytischen Enzymen wie Chitinase und  $\beta$ -1,3-Glucanase sind weitere Mechanismen, um Pilze zu zerstören. In den letzten Jahren wurden verschiedene Enzyme isoliert und beschrieben, welche die Fähigkeit haben, Pilze zu zerstören (120, 121). Die  $\beta$ -1,3-Glucanase kann die Zellwand von Pilzen schädigen, da diese in den meisten Fällen  $\beta$ -1,3-Glucan enthält. Dies wurde ausgenutzt, um Tabakpflanzen resistent gegen den pflanzenpathogenen Pilz *Rhizocotonia solani* zu machen (122). Ein Gen, welches für eine Chitinase kodiert, wurde aus Bohnen isoliert und mit Hilfe von *A. tumefaciens* in Tabak übertragen. Die Chitinase katalysiert die Hydrolyse von Chitin, einem Hauptbestandteil der Zellwand der meisten filamentösen Pilze. Dieses Enzym wird in vielen Pflanzen natürlicherweise in geringen Konzentrationen hergestellt, um eben pathogene Pilze abzuwehren. Leider wirkt dieser Abwehrmechanismus nicht bei jeder Infektion. Aus diesem Grund wurde für die Transformation von Tabak und Canola dem Chitinasegen noch der CaMV 35S-Promotor vorgeschaltet, so dass dieses Gen hoch exprimiert wurde (123). Die transgenen Pflanzen zeigten eine bis zu 50% geringere Anfälligkeit für *R. solani* als die Kontrollpflanzen (122). Ein Chitinasegen, isoliert aus *Serratia marcescens* und in Tabakblättern exprimiert, reduzierte die Stärke der Symptome der «brownspot»-Krankheit, welche durch den Pilz *Alternaria longipes* ausgelöst wird, beträchtlich (156). Es gibt auch Pflanzengene, die spezifisch gegen einen pathogenen Pilz gerichtet sind, wie zum Beispiel das *hm*-Gen aus Mais, welches die Pflanze resistent gegen *Cochliobolus* macht (124).

Die Produktion von ribosomeninaktivierenden Proteinen (RIP) ist ein weiterer Abwehrmechanismus (125). Ein RIP-Gen aus Gerste, welches unter die Kontrolle



eines wundinduzierbaren Promotors gestellt wurde, wurde in Tabak eingeführt, der dadurch weniger anfällig gegen Pilze wurde. Ähnliche Proteine konnten auch aus Weizen, Tritin (126) und aus Gerste (A-Kette von Ricin; 127) isoliert werden. Diese RIP haben die Eigenschaft, die Ribosomen von Fremdorganismen zu inaktivieren, jedoch nicht die eigenen. Das pflanzeigene Protein Osmotin, welches den Pflanzen zur generellen Abwehr von Fremdorganismen dient, zeigte bei *In vitro*-Experimenten eine potentielle Aktivität gegen *Phytophthora infestans*, welcher bei Kartoffeln die «late blight agent» Krankheit auslöst (121).

Pflanzen können ebenfalls von Bakterien befallen werden, wobei oftmals ein bakterielles Toxin Auslöser einer Erkrankung ist. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* produziert ein sogenanntes Phaseolotoxin, welches in Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) eine Krankheit (halo blight disease) auslöst. Phaseolotoxin inhibiert ein Enzym der Aminosäurebiosynthese. Ein phaseolotoxinresistentes Enzym wurde aus *P. syringae* isoliert und in Tabak eingeführt. Die transformierten Tabakpflanzen waren gegen das Toxin insensitiv und weniger anfällig für das pathogene Bakterium (128, 129). Transgener Tabak, der eine Acetyltransferase exprimierte, wurde vor der «wildfire» Krankheit, welche durch *Pseudomonas syringae* ausgelöst wird, geschützt. Die Acetyltransferase detoxifiziert vermutlich ein Toxin, welches von *Pseudomonas syringae* produziert wird und die Pflanze schädigt.

### Stressresistenz

Pflanzen werden durch verschiedene äussere Einflüsse, mit einem negativen Einfluss auf die Produktivität der Pflanzen, gestresst. Pflanzen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um belastenden äusseren Einflüssen entgegenzuwirken. Sehr komplexe Mechanismen, welche das Zusammenspiel von vielen verschiedenen Genen benötigen, laufen schon während der Entwicklungsstufe der Pflanzen ab. Verschiedene Gene, welche durch Stressfaktoren wie Hitze, Kälte, Salze, Schwermetalle, Phytohormone und Stickstoff induziert werden, konnten identifiziert werden (130, 131). In vielen Gruppen wird die Wirkungsweise von den Metaboliten Prolin und Betamin, welche in die Stressantwort von Pflanzen und Bakterien involviert sind, mit dem Ziel untersucht, den Stress in Pflanzen zu vermindern (132). In den nächsten Jahren werden auch auf diesem Gebiet gentechnologisch veränderte Pflanzen zu erwarten sein.

Viele Stressfaktoren induzieren die Produktion von reaktivem Sauerstoff, welcher zu oxidativen Schäden in den Zellen führt. Die Schutzmechanismen gegen diesen oxidativen Stress sind sehr komplex und beinhalten sowohl enzymatische wie auch nicht enzymatische Komponenten. Schlüsselenzyme der enzymatischen Schutzmechanismen sind Superoxiddismutasen, welche Superoxidradikale in Hydrogenperoxide umwandeln. Bowler et al. (133) erzeugten transgenen Tabak, welcher eine Superoxiddismutase (SOD) unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors überexprimierte. Die Expression der Superoxid-Dismutase in Chloroplasten führte dazu, dass die transgenen Tabakpflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen eine 3- bis 4fache Reduktion der sichtbaren Ozonschädigungen zeigten (134).

Pflanzen mit erhöhter Salz-, Dürre- oder Kälteresistenz wären erwünscht, da z. B. trockene und salzhaltige Böden, ökonomisch gesehen, grosse Probleme darstellen. Auf diesen Gebieten wurden in den letzten Jahren einige Arbeiten publiziert. Transgene Tabakpflanzen, die den Zuckeralkohol Mannitol (CaMV 35S mtlD) exprimierten, wiesen eine erhöhte Salzresistenz auf (135).

Die Kälteresistenz der Pflanzen scheint mit dem Sättigungsgrad der Fettsäuren des Phosphatidylglycerols der Chloroplastenmembranen zu korrelieren. Pflanzen mit hohem Gehalt an *cis*-ungesättigten Fettsäuren sind resistenter gegenüber Kälte. Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, welche in den Chloroplasten produziert wird, scheint wichtig für die Konzentration an ungesättigten Fettsäuren in Pflanzen zu sein. *Murata et al.* (136) transformierten Tabak mit Glycerol-3-phosphat-Acetyltransferase-Genen, welche aus der kälteresistenten Pflanze Kürbis (squash) und *Arabidopsis* isoliert wurden. Die so veränderten Tabakpflanzen zeigten eine deutlich erhöhte Kälteresistenz.

### *Quantitative und qualitative Veränderungen von Pflanzeninhaltsstoffen*

Gentechnologische Methoden werden auch eingesetzt, um Lebensmittel sowohl quantitativ als auch qualitativ zu verändern, mit dem Ziel, massgeschneiderte Grundnahrungsmittel zu besitzen, um einerseits einfacher und billiger produzieren und verarbeiten zu können und um andererseits den Konsumentenwünschen besser zu entsprechen. Eine Liste von Inhaltsstoffen, an deren Veränderungen geforscht wird, ist im folgenden aufgeführt.

- Grössere Mengen an Stärke
- Spezielle Stärken mit veränderter Molekülstruktur (Verzweigungen und Kettenlängen), um Textureigenschaften oder Haltbarkeit zu verbessern
- Höhere Mengen an spezifischen Ölen
- Elimination oder erhöhte Expression von bestimmten Fettsäuren
- Proteine mit ernährungsphysiologisch ausgeglichener Zusammensetzung
- Reduktion von antinutritiven oder Anti-Geschmacksstoffen

Stärke ist das hauptsächliche Reservekohlenhydrat in höheren Pflanzen. Sie kommt vorwiegend in den Samen von Getreiden und Gemüse sowie in den Knollen und Wurzeln von Kartoffeln, Yam und Maniok vor. Dort wird die Stärke in wasserunlöslicher Form zellulär in Form kleiner Körner gespeichert, vorwiegend in den Chloroplasten und Amyloplasten. In der westlichen Welt werden ungefähr  $\frac{2}{3}$  der produzierten Stärke in der lebensmittelverarbeitenden Industrie und in der Brauindustrie verwendet; entweder unmodifiziert als Verdickungsmittel in halbfesten Nahrungsmitteln und Saucen oder nach enzymatischer Hydrolyse als Süsstoff in Getränken und Süswaren. Ein Grossteil der Stärke stammt aus Mais und nur ein relativ kleiner Teil kommt aus Kartoffeln.

Stärke ist keine einheitliche Substanz, sondern besteht zu etwa 20% aus wasserlöslicher Amylose und zu etwa 80% aus wasserunlöslichem Amylopektin. Neben Amylose und Amylopektin enthalten die Stärkekörner noch kleinere Mengen an Lipiden, Proteinen und Phosphor. Diese drei Substanzen beeinflussen die Qualität



der Stärke. Physikalische Parameter wie Schwell- und Bindungsfähigkeit sind von den Interaktionen zwischen Lipiden und Amylose abhängig. Eigenschaften wie Aroma und Geschmack hängen ebenfalls vom Fettsäure- und Proteingehalt ab.

Der Biosyntheseweg der Stärke ist noch nicht genau bekannt, doch mindestens 13 Enzyme sind notwendig, um aus Saccharose Stärke zu synthetisieren (137). Amylose (lineare Ketten) und Amylopektin (verzweigte Ketten) scheinen *in vivo* parallel synthetisiert zu werden, wobei zum Teil unterschiedliche Enzyme in deren Synthese involvieren. Verschiedene Gene dieser Biosynthesewege wurden schon isoliert, charakterisiert und sequenziert (138–141). Obwohl etliche natürliche Mutanten beschrieben worden sind, die einen grösseren Anteil an Stärke produzieren als die entsprechenden Wildtypen, werden diese kaum kommerziell genutzt, da deren Ausbeute im Vergleich zum erzielbaren Gewinn immer noch klein ist. Auch natürlich vorkommende Mutationen, welche das Amylose-Amylopektin-Verhältnis verändern, sind isoliert und beschrieben worden. Eine gut untersuchte Mutante ist die Waxy (wx)-Mutation in Mais, welche dazu führt, dass nur Amylopektin entsteht. Dieser Mutante fehlt das «granula-bound-starch enzyme» (GBSS). Eine Doppelmutante von Mais (*duwx*), führt dazu, dass das Amylopektin noch mehr verzweigt ist als bei der wx-Mutante (142, 143). Eine ähnliche Mutante (*amf*), welche amylosefreie Stärke enthält, wurde auch bei Kartoffeln gefunden (144). Diese Mutante beruht auf einer Punktmutation, welche im GBSS zurückzuführen war. Eine Mutante aus Erbsen, welche die Enzyme beeinträchtigt, die für die Anzahl Verzweigungen verantwortlich sind, führt zu Pflanzen, welche weniger Amylopektinanteil haben und auch weniger Stärke produzieren (145).

Die Struktur der Stärke kann verändert werden durch Manipulation der Expression von GBSS (granula bound starch enzyme), dem Schlüsselenzym der Amylosebildung. Das Gensinngen von GBSS wurde zwischen den CaMV-Promotor und den Nopalinesynthaseterminator kloniert, und Tabak wurde mit dieser DNA-Konstruktion transformiert. 70–100% Inhibition der GBSS-Aktivität wurde erreicht, wobei partielle GBSS-Inhibition zu einer starken Reduktion der Amylose und die vollständige Inhibition der GBSS-Aktivität zu amylosefreier Stärke führte (146). Entsprechende Feldversuche der gleichen Pflanzen zeigten, dass die GBSS-Aktivität über mehrere Jahre hinweg total ausgeschaltet war (137).

Die Gegensinn-RNA-Technik wurde auch für die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) benutzt. Die AGPase wird in Blättern teilweise und in den Knollen von transgenen Kartoffeln nahezu vollständig inhibiert, indem ein Teil des entsprechenden Genes in Gegensinnrichtung in der Pflanze exprimiert wird (147). Die Inhibition der AGPase bewirkte, dass keine Stärke mehr produziert wurde, dafür aber Zucker in wasserlöslicher Form anfiel. Verschiedene AGPasen wurden aus Bakterien wie *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* (148) und verschiedenen Pflanzen wie Kartoffeln (138), Spinat (149–151), *Arabidopsis thaliana* (152, 153), Weizen und Reis (154, 155) und Mais (157) isoliert und charakterisiert. In Kartoffeln wurden mittels Expression eines bakteriellen ADP-Glucosepyrophosphorylase-Genes (ADP GPPase) grössere Stärkemengen (20–40%) erzielt (3).

Mit Hilfe eines bakteriellen Gens (*glgC*), welches für die ADP-Glucose-pyrophosphorylase kodiert und unter der Kontrolle des Patatin-Promotors (knollen-

spezifischer Promotor) steht, konnte der Stärkegehalt um 50% erhöht werden (158). In Kartoffeln konnte eine Erhöhung der Anzahl der  $\alpha$ -1, 6-Verzweigungen (Seitenketten) von Stärke erreicht werden, indem das Glykogensynthase-Gen (*glgA*) aus *Escherichia coli* ins Genom integriert wurde (159). Andere Enzyme, welche Einfluss auf die Kettenlänge oder Anzahl Verzweigungen haben, wurden isoliert und beschrieben (141).

Stärke kann heute in ihrer natürlichen Form oftmals nicht direkt verwendet werden. In Europa werden 80% der Kartoffelstärke nach der Ernte chemisch, physikalisch oder enzymatisch verändert, um sie nutzbar zu machen. Verzweigungen (Branching) werden heute nach der Ernte mit Hilfe von bakteriellen Enzymen eingeführt. Diese bakteriellen Gene könnten ebenso gut ins Pflanzengenom eingebaut werden.

Ein Schritt in diese Richtung ist das Experiment von *Pen et al.* (160). Ein  $\alpha$ -Amylasegen aus dem Bakterium *Bacillus licheniformis* wurde in Tabak transformiert. Die  $\alpha$ -Amylase ist ein Stärke abbauendes Enzym. Damit wäre ein Abbau direkt in der Pflanze nach der Ernte möglich, vorausgesetzt dass die Stärke und die Amylase während der Wachstumsphase der Pflanze in verschiedenen Kompartimenten gespeichert würden.

Falls sich die gentechnologischen Methoden zur Veränderung von Stärke durchsetzen werden, haben Kartoffeln gegenüber dem Mais Vorteile. Transformation von Kartoffeln mit *A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes* ist heute eine gut etablierte Methode. Mais hingegen lässt sich heute noch nicht routinemässig transformieren. Weiter sind die eventuell störenden zusätzlichen Substanzen wie Proteine, Lipide und Phosphor in den Kartoffeln in weit geringerem Mass vorhanden als im Mais. Ein dritter Vorteil ist, dass der Polymerisationsgrad der Amylose in den Kartoffeln höher ist als im Mais, was wiederum zu einer besseren Bindungsfähigkeit führt.

Beispiele für zukünftige Anwendungen sind: Kartoffel-Chips mit erhöhtem Stärkegehalt; solche Kartoffeln nehmen beim Fritieren weniger Öl auf, was dazu führt, dass die Chips weniger Kalorien enthalten; Kartoffeln, welche weniger Amylose enthalten und deshalb leichter verdaubar wären. Kartoffeln mit verbesserter Textur, welche eine Mikrowellenbehandlung besser überstehen und nach dem Kochvorgang «gluschtiger» aussehen.

Die Firmen Monsanto, Calgene, Dupont, Danisco und Unilever sind stark in der Erforschung von Veränderung von Stärke und Proteinen engagiert. Die heute angewendeten Strategien, Stärke gentechnologisch zu modifizieren, sind in Tabelle 7 aufgeführt. An der Veränderung des Gehalts von anderen Reservestoffen wie Lipiden, Proteinen oder weiteren Zuckern in den Speicherorganen wird ebenfalls geforscht.

Die Proteinsequenz von Glutenin wurde mit dem Ziel verändert, Weizenmehl mit verbesserter Backqualität zu erhalten. Um erfolgreich Brot backen zu können, muss der Teig, der aus Weizen hergestellt wird, eine gute Elastizität aufweisen. *Flavell et al.* (161) untersuchten und verglichen zwei verschiedene Untereinheiten von Glutenin und stellten fest, dass diese im zentralen Teil des Moleküles verschieden sind. Die Gluteninuntereinheit 10 hat eine grössere Anzahl von gewissen



Tabelle 7. Potentielle Strategien zur Modifikation von Pflanzenstärke

Ziel	Strategie
Blockierung und/oder Reduzierung der Stärkesynthese	Gegensinn-RNA gegen AGPase <sup>1</sup>
Erhöhung des Stärkegehaltes pro Zelle	Überexpression der AGPase Veränderung der P/PGA <sup>2</sup> -Affinität Verminderung des P-Gehaltes
Veränderung der Amylase-Amylopektin-Zusammensetzung	Gegensinn-RNA gegen GBSS <sup>3</sup>
Erhöhung des Amylosegehaltes	Überexpression von GBSS, SSS <sup>4</sup> oder der Glykogen-Synthase
Veränderung der Kettenlänge und des Verzweigungsgrades der Ketten	(Über)-Expression von bakteriellen BE Gegensinn-RNA gegen BE <sup>5</sup>
Veränderungen der Amylopektinstruktur	Gegensinn-RNA oder (Über)-Expression von SSS

- <sup>1</sup> AGPase: ADP-glucosepyrophosphorylase  
<sup>2</sup> P: anorganisches Phosphat, PGA: 3-phosphoglycerate  
<sup>3</sup> GBSS: granula-bound starch synthase  
<sup>4</sup> SSS: soluble starch-synthase  
<sup>5</sup> BE: starch-branching enzyme  
(nach Literatur 278)

Repetitionen als die Untereinheit 12. Aufgrund dieser Strukturaufklärungen postulieren die Autoren eine erhöhte Elastizität des potentiellen Teiges.

Fruktan, ein Polyfructosemolekül, ist eine Speicherkomponente, die nur in einer limitierten Anzahl von Pflanzen vorkommt. Dieses Molekül wird in Pflanzen nur in Form eines niedrigen Polymerisationsgrades gespeichert. Aus diesem Grund eignet sich pflanzliches Fruktan nicht zur kommerziellen Verwertung. Viele Mikroorganismen, wie *Bacillen*, *Pseudomonaden* und *Streptococcen*, können ebenfalls Fruktan produzieren. Bakteriellcs Fruktan, auch Levan genannt, ist meistens hochpolymer (z. T. über 100 000 Fructoseeinheiten). *Ebskamp* et al. (162) transformierten Tabak mit einer bakteriellen Levanfructase von *Bacillus subtilis* (*sacB*-Gen), um die Akkumulation von hoch polymerisiertem Fruktan in Pflanzen zu erreichen.

In Tomaten wurde die Saccharosephosphat-Synthase exprimiert und dadurch erhöhte Mengen an Saccharose erzielt (163). Monellin und Thaumatin sind «Süssproteine», welche aus den Früchten von *Scoreophyllum cumminisii* Diels und *Thaumatococcus danielli* Benth, beides Beeren von afrikanischen Pflanzen, isoliert werden können. Beide Proteine sind 100 000fach süsser als Saccharose. *Peñarrubia* et al. (164) transformierten Tomaten und Lattich mit dem Monellingen, welches unter dem CaMV-Promotor und dem E8-Promotor exprimiert wurde.

Phytin (Myoinositolhexaphosphat) ist die Hauptform, in der Phosphor in vielen Pflanzensamen gespeichert wird. Phytin bildet mit Calcium und Eisenionen unlös-

liche Salze, die sehr schlecht resorbiert werden können. Phytase kann Phytin hydrolisieren (Myoinositolhexaphosphat wird in anorganisches Phosphat und Myoinositol konvertiert), wodurch das gespeicherte Phosphor viel besser resorbierbar wird. Das Phytasegen wurde aus *Aspergillus niger* isoliert (165) und anschliessend in Tabak kloniert (166).

Eine sehr grosse Anzahl von wilden Pflanzen produziert noch unbekannte Fettsäuren. Da diese wilden Pflanzen oft nicht mit Kulturpflanzen gekreuzt werden können, wäre es möglich, mit molekularbiologischen Methoden entsprechende Gene von den Wildpflanzen auf die Kulturpflanzen zu übertragen. Gentechnologische Methoden werden bereits eingesetzt, um den Fettsäuregehalt von Pflanzen zu verändern oder um bestimmte Fettsäuren zu akkumulieren oder zu eliminieren. Veränderungen der Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen bewirken eine qualitative Veränderung von Ölen und Fetten in Pflanzen. Grayburn et al. (167) transformierten Tabak mit einem Fettsäure-Desaturase-Gen aus Ratten. Kridel et al. (168) transformierten Canola mit einem Gegensinn-Stearyl-ACP-Desaturase-Gen-Konstrukt, was zu einem signifikanten Anstieg von Stearinsäure in der Canolapflanze führte. Ähnliche Experimente wurden mit Raps durchgeführt, wobei einerseits laurinsäurereiches (169) und andererseits stearinsäurereiches (170) Öl produziert wurde.

Die Veränderung der nutritiven Eigenschaften von Getreiden wurde zum Beispiel durch die Expression von Genen, welche für methioninreiche Proteine kodieren, angestrebt (171).

Mit den oben erwähnten Ansätzen versucht man, Pflanzen gentechnologisch masszuschneiden, damit sie einerseits besser verwendet und bearbeitet werden können und andererseits keine enzymatischen, chemischen oder physikalischen Nachbehandlungen mehr nötig sind.

### *Reifeverzögerung und Quetschresistenz*

In Pflanzen beginnt mit dem Prozess der Reifung die Seneszenz als letzte Phase der Entwicklung und Differenzierung. Während der Reifung verändern sich in Pflanzen, wie z. B. in Tomaten und Bananen, die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe und die Textur. Während der Reifung einer Frucht nimmt auch deren Gehalt an Ethylen markant zu. Physiologische Evidenz deutet darauf hin, dass Ethylen das natürliche Reifungshormon ist. Ethylen kontrolliert in höheren Pflanzen viele physiologische und entwicklungsspezifische Prozesse, wie Reifung, Altern und Wundantwort. Obwohl die Akkumulation von «Ethylen-synthase-mRNA» in reifenden Früchten und alternden Blättern mit der Ethylenproduktion korreliert ist, ist der regulatorische Mechanismus, welcher die Ethylensynthese steuert, noch nicht verstanden (172). Bis heute sind verschiedene Gene identifiziert und isoliert worden, die bei der Biosynthese von Ethylen eine Rolle spielen. Der limitierende Schritt der Ethylenproduktion ist die Umwandlung von S-adenosylmethionin zu 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid (ACC), welches der unmittelbare Vorläufer des pflanzlichen Ethylens ist. Diese Umwandlung wird durch das Enzym



ACC-Synthase katalysiert, welche in Tomaten von einer divergenten Multigenfamilie kodiert wird. Die cDNA's von 2 Genen, *LE-ACC2* und *LE-ACC4* wurden isoliert und charakterisiert (173). Die Expression von Gegensinn-RNA vom *LE-ACC2*-Gen in Tomaten führte zu einer Reduktion von Ethylen und zu einer verspäteten Reifung (174). Durch die Begasung von Luft mit exogenem Ethylen (0,1 l Ethylen/Liter Luft (100 ppb)) kann der Reifungsprozess solcher transgener Tomaten wieder in Gang gesetzt werden.

Andere Forschungsgruppen verzögerten die Reifung von Pflanzen ebenfalls mit Hilfe von Antisense-Genen von Enzymen, welche in den Reifungsprozess involviert sind (172, 175, 176).

Eine andere Strategie, die Reifung von Früchten zu verzögern, ist der Abbau einzelner Komponenten des Biosyntheseweges von Ethylen mit Hilfe von bakteriellen Enzymen. Ein Beispiel dafür ist die ACC-Deaminase, welche aus *Pseudomonas* isoliert wurde, und die den unmittelbaren Vorläufer von Ethylen degradiert (177).

Die Polygalacturonase (PG) spielt eine wichtige Rolle beim weich werden von Früchten und Gemüse, indem sie zum Teil die Pektinfraktion der Zellwand solubilisiert. Verschiedene Gruppen transformierten Pflanzen wie Tomaten (145, 175) mit Gegensinn-PG-Genen, um das weich werden zu verhindern oder wenigstens hinauszuzögern. Grosse Beachtung wurde in der letzten Zeit der gentechnologisch veränderten Tomate von Calgene zuteil. Diese «Flavr Savr<sup>TM</sup>»-Tomate von Calgene Inc. ist seit Mai 1994 in Amerika unter dem Namen MacGregor's auf den Markt gekommen. Diese Tomate enthält neben dem Gegensinn-Polygalacturonasegen auch noch ein Kanamycinresistenzgen (*nptII*) (Tabelle 8).

### Potentielle Nachweismöglichkeiten

Das Ziel der vorliegenden Literaturrecherche ist es, eine Grundlage für den Einstieg in die Thematik von gentechnologisch veränderten pflanzlichen Lebensmitteln zu geben. Diese Arbeit erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, da sowohl die praktischen wie auch die theoretischen Arbeiten auf diesem Gebiet ein enormes Ausmass angenommen haben. Hinzu kommt, dass neuere Entwicklungen auf diesem Gebiet zwecks Know-how-Vorsprung wohl hinter verschlossenen Labortüren der Agrochemie ablaufen. Die vorliegende Arbeit kann im besten Falle Anregungen geben, wie allenfalls eine Deklarationspflicht von gentechnologisch veränderten Pflanzen von der lebensmittelverarbeitenden Industrie oder von Lebensmittelgrosshändlern umgesetzt werden kann, d. h., wie gentechnologisch veränderte Lebensmittel nachgewiesen werden könnten.

In den nächsten Jahren werden transgene Pflanzen auf dem Markt erscheinen oder sind wie die «Flavr Savr<sup>TM</sup>»-Tomate von Calgene, welche in den USA unter dem Namen MacGregor's verkauft wird, schon auf dem Markt. Die Pflanzen, die in den nächsten Jahren auf dem Markt zu erwarten sind, werden vorwiegend Veränderungen von monogenetischen Eigenschaften aufweisen. Nach heutigem

Tabelle 8. Lebensmittel (Pflanzen) die schon gentechnisch verändert worden sind

Lebensmittel	Veränderung	Technologie	Firma
Apfel (Golden Delicious)	Insektizidresistenz	Insertion eines bakteriellen Resistenzgenes	Pioneer HiBred
Broccoli*	Reifeverzögerung	Insertion eines Genes, das Ethylenproduktion stoppt	Agritope
Colza°	Herbizidresistenz		
Gurke	Virusresistenz	CMV Hüllprotein-insertion	Upjohn
Himbeeren*	Reifeverzögerung	Rekombinanter Ethylenstop	Agritope
Kaffee*	Geschmack, Ertrag, Koffeingehalt, Krankheitsresistenz	Geninsertion	ESCAgenetics
Kartoffel*°	Virusresistenz	CPM Insertion	Monsanto, ISAAA& CINVESTA, Asgrow Seeds
	Chips mit weniger Fett	Insertion eines Stärke-Genes von <i>E. coli</i>	Monsanto
	Insektizidresistenz	Bt Gen Insertion	Monsanto, Ciba Geigy, Plant Genetic
	Geschmacksveränderung	Insertion eines Gegensinn-Genes Blockierung von ADP-glucose pyrophosphorylase, Saccharose wird zu Stärke konvertiert	
Kürbis*°	Virusresistenz	CPM Insertion	Asgrow Seed Co.
Lattich*°	Grösse	Ethyl-Methan-Sulfonat-Mutagenese	USDA-Salinas
	Geschmack Virusresistenz	Geninsertion, Monellin	



Lebensmittel	Veränderung	Technologie	Firma
Melone*°	Reifeverzögerung	Insertion eines antisense Genes (pMEL1) Ethylensynthese CPM Insertion	Monsanto, Asgrow Seeds
Mais*°	Herbizidresistenz	Insertion eines Bt Genes	Biotechnica Int., DeKalb Genetics, Monsanto, Pioneer
	Insektizidresistenz		
Raps*	Herbizidresistenz	Insertion eines Genes	Calgene  Calgene Calgene, Pioneer
	Virusresistenz		
	Aminosäuren-zusammensetzung		
	Fettsäure-veränderungen		
Reis°	Spezielles Öl	Insertion eines Genes	Calgene, Pioneer
	Ölzusammensetzung		
Soja*°	Virusresistenz	Gen Insertion (ESPS)	Calgene, Monsanto, Agricetus
Tabak°	Herbizidresistenz (Round-up)	Paranuss Gen Insertion	Pioneer, Ferruzzi
	Inhaltsstoffe	Aminosäuren-veränderungen	
	Insektizid-, Virus- und Herbizid-resistenz, Reifeverzögerung		
Tomate*	Insektizidresistenz	Bt Gen Insertion	Monsanto, Ciba-Geigy
	Virusresistenz	CPM Insertion	Monsanto, Asgrow Seed
	Reifungsverzögerung	Antisens Gen Insertion ACC Synthase blockiert Ethylenkaskade	Plant Gene Expression Center

Lebensmittel	Veränderung	Technologie	Firma
Weizen*		Antisense RNA von Polygalacturonase	Calgene
	Bessere Verarbeitungsqualität	Expression neuer Gene	Calgene, Campell Soup, Monsanto, ESCAgenetics
	Pilzresistenz	Chitinase-Gen	DNA Plant Tech.
	Erfrierungsresistenz	Geninsertion aus Bodenbakterium	DNA Plant Tech.
	Reifungs, Farb- und Geschmackskontrolle	Rearrangement und Duplikation von Genen	IC
	Geschmack	Geninsertion, Monellin	
	Stärke	Antisense Gen um Stärke Synthetase zu binden	Ciba-Geigy
Zichorie*	Herbizidresistenz Glutofinate	Geninsertion, Phosphinothricin, Acetyltransferase	Monsanto
	Fruktankonz. Erhöhung	Insertion antisense Gen	
Zuckerrübe°	Herbizidresistenz		
	Virusresistenz		

\* Beck und Ulrich, 1993 (280)

° Rajnchapel-Messai, 1993 (4)

Weitere gentechnologisch veränderte Lebensmittel: Aubergine, Blumenkohl, Erbse, Erdbeere, Kiwi, Kohl, Luzerne, Meerrettich, Mohrrübe, Papaya, Pfeffer, Pflaume, Preiselbeerart, Roggen, Salat, Sellerie, Sonnenblume, Spargel, Süsskartoffel, Walnuss, Weintraube, Zuckermelone, Zuckerrohr und Zuckerrübe (9, 3)

Wissensstand betreffen diese monogenetischen Eigenschaften vorwiegend die Gebiete der Herbizidresistenzen, Insektizidresistenzen, vereinzelte Virusresistenzen gegen spezifische Viren oder aber auch die Hinauszögerung der Reifung von Früchten und Gemüsen. Die längerfristigen Ziele sind, Merkmale zu verändern, die multifaktoriell bedingt sind. Solche Eigenschaften können zum Beispiel Veränderungen von Proteinzusammensetzungen in Getreiden, Kartoffeln und Mais sein, Anpassungen an veränderte Umweltbedingungen wie trockene oder salzhaltige Böden, Anpassungen an Kälte und Dürre, Veränderungen von Textureigenschaften von Pflanzen usw.



Beim Nachweis von gentechnologischen Veränderungen in Kulturpflanzen muss das Ziel und der Zweck in Betracht gezogen werden: sollen alle Lebensmittel einem generellen Screening unterworfen werden, sollen alle Lebensmittel nach einer bestimmten gentechnologischen Veränderung hin untersucht werden oder sollen einzelne Lebensmittel ganz gezielt auf spezifische Veränderung hin untersucht werden? Zudem spielt der Zustand des Lebensmittels, d. h. ob das Lebensmittel in rohem Zustand (Reiskörner, ganze Tomaten) oder in Form eines Fertiggerichts (nur eine Zutat soll untersucht werden) vorliegt, eine Rolle. Damit eine bestimmte Methode etabliert werden kann, muss man sich bei deren Ausarbeitung immer im klaren sein, ob diese Methode als generelles Screening von Lebensmitteln oder aber sehr spezifisch für den Nachweis einer bestimmten Veränderung eingesetzt werden soll.

Die einfachste Analysestrategie dürfte sein, bei einem Lebensmittel auf der DNA-Ebene nach einer gentechnologischen Veränderung zu suchen. Hier müsste es möglich sein, anhand von Sequenzen ein ganz spezifisches PCR-System zu etablieren. Sehr gut für einen spezifischen Nachweis eignen sich Sequenzen, die für folgende Merkmalsveränderungen kodieren:

- Herbizidresistenzgene

- Insektizidresistenzgene

- Gene von Virussequenzen

- Antimikrobielle Resistenzgene

- Gene, die in den Biosyntheseweg der Reifung eingreifen

*PCR-Systeme* auf den oben genannten Sequenzen aufzubauen, ist mit Sicherheit durchführbar. Eine Hauptvoraussetzung ist natürlich, dass die Sequenzen von der Herstellerfirma der prüfenden Stelle mitgeteilt werden oder dass diese Sequenzen allgemein zugänglich sind (Patentamt, DNA-Datenbanken).

Im Falle der Insektizidresistenz könnte ein PCR-System auf *B.t.*  $\delta$ -Endotoxinsequenzen aufgebaut werden.

Falls sich Abwehrstrategien allgemeiner Art gegen Viren, Bakterien und Pilze durchsetzen würden, könnten auch generelle Detektionssysteme entwickelt werden. PCR-Systeme, um allgemein Viren, Bakterien und Pilz-«Zerstörungsgene» nachzuweisen, wären einfacher, da einige wenige Gene und nicht Sequenzen von vielen einzelnen pathogenen Mikroorganismen gesucht werden müssten. Solche allgemeinen Resistenzmechanismen sind jedoch noch nicht bis zur Marktreife entwickelt worden. Meyer (178) gelang kürzlich die Entwicklung von zwei PCR-Systemen, mit denen sich die von der Firma Calgene entwickelte Flavr Savr<sup>TM</sup>-Tomate eindeutig identifizieren lässt.

*RAPD Typing* (random amplified polymorphic DNA) von Pflanzen, zu denen entsprechende RAPD-Profile von nicht transgenen Kontrollpflanzen vorhanden sind, könnten ebenfalls eingesetzt werden, um transgene von nicht transgenen Pflanzen zu unterscheiden. Bao et al. (179) haben RAPD-Analysen für Reis schon angewandt, um verschiedene neue Kreuzungen voneinander unterscheiden zu können.

*RFLP-Analysen* (restriction fragment length polymorphism) von transgenen Pflanzen und den entsprechenden nicht transgenen Kontrollpflanzen, wären eine weitere Methode, um gentechnische Veränderungen in Pflanzen nachzuweisen.

Von den immunbiologischen Methoden ist vor allem der *ELISA-Test* gut geeignet, um gentechnologisch veränderte Pflanzen nachzuweisen. Es existieren heute schon ELISA-Tests, welche bakterielle  $\delta$ -Endotoxine nachzuweisen vermögen, wie z. B. das CryA(b) Genprodukt (105). Der Nachweis von Toxinen ist aber problematisch, da heute Pflanzen grossflächig mit *B. thuringiensis*-Lösungen bespritzt werden. Damit wird es sehr schwierig sein, aufgesprühte Toxine von transgen produzierten zu unterscheiden. Die Pflanzen müssten deshalb entsprechend gereinigt und von solchen «externen Toxinen» befreit werden. Auf DNA-Ebene wäre der Nachweis mittels PCR auch in solchen Fällen durchaus denkbar.

Virushüllproteine und Untereinheiten von Replikasen, die eingesetzt werden, um Pflanzen vor Virenbefall zu schützen, könnten ebenfalls mit einem entsprechend entwickelten ELISA-Test detektierbar sein.

Eine *generelle Nachweismethode* von gentechnologischen Veränderungen in Pflanzen ist unserer Meinung nach praktisch unmöglich. Dazu müsste eine Strategie entwickelt werden, die erlaubt, gentechnologisch veränderte Lebensmittel mit einer Methode unspezifisch nachzuweisen, d. h. feststellen zu können, ob an einem Lebensmittel irgend etwas auf der DNA-Ebene verändert worden ist oder nicht. Doch gibt es dafür Ansatzpunkte, wie ein generelles Screening von Pflanzen mittels *weniger* Methoden durchgeführt werden könnte:

Da konstitutive Promotoren und Terminatoren, wie zum Beispiel der CaMV 35S Promotor und der NOS-Terminator, bei einer relativ grossen Anzahl von transgenen Pflanzen eingesetzt worden sind (vergleiche Tabellen 1, 2, 3), könnten auf diesen Promotoren und Terminatoren PCR-Systeme aufgebaut werden. Für den CaMV-Promotor existiert schon ein PCR-System (180). Schwieriger ist die Situation, wenn pflanzliche Promotoren wie der Adh 1 Promotor von Mais, der *rbcS* Promotor von Reis usw. (Tabelle 4) eingesetzt worden sind. Es wird wesentlich schwieriger sein, pflanzeneigene von transgenen Promotoren, welche eventuell noch von der gleichen Pflanze stammen, zu unterscheiden.

PCR-Systeme zum Nachweis von Reportergenen (Tabelle 2), falls diese nicht wieder aus dem Genom entfernt worden sind, könnten ebenfalls zum Ziel führen. Für die heute eingesetzten ungefähr 10 bis 20 verschiedenen Reportergene müssten entsprechende Primer für PCR-Systeme definiert werden.

Der Nachweis von repetierten DNA-Sequenzen von Transposons, 2  $\mu$ m von *S. cerevisiae* *loxP*, die benützt werden, um Markergene wieder aus dem Pflanzen-genom zu entfernen, wäre mittels PCR oder RFLP ebenfalls möglich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es mit zunehmender Anzahl an transgenen Pflanzen, mit unter Umständen mehreren veränderten Eigenschaften, immer schwieriger sein wird, solche gentechnologisch veränderten Merkmale nachzuweisen.



## *Dank*

Diese Arbeit (Projekt Nummer 316.94.0448) wurde vom Bundesamt für Gesundheitswesen finanziell unterstützt. Wir danken Dr. *Philipp Hübner* für das kritische Durchlesen dieser Arbeit.

## *Zusammenfassung*

Die Übersichtsarbeit fasst den aktuellen Stand der angewandten Forschung auf dem Gebiete der gentechnologisch veränderten Pflanzen zusammen und gibt eine Übersicht über den möglichen Einsatz der Gentechnologie bei pflanzlichen Lebensmitteln. Die Machbarkeit solcher gentechnischer Veränderungen wird diskutiert und mögliche Nachweismethoden für Lebensmittel werden vorgeschlagen.

## *Résumé*

Ce travail présente un aperçu de l'état actuel de la recherche appliquée au sujet des plantes modifiées par des méthodes du génie génétique. Une vue d'ensemble est également donnée concernant l'utilisation possible du génie génétique pour les denrées alimentaires d'origine végétale. La faisabilité de ces modifications au niveau du génie génétique est ensuite discutée et des méthodes de mise en évidence dans le domaine des denrées alimentaires sont proposées.

## *Summary*

This review summarizes the results of the applied research in the field of genetically modified plants and gives an overview on the techniques to modify plants genetically. The possible detection methods of genetic modifications in foods are discussed.

## *Literatur*

1. *Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A. and Hoffmann, N.*: Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* **223**, 496–498 (1984).
2. *DeBlock, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Schell, J. and Zambryski, P.*: Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J.* **3**, 1681–1689 (1984).
3. *Fraley, R.*: Sustaining the food supply. *BioTechnology* **10**, 40–43 (1992).
4. *Rajnachel-Messai, J.*: Plantes transformées: Les lois du marché. *Agriculture. Mai*, 28–33 (1993).
5. *Food and Drug Administration (FDA)*: Secondary direct food additives permitted in food for human consumption; food additives permitted in feed and drinking water of animals; aminoglycoside 3'-phosphotransferase II. *Fed. Reg.* **59**, 26700–26711 (1994).
6. *Gilboa, E., Eglitis, M. A., Kantoff, P. W. and Anderson, W. F.*: Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. *BioTechniques* **4**, 504–512 (1986).
7. *Potrykus, I.*: Gene transfer to cereals: An Assessment. *BioTechnology* **8**, 535–542 (1990).
8. *Köhler, F., Cardon, G., Pöhlmann, M., Gill, R. and Schieder, O.*: Enhancement of transformation rates in higher plants by low-dose irradiation. Are DNA repair systems

- involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* **12**, 189–199 (1989).
9. Gasser, C. S. und Fraley, R. T.: Transgene Nutzpflanzen. *Spektrum der Wissenschaft* **8**, 44–50 (1992).
  10. Abel, P.P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R.T. and Beack, R.N.: Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738–743 (1986).
  11. Gardner, R., Chonoles, K. and Owens, R.: Potato spindle tuber viroid infections mediated by the Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Mol. Biol.* **6**, 221–228 (1986).
  12. Brisson, N., Paszkowski, J., Penswick, J. R., Gronenborn, B., Potrykus, I. and Hohn, T.: Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. *Nature* **310**, 511–514 (1984).
  13. Ahlquist, P., French, R. and Bujarski, J. J.: Molecular studies of brome mosaic virus using infectious transcripts from cloned cDNA. *Adv. Virus Res.* **32**, 214–242 (1987).
  14. Ahlquist, P. and Pacha, R. F.: Gene amplification and expression by RNA viruses and potential for further application to plant gene transfer. *Physiol. Plant.* **78**, 163–167 (1990).
  15. Fütterer, J., Bonneville, J. M. and Hohn, T.: Cauliflower mosaic virus as a gene expression vector for plants. *Physiol. Plant.* **78** (1), 154–157 (1990).
  16. Sandford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D. and Allen, N.: Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. Technol.* **5**, 27–37 (1987).
  17. Daniell, H., Velvekanada, J., Nielsen, B. L., Ye, G. N., Tewari, K. K. and Sandford, J. C.: Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *PNAS* **87**, 88–92 (1990).
  18. Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P.: Stable transformation of plastids in higher plants. *PNAS* **87**, 8526–8530 (1990).
  19. Ye, G.-N., Daniell, H. and Sandford, J.: Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **15**, 809–819 (1990).
  20. Daniell, H., Krishnan, M. and McFadden, B. F.: Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase in different cellular compartments following biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli. *Plant. Cell. Reports* **9**, 615–619 (1991).
  21. Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L. and Sandford, J. C.: Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant. Cell. Reports* **9**, 189–194 (1990).
  22. Verhoeven, H. A. and Blaas, J.: Direct cell to cell transfer of organelles by microinjection. *Plant. Cell. Reports* **10**, 613–616 (1992).
  23. Rhodes, C. A., Lowe, K. and Ruby, K.: Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *BioTechnology* **6**, 56 (1988).
  24. Fromm, M. E., Taylor, L. P. and Walbot, V.: Stable transformation of maize after electroporation. *Nature* **319**, 791–793 (1986).
  25. Pierce, D. A., Mettler, I. J., Lachmansingh, A. R., Pomeroy, L. M., Weck, E. A. and Mascarenhas, D.: Effect of 35S leader modifications on promoter activity. In: *Plant gene systems and their biology*. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, vol. 62, pp. 301–310. Liss, New York, 1987.
  26. Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. and Fujimoto, H.: Fertile rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* **338**, 274–276 (1989).
  27. Rhodes, C. A., Pierce, D. A., Mettler, I. J., Mascarenhas, D. and Detmer, J.: Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* **240**, 204–206 (1988).
  28. Vasil, I. K.: Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *BioTechnology* **6**, 397–401 (1988).



29. Prioli, L. M. and Söndahl, M. R.: Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize. *BioTechnology* 7, 589–594 (1989).
30. Shillito, R. D., Carswell, G. K., Johnson, C. M., DiMiaio, S. and Harms, C. T.: Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *BioTechnology* 7, 581–587 (1989).
31. Caboche, M.: Liposome-mediated transfer of nucleic acids in plant protoplasts. *Physiol. Plant* 78 (1) (1990).
32. Gad, A. E., Rosenberg, N. and Altmann, A.: Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiol. Plant* 78 (1) (1990).
33. Ahokas, H.: Transfection by DNA-associated liposomes evidenced at pea pollination. *Hereditas* 106, 129–138 (1987).
34. Fraley, R. T., Rogers, S. G. and Horsch, R. B.: Genetic transformation in higher plants. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 4, 1–45 (1986).
35. Bevan, M., Flavell, R. B. and Chilton, M. D.: A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 394, 184–187 (1983).
36. Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P., Flick, J., Adams, S., Bittner, M., Brand, L., Fink, C., Fray, J., Galluppi, G., Goldberg, S. and Woo, S.: Expression of bacterial genes in plant cells. *PNAS* 80, 4803–4806 (1983).
37. Herrera-Estrella, L., DeBlock, M., Van Montagu, M. and Schell, J.: Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2, 987–992 (1983).
38. Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J.: Expression of chimeric genes using transferred into cells using a Ti-Plasmid derived vector. *Nature* 303, 209–213 (1983).
39. Avihai, P., Galili, S., Shaul, O., Ben-Tzvi, I. and Galili, G.: Bacterial dihydrodipicolinate synthase and desensitized aspartate kinase: Two novel selectable markers for plant transformation. *BioTechnology* 11, 715–718 (1993).
40. Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H. M.: Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 561–573 (1982).
41. Depicker, A., Herman, L., Jacobs, A., Schell, J. and van Montagu, M.: Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium* plant cell interaction. *Mol. Gen. Genet.* 201, 477–484 (1985).
42. Waldron, C., Murphy, E. B., Roberts, J. L., Gustafson, G. D., Armour, S. L. and Malcolm, S. K.: Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation studies. *Plant Mol. Biol.* 5, 103–108 (1985).
43. Jones, J. D. G., Svab, Z., Harper, E. C., Hurwitz, C. D. and Maliga, P.: A dominant nuclear streptomycin resistance marker for plant cell transformation. *Mol. Gen. Genet.* 210, 86–91 (1987).
44. Hille, J., Verheggen, F., Roelvink, P., Franssen, H., Kammen, A. V. and Zabel, P.: Bleomycin resistance: a new dominant selectable marker for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 7, 171–176 (1986).
45. Guérineau, F., Brooks, L., Meadows, J., Robinson, C. and Mullineaux, P.: Sulfonamide resistance gene for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 15, 127–136 (1990).
46. Stalker, M. D., McBride, K. E. and Malys, L. D.: Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242, 419–423 (1988).
47. Streber, W. R. and Willmitzer, L.: Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme resistant to 2,4-D. *BioTechnology* 7, 811–816 (1989).
48. Shah, D. M., Horsch, R. B., Klee, H. J., Kishore, G. M., Winter, J. A., Tumer, N. E., Hironaka, C. M., Sanders, P. R., Gasser, C. S., Aykent, S., Siegel, N. R., Rogeers S. G. and

- Fraley, R. T.: Engineering herbicidetolerance in transgenic plants. *Science* **233**, 478–481 (1986).
49. DeBlock, M., Bottermann, J., Vandewiele, M., Docky, J., Thoen, C., Gossele, V., Movva, N. R., Thompson, C., Van Montagu, M. and Leemans, J.: Engineering herbicide tolerance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* **6**, 2513–2518 (1987).
  50. Yoder, J. I. and Goldsbrough, A. P.: Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *BioTechnology* **12**, 263–267 (1994).
  51. Jorgensen, R.: Silencing of plant genes by homologous transgenes. *AgBiotech News and Infor.* **4**, 265–273 (1991).
  52. DeBlock, M. and Debrouwer, D.: Two T-DNAs co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium* infection are mainly integrated at the same locus. *Theor. Appl. Genet.* **82**, 257–263 (1991).
  53. McKnight, T. D., Lillis, M. T. and Simpson, R. B.: Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains. *Plant Mol. Biol.* **8**, 439–445 (1987).
  54. Dale, E. C. and Ow, D. W.: Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Genet.* **91**, 79–85 (1990).
  55. Russell, S. H., Hoopes, J. L. and Odell, J. T.: Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 49–59 (1992).
  56. Cregg, J. M. and Malden, K. R.: Use of site specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 320–323 (1989).
  57. Lyznik, L. A., Mitchell, J. C., Hirayama, L. and Hodges, T. K.: Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res.* **214**, 969–975 (1993).
  58. Baker, B., Schell, J., Lörz, H. and Fedoroff, N.: Transposition of the maize controlling element «activator» in tobacco. *PNAS* **83**, 4844–4848 (1986).
  59. Jones, J. D. G., Carland, F., Lim, E., Ralston, E. and Dooner, H. K.: Preferential transposition of the maize element *activator* to linked chromosomal locations in tobacco. *Plant Cell.* **2**, 701–707 (1990).
  60. Yoder, J. L., Palys, Alpert, J., K. and Lassner, M.: *Ac* transposition in transgenic tomato plants. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 291–296 (1988).
  61. Fedoroff, N. V.: Maize transposable elements. In: Berg, D. E. and Howe, M. M. (eds.), *Mobile DNA*, pp. 375–412. American Society for Microbiology, Washington D. C. 1989.
  62. Balcells, L., Swinburne, J. and Coupland, G.: Transposons as tools for the isolation of plant genes. *Tibtech.* **9**, 31–37 (1991).
  63. Maeser, S. and Kahmann, R.: The *Gin* recombinase of phage Mu can catalyse site-specific recombination in plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 170–176 (1991).
  64. McElroy, D. and Brettel, R. I. S.: Foreign gene expression in transgenic cereals. *Tibtech.* **12**, 62–68 (1994).
  65. Dean, C., Jones, J., Favreau, M., Dunsmuir, P. and Bedbrook, J.: Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nucleic Acid Research* **16**, 9267–9283 (1988).
  66. Creissen, G., Smith, C., Francis, R., Reynolds, H. and Mullineaux, P.: *Agrobacterium* – and microprojectile – mediated viral DNA delivery into barley microscope-derived cultures. *Plant Cell. Reports* **8**, 680–683 (1990).
  67. Gordon-Kamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., O'Brien, J. V., Chambers, S. A., Adams, W. R., Willetts, N. G., Rice, T. B., Mackey, C. J., Krueger, R. W., Kausch, A. P. and Lemaux, P. G.: Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell.* **2**, 603–618 (1990).



68. Somers, D. A., Rines, H. W., Gu, W., Kaeppler, H. F. and Bushnell, W. R.: Fertile, transgenic oat plants. *BioTechnology* **10**, 1589–1594 (1992).
69. Christou, P., Ford, T. L. and Kofron, M.: Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *BioTechnology* **9**, 957–962 (1991).
70. Tada, Y., Sakamoto, M., Matsuoka, M. and Fujimura, T.: Expression of a monocot LHCP promotor in transgenic rice. *EMBO J.* **10**, 1803–1808 (1991).
71. Fromm, M. E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J. and Klein, T. M.: Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *BioTechnology* **8**, 833–839 (1990).
72. Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E. and Vasil, I. K.: Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus. *BioTechnology* **10**, 667–674 (1992).
73. Chamberlain, D. A., Brettell, R. I. S., Last, D. I., Witrzens, B., McElroy, D., Dolferus, R. and Dennis, E. S.: ... *Aust. J. Plant Physiol.* **21**, 95–112 (1994).
74. Bower, R. and Birch, R. G.: Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* **2**, 409–416 (1992).
75. Weeks, T., Anderson, O. D. and Blechel, A. E.: Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* **102**, 1077–1084 (1993).
76. Wan, Y. and Lemaux, P. G.: Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* **104**, 37–48 (1994).
77. Toki, S., Takamatsu, S., Nojiri, C., Ooba, S., Anzai, H., Iwata, M., Christensen, A. H., Quail, P. H. and Uchimiya, H.: Expression of a maize ubiquitin gene promotor-bar chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol.* **100**, 1503–1507 (1992).
78. Mizuno, T., Chou, M. and Inouye, M.: A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *PNAS* **81**, 1966–1970 (1984).
79. Simons, R. W. and Kleckner, N.: Translational control of IS10 transposition. *Cell.* **34**, 683–691 (1983).
80. Chaleff, R. S. and Ray, T. B.: Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science* **223**, 1148–1151 (1984).
81. Bärlocher, C., Diethelm, H., Koechlin, F. und Ammann, D.: Manipulierte Organismen in der Natur. Gen- und Biotechnologie. Eine kritische Bestandesaufnahme freisetzungsortientierter Forschungsprojekte in der Schweiz. Herausgeber: Ökosience, Institut für praxisorientierte Ökologie AG, Zürich 1991.
82. Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W. R., Thompson, G., Rose, R. E. and Stalker, D. M.: Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* **317**, 741–744 (1985).
83. Cheung, A. L., Bogorad, L., Montagu, M. V. and Schell, J.: Relocating a gene for herbicide tolerance: A chloroplast gene is converted into a nuclear gene. *PNAS* **85**, 391–395 (1988).
84. Donn, G., Tischer, E., Smith, J. A. and Goodman, H. M.: Herbicide-resistant alfalfa cells; an example of gene amplification in plants. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 621 (1984).
85. O'Neal, J. K., Pokalsky, A. R., Kiehne, K. L. and Shewmaker, C. K.: Isolation of tobacco SSU genes: Characterization of a transcriptionally active pseudogene. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8661 (1987).

86. Stalker, D., Hiatt, W. and Comai, L.: A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J. of biol. Chem.* **260**, 4724–4728 (1985).
87. Lee, K.J., Townsend, J., Teppermann, J., Black, M., Chui, C.F., Mazur, B., Dunsmuir, P. and Bedbrook, J.: The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* **7**, 1241–1248 (1988).
88. Knowles, B. H. and Dow, J. A. T.: The Crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* **15**, 469–476 (1993).
89. Martin, P. A. W. and Travers, R. S.: Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2437–2442 (1989).
90. Höfte, H. and Whiteley, H. R.: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* **53**, 242–255 (1989).
91. English, L. and Slatin, S. L.: Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **22**, 1–7 (1992).
92. Gill, S. S., Cowles, E. A. and Pietrantonio, P. V.: The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* **37**, 615–636 (1992).
93. Lambert, B. and Perferon, M.: Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about successful biopesticide. *BioScience* **42**, 112–121 (1992).
94. Schnepf, H. E., Wong, H. C. and Whiteley, H. R.: Expression of cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 4110–4118 (1987).
95. Obukowicz, M. G., Perlak, F. J., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E. J. and Waltrud, L. S.: Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of *Pseudomonas* using Tn5. *Genet.* **45**, 327–331 (1986).
96. Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., De Beukeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. and Leemans, J.: Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* **328**, 33–37 (1987).
97. Barton, K. A., Whiteley, H. R. and Yang, N.-S.: *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* **85**, 1103–1109 (1987).
98. Sutton, D. W., Havstad, P. K. and Kemp, J. D.: Synthetic cryIIIA gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. *Transgenic Res.* **1**, 228–236 (1992).
99. Fischhoff, D. A., Bowdish, K. S., Perlak, F. J., Marrone, P. G. et al.: Insect tolerant transgenic tomato plants. *BioTechnology* **5**, 807–815 (1987).
100. Delannay, X., LaVallee, B. J., Proschk, R. K., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., Marrone, P. G., Dodson, R. B., Augustine, J. J., Layton, J. G. and Fischhoff, D. A.: Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insect control protein. *BioTechnology* **7**, 1265–1269 (1989).
101. Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T. and Fischhoff, D. A.: Insect resistant cotton plants. *BioTechnology* **8**, 939–943 (1990).
102. Carozzi, N. B., Warren, G. W., Desai, N., Jayne, S. M., Lotstein, R., Rice, D. A., Evola, S. and Koziel, M. G.: Expression of a chimeric CaMV 35S *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **20**, 539–548 (1992).
103. Höfte, H., de Greve, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. and Vaeck, M.: Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. *Eur. J. Biochem.* **161**, 273–280 (1986).



104. Höfte, H., Seurinck, J., Van Houtven, A. and Vaeck, M.: Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* against Coleoptera. *Nucleic Acid Res.* **15**, 7183 (1987).
105. Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wright, M. and Evola, S.V.: Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *BioTechnology* **11**, 194–200 (1993).
106. Fujimoto, H., Itho, K., Yamamoto, M., Kyojuka, J. and Shimamoto, K.: Insect resistant rice generated by introduction of a modified  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *BioTechnology* **11**, 1151–1155 (1993).
107. Hayakawa, T., Zhu, Y., Itho, K., Kimura, Y., Izawa, T., Shimamoto, K. and Toriyama, S.: Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *PNAS* **89**, 9865–9869 (1992).
108. Tanaka, A., Mita, S., Ohta, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K. and Nakamura, K.: Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6767–6770 (1990).
109. Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L. and Fischhoff, D. A.: Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *PNAS* **88**, 3324–3328 (1991).
110. Bejarano, E. R. and Lichtenstein, C. P.: Prospects for engineering virus resistance in plants with antisense RNA. *Tibtech.* **10**, 383–387 (1992).
111. Fitch, J. H. and Beachy, R. N.: Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 739–763 (1993).
112. Sandford, J. C. and Johnston, S. A.: The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.* **113**, 395–405 (1985).
113. Powell, P. A., Stark, D. M., Sanders, P. R. and Beachy, R. N.: Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *PNAS* **86**, 6949–6952 (1989).
114. Harrison, B. D., Mayo, M. A. and Baulcombe, D. C.: Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* **328**, 799–802 (1987).
115. Gerlach, W. L., Llewellyn, D. and Haseloff, J.: Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature* **328**, 802–805 (1987).
116. Cuzzo, M., O'Connell, K. M., Kaniewski, W., Fang, R. X., Chua, N. H. and Turner, N. E.: Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *BioTechnology* **6**, 549–557 (1988).
117. Hemenway, C., Fang, R. X., Kaniewski, W. K., Chua, N. H. and Turner, N. E.: 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 (1988).
118. Truve, E., Aspöllu, A., Honkanen, J., Puska, R., Mehto, M., Hassi, A., Teeri, T. H., Kelve, M., Seppänen, P. and Saarima, M.: Transgenic potato plants expressing mammalian 2'–5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus x infection under field conditions. *BioTechnology* **11**, 1048–1052 (1993).
119. Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Tinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. and Galeffi, P.: Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**, 469–472 (1993).

120. Payne, G., Ward, E., Gaffney, T., Goy, P. A., Moyer, M., Harper, A., Meins, F., Jr. and Ryals, J.: Evidence for a third structural class of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **15**, 797–808 (1990).
121. Woloshuk, C., Meulenhoff, J. S., Sela-Buurlage, M., van den Elzen, P. J. M. and Cornelissen, B. J. C.: Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*. **3**, 619–628 (1991).
122. Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J. and Broglie, R.: Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizocotonia solani*. *Science* **253**, 1194–1197 (1991).
123. Broglie, K., E. Broglie, P. Biddle, R. Cressman and R. Broglie: Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a ben chitinase gene in transgenic tobacco. *Plant Cell*. **1**, 599–607 (1989).
124. Meeley, R. B., Johal, G. S., Briggs, S. P. and Walton, J. D.: A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *The Plant Cell*. **4**, 71–77 (1992).
125. Logemann, J., Jach, G., Tommerup, H., Mundy, J. and Schell, J.: Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *BioTechnology* **10**, 305–308 (1992).
126. Lamb, F. I., L. Roberts, M. and Lord, J. M.: Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preproricin. *Eur. J. Biochem.* **184**, 265–270 (1985).
127. Endo, Y., Tsurugi, K. and Ebert, R.: The mechanism of action of barley toxin: a type 1 ribosome-inactivating protein with RNA N-glycosidase activity. *Biochem. Biophys. Acta*. **954**, 224–226 (1988).
128. de la Fuente-Martinez, J., Mosqueda-Cano, G., Alvarez-Morales, A. and Herrera-Estrella, L.: Expression of a bacterial phaselotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *BioTechnology* **10**, 905–909 (1992).
129. Anzai, H., Yoneyama, K. and Yamaguchi, I.: Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 492–494 (1989).
130. Goldberg, R. B.: Plants: Novel development processes. *Science* **240**, 1460–1467 (1988).
131. Benfey, P. N. and Chua, N.-H.: Regulated genes in transgenic plants. *Science* **244**, 174–181 (1989).
132. McCue, K. and Hanson, A.: Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnol.* **8**, 358–362 (1990).
133. Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M. and Inzé, D.: Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* **10**, 1723–1732 (1991).
134. Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Reupold-Popp, P., Sandermann Jr., H. and Langebartels, C.: Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *BioTechnology* **12**, 165–168 (1994).
135. Tarczynski, M. C., Jensen, R. G. and Bohnert, H. J.: Stress of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**, 508–510 (1993).
136. Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y. and Nishida, I.: Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* **356**, 710–713 (1992).



137. Visser, R. G. F., Hergeberg, M., van der Leij, F. R., Jacobsen, E., Witholt, B. and Feenstra, W. J.: Molecular cloning and partial characterization of the gene for granule-bound starch synthase from a wild type and an amylose-free potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci.* **64**, 185–192 (1989).
138. Müller-Röber, B. T., Kossmann, J., Hannah, L. C., Willmitzer, L. and Sonnewald, U.: One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to evaluated levels of sucrose. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 136–146 (1990).
139. Salanoubat, M. and Belliard, G.: Molecular cloning and sequencing of sucrose synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.): preliminary characterization of sucrose synthase mRNA distribution. *Genet.* **60**, 47–56 (1987).
140. Klein, T. M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. and Sandford, J. C.: Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *PNAS* **85**, 4305–4309 (1988).
141. Kossmann, J., Visser, R. G. F., Müller-Röber, B. T., Willmitzer, L. and Sonnewald, U.: Cloning and expression analysis of a potato cDNA that encodes branching enzyme: evidence for co-expression of starch biosynthetic genes. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 39–44 (1991).
142. Duxburry, D. D.: Modified starch functionalities – no chemicals or enzymes. *Food Protection.* **50**, 35–37 (1989).
143. Yuan, R. C., Thompson, D. B. and Boyer, C. D.: Fine structure of amylopectin in relation to gelatinization and retrogradation behavior of maize starches from three *wx*-containing genotypes in two inbred lines. *Cereal Chem.* **70**, 81–89 (1993).
144. Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponsstein, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., de Fries, J. N., Witholt, B. and Feenstra, W. J.: Isolation of an amylase-free starch mutant of the potato (*Solanum Tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* **75**, 217–221 (1987).
145. Smith, A. M.: Major differences in isoforms of starch-branching enzyme between developing embryos of round- and wrinkled -seeded peas (*Pisum sativum*). *Planta.* **175**, 270–279 (1988).
146. Visser, R. G. F., Somhorst, I., Kuipers, G. J., Ruys, N. J., Feenstra, W. J. and Jacobsen, E.: Inhibition of the expression of the gene for granula-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol. Gen. Genet.* **225**, 289–296 (1991).
147. Müller-Röber, B., Sonnewald, U. and Willmitzer, L.: Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**, 1229–1238 (1992).
148. Baecker, P. A., Furlong, C. E. and Preiss, J.: Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose synthetase as deduced from the nucleotide sequence of the *glgC* gene. *J. Biol. Chem.* **258**, 5084–5088 (1983).
149. Morell, M. K., Bloom, M., Knowles, V. and Preiss, J.: Subunit structure of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **85**, 182–187 (1987).
150. Morell, M. K., Bloom, M. and Preiss, J.: Affinity labeling of the allosteric activator site(s) of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **263**, 633–637 (1988).
151. Morell, M. K., Bloom, M., Larsen, R., Okita, T. W. and Preiss, J.: Biochemistry and molecular biology of starch synthesis. In: Key, J. L., L. McIntosh (eds). *Plant gene systems and their biology*. Alan Liss, New York, pp. 227–242 (1987).

152. Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C. R. and Preiss, J.: Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* **86**, 1131–1135 (1988).
153. Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C. R. and Preiss, J.: A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADPglucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant Physiol.* **88**, 1175–1181 (1988).
154. Krishnan, H. B., Reeves, C. D. and Okita, T. W.: ADPglucose pyrophosphorylase is encoded by different mRNA transcripts in leaf and endosperm of cereals. *Plant Physiol.* **81**, 642–645 (1986).
155. Anderson, J. M., Hnilo, J., Raymond, L., Okita, T. W., Morell, M. K. and Preiss, J.: The encoded primary sequence of a rice seed ADPglucose pyrophosphorylase subunit and its homology to the bacterial enzyme. *J. Biol. Chem.* **264**, 12238–12242 (1989).
156. Jones, J. D. G., Dean, C., Gidoni, D., Gilbert, D., Bond-Nutter, D., Lee, R., Bedbrook, J. and Dunsmuir, P.: Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 536–542 (1988).
157. Bhawe, M. R., Lawrence, S., Barton, C. and Hannah, L. C.: Identification and molecular characterization of shrunken-2 cDNA clones of maize. *Plant Cell.* **2**, 581–588 (1990).
158. Farinelli, L., Malnoë, P. and Collet, G. F.: Heterologous encapsidation of potato virus Y strain O (PVY<sup>O</sup>) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVY<sup>N</sup>) in *Solanum tuberosum* CV Bintje. *BioTechnology* **10**, 1020–1025 (1992).
159. Shewmaker, C. K., Boyer, C. D., Wiesenborn, D. P., Thompson, D. B., Boersig, M. R., Oakes, J. V. and Stalker, D. M.: Expression of *Escherichia coli* glycogen synthase in the tubers of transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*) results in a highly branched starch. *Plant Physiol.* **104**, 1159–1166 (1994).
160. Pen, J., Verwoerd, T. C., van Paridon, P. A., Beudeker, R. F., van den Elzen, P. J. M., Geerse, K., van der Klis, J. D., Versteegh, H. A. J., van Ooyen, A. J. J. and Hoekema, A.: Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *BioTechnology* **11**, 811–814 (1993).
161. Flavell, R. B., Goldsbrough, A. P., Robert, L. S., Schnick, D. and Thompson, R. D.: Genetic variation in wheat HMW glutenin subunits and the molecular basis of bread-making quality. *BioTechnology* **7**, 128–129 (1989).
162. Ebskamp, M. J. M., van der Meer, I. M., Spronk, B. A., Weisbeek, P. J. and Smeekeens, S. C. M.: Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *BioTechnology* **12**, 272–275 (1994).
163. Worrell, A. C., Bruneau, J.-M., Summerfelt, K., Boersig, M. and Voelker, T. A.: Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *The Plant Cell.* **3**, 1121–1130 (1991).
164. Peñarrubia, L., Kim, R., Giovannoni, J., Kim, S.-H. and Fischer, R. L.: Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *BioTechnology* **10**, 561–564 (1992).
165. van Hartingsfeldt, W., van Zeijl, C. M. J., Hartevelde, G. M., Gouka, R. J., Suykerbuyk, M. E. G., Luiten, R. G. M., van Paridon, P. A., Selten, G. C. M., Veenstra, A. E., van Gorcom, R. F. M. and Hondel, C. A. M. J. J.: Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Genet.* **127**, 87–94 (1993).
166. Pen, J., Molendijk, L., Quax, W. J., Sijmons, P. C., van Ooyen, A. J. J., van den Elzen, P. J. M., Rietveld, K. and Hoekema, A.: Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. *BioTechnology* **10**, 292–296 (1992).



167. Grayburn, W. S., Collins, G. B. and Hildebrand, D. F.: Fatty acid alteration by a  $\Delta 9$  desaturase in transgenic tobacco tissue. *BioTechnology* **10**, 675–678 (1992).
168. Kridel, J. et al.: Abstract 723 presented at the third international congress of plant molecular biology held in Tuscon (1991).
169. Knutzon, D. S., Thompson, G. A., Radke, S. E., Johnson, W. B., Knauf, V. C. and Kridel, J. C.: Modification of Brassica seed oil antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2624–2628 (1992).
170. Voelker, T. A., Worrell, A. C., Anderson, L., Bleibaum, J., Fan, C., Hawkins, D. J., Radke, S. E. and Davies, H. M.: Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science* **257**, 72–74 (1992).
171. Altenbach, S. and Simpson, R.: Manipulation of methionine-rich protein genes in plant seeds. *Trends in Biotechnology* **8**, 156–160 (1990).
172. Hamilton, A. J., Lycett, G. W. and Grierson, D.: Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Science* **346**, 284–287 (1990).
173. Rottmann, W. H., Peter, G. F., Oeller, P. W., Keller, J. A., Shen, N. F., Nagy, B. P., Taylor, L. P., Campbell A. D. and Theologis, A.: 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Tomato is Encoded by a Multigene Family Whose Transcription is Induced During Fruit and Floral Senescence. *J. Mol. Biol.* **222**, 937–961 (1999).
174. Oeller, P. W., Min-Wong, L., Taylor, L. P., Pike, D. A. and Theologis, A.: Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* **254**, 437–439 (1991).
175. Sheehy, R. E., Kramer, M. and Hiatt, W. R.: Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *PNAS* **85**, 8805–8809 (1988).
176. Seymour, G. B., Fray, R. G., Hill, P. and Tucker, G. A.: Down-regulation of two non-homologous endogenous tomato genes with a single chimaeric sense gene construct. *Plant Mol. Biol.* **23**, 1–9 (1993).
177. Klee, H. J., Hayford, M. B., Kretzmer, K. A., Barry, G. F. and Kishore, G. M.: Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *The Plant Cell* **3**, 1187–1193 (1991).
178. Meyer, R.: Nachweis gentechnologisch veränderter Pflanzen mittels PCR am Beispiel der Flavr Savr-Tomate. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **201**, 583–586 (1995).
179. Bao, P. H., Castiglione, S., Giordani, C., Li, W., Wang, G., Datta, S. K., Datta, K., Potrykus, I. and Sala, F.: State of the foreign gene and of the genome in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Cytotechnology* **11**, 123–125 (1993).
180. Golovkin, M. V., Abarham, M., Morocz, S., Bottka, S., Feher, A. and Dudits, D.: Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. *Plant Science* **90**, 41–52 (1993).
181. Perez, P., Tiraby, G., Kallerhoff, J. and Perret, J.: Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol. Biol.* **13**, 365–373 (1989).
182. van den Elzen, P. J. M., Townsend, J., Lee, K. Y. and Bedbrook, J. R.: A chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **5**, 299–302 (1985).
183. Hayford, M. B., Medford, J. I., Hoffman, N. L., Rogers, S. G. and Klee, H. J.: Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamycin acetyltransferase. *Plant Physiol.* **86**, 1216–1222 (1988).
184. Thompson, C. J., Movva, N. R., Tizzard, R., Cameri, R., Davies, J. E., Lauwereys, M. and Botterman, J.: Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* **6**, 2519–2523 (1987).

185. Lyon, B. R., Llewellyn, D. J., Huppatz, J. L., Dennis, E. S. and Peacock, W. J.: Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Mol. Biol.* **13**, 533–540 (1989).
186. Perl, A., Galili, S., Shaul, O., Ben-Tzvi, I. and Galili, G.: Bacterial dihydrodipicolinate synthase and desensitized aspartate kinase: Two novel selectable markers for plant transformation. *BioTechnology* **11**, 715–718 (1993).
187. Haughn, G. W., Smith, J., Mazur, B. and Sommerville, C.: Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 266–271 (1988).
188. Goddijn, O. J. M., van der Duyn Schouten, P. M., Schilperoort, R. A. and Hoge, J. H. C.: A chimeric tryptophan decarboxylase gene as a novel selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **22**, 907–912 (1993).
189. Zhang, W. and Wu, R.: Efficient regeneration of transgenic rice plants from protoplasts and correctly regulated expression of foreign genes in the plants. *Theoret. Appl. Genet.* **76**, 835–840 (1988).
190. Kyoizuka, J., Fujimoto, H., Izawa, T. and Shimamoto, K.: Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize *Adh1* promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 40–48 (1991).
191. Terada, R., Nakayama, T., Iwabuchi, M. and Shimamoto, K.: A wheat histone H3 promoter confers cell division-dependent expression of the *gusA* gene in transgenic rice plants. *Plant J.* **3**, 241–252 (1993).
192. Kyoizuka, J., McElroy, D., Hayakawa, T., Xie, Y., Wu, R. and Shimamoto, K.: Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* and rice *rbcS-gusA* fusion genes in transgenic rice. *Plant Physiol.* **102**, 991–1000 (1993).
193. Xu, D., McElroy, D., Thornburg, R. and Wu, R.: Systematic induction of a potato *pin2* promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol.* **22**, 573–588 (1993).
194. Matsuki, R., Onodera, H., Yamauchi, T. and Uchimiya, H.: Tissue-specific expression of the *rolC* promoter of the Ri plasmid in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 12–16 (1989).
195. Slightom, J. L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L. and Tepfer, D.: Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid: identification of open-reading frames. *J. Biol. Chem.* **261**, 108–121 (1986).
196. Kartha, K. K., Chibbar, R. N., Georges, F., Leung, N., Caswell, K., Kendall, E. and Qureshi, J.: Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell. Reports* **8**, 429–443 (1989).
197. Bhattacharyya-Pakrasi, M., Peng, J., Elmer, J. S., Laco, G., Shen, P., Kaniewska, M. B., Kononowicz, H., Wen, F., Hodges, T. K. and Beachy, R. N.: Specificity of promoter from the rice tungro bacilliform virus for expression phloem tissues. *Plant J.* **4**, 71–79 (1993).
198. Velten, J., Velten, L., Hain, R. and Schell, J.: Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* **3**, 2723–2730 (1984).
199. Paszkowski, J., Shillito, R. D., Mandák, M. S. V., Hohn, T., Hohn, B. and Potrykus, I.: Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**, 2717–2722 (1984).
200. Horsch, R. B., Fry, J. B., Hoffmann, N. L., Wallroth, M., Eichholz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T.: A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229–1231 (1985).



201. Sonnewald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stitt, M. and Willmitzer, L.: Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *The Plant J.* **1**, 95–106 (1991).
202. Özcan, S., Fierk, S. and Draper, J.: Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation. *BioTechnology* **11**, 218–221 (1993).
203. Bird, C. R., Ray, J. A., Fletcher, J. D., Boniwell, J. M., Bird, A. S., Teulieres, C., Blain, I., Bramley, P. M. and Schuch, W.: Using antisense RNA to study gene function: Inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. *BioTechnology* **9**, 635–639 (1991).
204. D'Halluin, K., Bottermank, J. and De Greef, W.: Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Science* **30**, 866–871 (1990).
205. Hinchey, M. A. W., Connor-Ward, D. V., Newell, C. A., McDonnell, R. E., Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B., Fraley, R.T. and Horsch, R.B.: Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *BioTechnology* **6**, 915–922 (1988).
206. Fillatti, J. J., Kiser, J., Rose, R. and Comai, L.: Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *BioTechnology* **5**, 726–730 (1987).
206. Fillatti, J. J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. and Comai, L.: *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *populus*. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 192–199 (1987).
207. D'Halluin, Bossut, M., Bonne, E., Mazur, B., Leemans, J. and Botterman, J.: Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *BioTechnology* **10**, 309–314 (1992).
209. Ling, K., Namba, S., Gonsalves, C., Slightom, J. L. and Gonsalves, D.: Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein genome. *BioTechnology* **9**, 752–758 (1991).
210. de Haan, P., Gielen, J. J. L., Prins, M., Wijkamp, I. G., van Schepen, A., Peters, D., van Grinsven, M. Q. J. M. and Goldbach, R.: Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *BioTechnology* **10**, 1133–1137 (1992).
211. Pang, S.-Z., Slightom, J. L. and Gonsalves, D.: Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot *Tospoviruses*. *BioTechnology* **11**, 819–824 (1993).
212. Nelson, R. S., McCormick, S. M., Delannay, X., Dubé, P., Layton, J., Anderson, E.J., Kaniewska, M., Proksch, R.K., Horsch, R.B., Rogers, S. G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N.: Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *BioTechnology* **6**, 403–409 (1988).
213. Kunik, T., Salomon, R., Zamir, D., Navot, N., Zeidan, M., Michelson, I., Gafni, Y. and Czosnek, H.: Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *BioTechnology* **12**, 500–503 (1994).
214. Smith, C. J. S., Watson, C. F., Ray, J., Bird, C. R., Morris, P. C., Schuch, W. and Grierson, D.: Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* **334**, 724–726 (1988).
215. Klein, T. M., Gradziel, T., Fromm, M. E. and Sandford, J. C.: 1988 Factors influencing gene delivery into *zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *BioTechnology* **6**, 559–563 (1988).

216. Klein, T. M., Kornstein, L., Sandford, J. C. and Fromm, M. E.: 1989 Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol.* **91**, 440–444 (1989).
217. Oard, J. H., Paige, D. F., Simmonds, J. A. and Gradziel, T. M.: Transient Expression in maize, rice and wheat cells using an airgun apparatus. *Plant Physiol.* **92**, 334–339 (1988).
218. Goff, S. A., Klein, T. M., Roth, B. A., Fromm, M. E., Cone, K. C., Radicella, J. P. and Chandler, V. L.: Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of regulatory genes into maize tissues. *EMBO J.* **9**, 2517–2522 (1990).
219. Bruce, W. B., Christensen, A. H., Klein, T., Fromm, M. and Quail, P. H.: Photoregulation of a phytochrome gene promotor from oat transferred into rice by particle bombardment. *PNAS* **86**, 9692–9696 (1989).
220. Christou, P., Murphy, J. E. and Swain, W. F.: Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *PNAS* **84**, 3962–3966 (1987).
221. McCabe, D. E., Swain, W. F., Martinell, B. J. and Christou, P.: Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *BioTechnology* **6**, 923–926 (1988).
222. Haigo, T. A., Blowers, D. and Earle, E. D.: Stable transformation of sorghum cell cultures after bombardment with DNA-coated microparticles. *Plant Cell. Reports* **10**, 260–264 (1991).
223. Klein, T. M., Harper, E. C., Svab, Z., Sandford, J. C., Fromm, M. E. and Maliga, P.: Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *PNAS* **85**, 8502–8505 (1988).
224. Twell, D., Klein, T. M., Fromm, M. E. and McCormick, S.: Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment. *Plant Physiol.* **91**, 1270–1274 (1989).
225. Tomes, D. T., Weissinger, A. K., Ross, M., Higgins, R., Drummond, B. J., Schaaf, S., Malone-Schoneberg, J., Staebell, M., Anderson, P., Flynn, J. and Howard, J.: Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. *Plant Mol. Biol.* **14**, 261–268 (1990).
226. Sautter, C., Waldner, H., Neuhaus-Url, G., Galli, A., Neuhaus, G. and Potrykus, I.: Micro-Targeting: High efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. *BioTechnology* **9**, 1080–1085 (1991).
227. Lonsdale, D., Önde, S. and Cuming, A.: Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. *J. Exp. Botany.* **41**, 1161–1165 (1990).
228. Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. and Sandford, J. C.: High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70–73 (1987).
229. Fromm, M., Taylor, L. P. and Walbot, V.: Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *PNAS* **82**, 5824–5828 (1985).
230. Vasil, V., Brown, S. M., Re, D., Fromm, M. E. and Vasil, I. K.: Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *BioTechnology* **9**, 743–747 (1991).
231. Vasil, V., Srivastava, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E. and Vasil, I. K.: Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *BioTechnology* **11**, 1553–1558 (1993).
232. Fitch, M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L. and Sandford, J. C.: Virus resistant papaya plants derived from tissues bombardment with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *BioTechnology* **10**, 1466–1472 (1992).



233. Murry, L. E., Elliott, L. G., Capitant, S. A., West, J.A., Hanson, K.K., Scarafia, L., Johnston, S., De-Luca-Flaherty, C., Nichols, S., Cunanan, D., Dietrich, P. S., Mettler, I.J., Dewald, S., Warnick, D.A., Rhodes, C., Sinibaldi, R. M. and Brunke, K.J.: Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. *BioTechnology* **11**, 1559–1564 (1993).
234. Huttly, A. K. and Baulcombe, D. C.: A wheat  $\alpha$ -Amy2 promotor is regulated by gibberellin in transformed oat aleurone protoplasts. *EMBO J.* **8**, 1907–1913 (1989).
234. Staub, J. M. and Maliga, P.: Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *The Plant Cell*. **4**, 39–45 (1992).
235. Mascarenhas, D., Mettler, I. J., Pierce, D. A. and Lowe, H. W.: Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. *Plant Molec. Biol.* **15**, 913–920 (1990).
236. Christensen, A. H., Sharrock, R. A. and Quail, P. H.: Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promotor activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* **18**, 675–689 (1992).
237. Datta, S. K., Peterhans, A., Datta, K. and Potrykus, I.: Genetically engineered fertile indica-rice recovered from protoplasts. *BioTechnology* **8**, 736–740 (1990).
238. Terada, R. and Shimamoto, K.: Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 389–392 (1990).
239. Christou, P., McCabe, D. E. and Swain, W. F.: Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* **87**, 671–674 (1988).
240. Wang, Z., Takamizo, T., Iglesias, V. A., Osusky, M., Nagel, J., Potrykus, I. and Spangenberg, G.: Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts. *BioTechnology* **10**, 691–696 (1992).
241. Golds, T., Maglia, P. and Koop, H.-U.: Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *BioTechnology* **11**, 95–97 (1993).
242. Nelson, R. S., Powell, A. P. and Beachy, R. N.: Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. *Virology* **158**, 126–132 (1987).
243. Anderson, E. J., Stark, D. M., Nelson, R. S., Powell, P. A., Tumer, N. E. and Beachy, R.N.: Transgenic plants that express the coat protein genes of tobacco mosaic virus or alfalfa mosaic virus interfere with disease development of some nonrelated viruses. *Phytopathology* **79**, 1284–1290 (1989).
244. Nejidat, A. and Beachy, R. N.: Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**, 247–251 (1990).
245. Sanders, P., Sammons, B., Kaniewski, W., Haley, L., Layton, J., La Vallee, B. J., Delannay, X. and Tumer, N. E.: Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus of tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology* **82**, 683–690 (1992).
246. van Dun, C. M. P., Bol, J. F. and Van Vloten-Doting, L.: Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology* **159**, 299–305 (1987).
247. van Dun, C. M. P. and Bol, J. F.: Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resistant to infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. *Virology* **167**, 649–652 (1988).

248. *van Dun, C. M. P., Overduin, B., Van Vloten-Doting, L. and Bol, J. F.*: Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection. *Virology* **164**, 383–389 (1988).
249. *Hoekema, A., Huisman, M. J., Molendijk, L., van den Elzen, P. J. M. and Cornelissen, B. J. C.*: The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. *BioTechnology* **7**, 273–278 (1989).
250. *Kaniewski, W., Lawson, C., Sammons, B., Haley, L., Hart, J., Delannay, X. and Tumer, N.E.*: Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. *BioTechnology* **8**, 750–754 (1990).
251. *Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P. and Tumer, N.E.*: Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *BioTechnology* **8**, 127–134 (1990).
252. *Jongedijk, E., de Schutter, A. A. J. M., Stolte, van den Elzen, T. P. J. M. and Cornelissen, B. J. C.*: Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *BioTechnology* **10**, 422–429 (1992).
253. *McKenzie, D. J. and Tremaine, J. H.*: Transgenic *Nicotiana debneyii* expressing viral coat protein are resistant to potato virus S infection. *J. Gen. Virol.* **71**, 2167–2170 (1990).
254. *McKenzie, D. J. and Ellis, P. J.*: Resistance to tomato spotted wilt virus infection in transgenic tobacco expressing the viral nucleocapsid gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 34–40 (1992).
255. *Stark, D. M. and Beachy, R. N.*: Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. *BioTechnology* **7**, 1257–1262 (1989).
256. *Van der Vlugt, R. A. A., Ruiter, R. K. and Goldbach, R.*: Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol. Biol.* **20**, 631–639 (1992).
257. *Lindbo, J. A. and Dougherty, W. G.*: Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol. Plant Interact.* **7**, 144–153 (1992).
258. *Lindbo, J. A. and Dougherty, W. G.*: 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 (1992).
259. *Namba, S., Ling, K., Gonsalves, C., Slightom, J. L. and Gonsalves, D.*: Protection of transgenic plants expressing the coat protein gene of watermelon mosaic virus II or zucchini yellow mosaic virus against six potyviruses. *Phytopathology* **82**, 940–946 (1992).
260. *Regner, F., da Camara Machado, A., da Camara Machado, M. L., Steinkeller, H. and Mattanovich, D.*: Coat protein mediated resistance to plum pox virus in *Nicotiana clevelandii* and *N. benthamiana*. *Plant Cell. Rep.* **11**, 30–33 (1992).
261. *Wilson, T. M. A.*: Review: Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. *PNAS* **90**, 3134–3141 (1993).
262. *Loesch-Fries, L. S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L., Hill, K., Krahm, K., Jarvis, N., Nelson, S. and Halk, E.*: Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J.* **6**, 1845–1851 (1987).
263. *Tumer, N. E., O'Connell, K. M., Nelson, R. S., Sanders, P. R. and Beachy, R. N.*: Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers crossprotection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.* **6**, 1181–1188 (1987).



264. Hill, K. K., Jarvis-Eagan, N., Halk, E. L., Krahn, K. J., Krahn, K.J., Liao, L.W., Mathewson, R.S., Merlo, D.J., Nelson, S.E. Tashka, K.E. and Loesch-Fries, S.L.: The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. *BioTechnology* **9**, 373–377 (1991).
265. Namba, S., Ling, K., Gonsalves, C., Gonsalves, D. and Slightom, J. L.: Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain-WL appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains. *Genet.* **107**, 181–188 (1991).
266. Quemeda, H. D., Gonsalves, D. and Slightom, J. L.: Expression of coat protein gene form cucumber mosaic virus strain C in tobacco: protection against infections by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. *Phytopathology* **81**, 794–802 (1991).
267. Gonsalves, D., Chee, P., Providenti, R., Seem, R. and Slightom, J. L.: Comparison of a coat protein-mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to infection by cucumber mosaic virus under field conditions with natural challenge inoculations by vectors. *BioTechnology* **10**, 1562–1570 (1992).
268. Bertoli, D. J., Cooper, J. I., Edwards, M. L. and Hawes, W. S.: Arabis mosaic nepovirus coat protein in transgenic tobacco lessens disease severity and virus replication. *Ann. Appl. Biol.* **120**, 47–54 (1992).
269. Kawchuk, L. M., Martin, R. R. and McPherson, J.: Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**, 301–307 (1990).
270. Kawchuk, L. M., Martin, R. R. and McPherson, J.: Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 227–253 (1990).
271. Van der Wilk, F., Willink, D. P. L., Huisman, M. J. and Huttinga, H.: Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. *Plant. Mol. Biol.* **17**, 431–439 (1991).
272. Baker, H., Reavy, B., Kumar, A., Webster, K. D. and Mayo, M. A.: Restricted virus multiplication in potatoes transformed with the coat protein gene of potato leafroll luteovirus: similarities with a type of host gene-mediated resistance. *Ann. Appl. Biol.* **120**, 55–64 (1992).
273. Gielen, J. J. L., De Haan, P., Kool, A. J., Peters, D., Van Grinsven, M. W. J. M. and Goldbach, R. W.: Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative-strand RNA virus. *BioTechnology* **9**, 1363–1367 (1991).
274. McKenzie, D. J., Tremaine, J. H. and McPherson, J.: Genetically engineered resistance to potato virus S in potato cultivar Russet Burbank. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 95–102 (1991).
275. Pang, S.-Z., Nagpala, P., Wang, M., Slightom, J. L. and Gonsalves, D.: Resistance to heterologous isolates of tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco expressing its nucleocapsid protein gene. *Phytopathology* **82**, 1223–1229 (1992).
276. Williams, S., Friedrich, L., Dincher, S., Carozzi, N., Kessmann, H., Ward, E. and Ryals, J.: Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expression in transgenic plants. *BioTechnology* **10**, 540–543 (1992).
277. Hudspeth, R. L. and Grula, J. W.: Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzyme involved in C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **12**, 579–589 (1989).
278. Visser, R. G. F. and Jacobsen, E.: Towards modifying plants for altered starch content and composition. *Tibtech.* **11**, 63–68 (1993).

279. McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, K. and Fraley, R.: Leaf disk transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell. Reports 5, 81–84 (1986).
280. Beck, C. I. and Ulrich, T.: Biotechnology in the food industry. BioTechnology 11, 895–902 (1993).

Christoph Niederhauser  
Michael Gilgen  
Rolf Meyer  
Institut für Biochemie der Universität Bern  
Abteilung für Lebensmittelchemie  
Freiestrasse 3  
CH-3012 Bern