

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 19 december 2013
KENMERK CGM/131219-02
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met een disarmed TYLCV expressiesysteem

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een wijziging van de vergunning met de titel 'Gebruik van een aardappelvirus X (PVX) en tabaks ratel virus (TRV) als expressie- vector voor *Lycopersicon sp.* en *Nicotiana sp.*' van de Universiteit van Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijziging in een bestaande vergunning. De aanvrager werkt met expressiesystemen gebaseerd op aardappelvirus X (PVX) en tabaksratelvirus (TRV) en wil een op *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) gebaseerd vectorsysteem (p1470/pIR-X) toevoegen. De expressiesystemen worden gebruikt voor de expressie van heterologe genen in *Lycopersicon spp.* en *Nicotiana spp.* TYLCV is een monopartiet geminivirus dat wordt overgebracht door de witte vlieg. Het virus komt voor in landen rond het Middellandse Zeegebied, Azië, Australië, Centraal Amerika en de Verenigde Staten en veroorzaakt schade aan tomaat.

Het vectorsysteem p1470/pIR-X bestaat uit twee vectoren die opgebouwd zijn uit enkele onderdelen van TYLCV en een bacterieel plasmide. Door het ontbreken van (delen van) essentiële genen is het vectorsysteem biologisch ingeperkt en niet in staat zich te verspreiden buiten de plant. Begomo- en geminivirussen kunnen echter gemakkelijk recombineren. Het vectorsysteem kan op twee manieren in aanraking komen met verwante virussen: via besmet plantmateriaal en infectie door witte vlieg.

Voor het inoculeren en uitplanten van zaden en zaailingen adviseert de COGEM een inperkingsniveau van PCM-I/PKM-I met als aanvulling dat het uitgangsmateriaal vrij moet zijn van verwante begomo- en geminivirussen om complementatie of recombinitie te voorkomen. Daarnaast benadrukt de COGEM het belang van effectieve bestrijding van witte vlieg. Bij de uitvoering van de werkzaamheden op de genoemde inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. ir. R.A.A. van der Vlugt van Plant Research International.

Werkzaamheden met een ‘disarmed’ TYLCV expressie systeem

COGEM advies CGM/131219-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de wijziging van een vergunning (IG 02-094) van de Universiteit van Amsterdam met de titel ‘Gebruik van aardappelvirus X (PVX) en tabaksratelvirus (TRV) als expressievector voor *Lycopersicon sp* en *Nicotiana sp*’. De aanvrager wil een op *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) gebaseerd vectorsysteem (p1470/pIR-X) toevoegen aan de vergunning voor de expressie van heterologe genen in *Lycopersicon spp.* en *Nicotiana spp.*

1.1 *Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)*

TYLCV is een plantenvirus dat voorkomt in landen rond het Middellandse Zeegebied, Azië, Australië, Centraal Amerika en de Verenigde Staten en schade veroorzaakt aan tomaten.¹ In Nederland heeft het virus een Quarantaine-status en komt het niet voor.^{2,3} Symptomen van een TYLCV besmetting zijn groeireductie en misvorming van de stengel en bladeren. De bladeren zien er gekreukeld uit en vertonen geelkleuring in de nerven. Het virus dankt zijn naam daarnaast aan het typische opkrullen van de bladeren bij een infectie. Geïnfecteerde planten vormen geen of zeer kleine vruchten.⁴

De primaire gastheer voor TYLCV is de tomatenplant (*Solanum lycopersicum*), maar het virus kan ook andere planten infecteren zoals de gewone boon (*Phaseolus vulgaris*), paprika (*Capsicum annuum*), chilipeper (*C. chinense*), tabak (*Nicotiana tabacum*), enkele decoratieve planten en onkruiden.^{4,5} TYLCV infecteert het floëem van de plant. Bekend is dat laat in de infectie ook weefsel buiten het floëem geïnfecteerd kan raken. Het virus wordt overgebracht door de witte vlieg (*Bemisia tabaci*).¹ TYLCV is niet mechanisch overdraagbaar.⁶

1.2 *Genomische organisatie TYLCV*

TYLCV is een monopartiet geminivirus dat behoort tot het genus *Begomovirus*. Het genoom van TYLCV bestaat uit één enkelstrengs circulair DNA molecuul van ongeveer 2,8 kb.⁷ Het genoom codeert voor zes overlappende ORF's (V1, V2 en C1 t/m C4).⁸ De ORF's worden vanuit de ‘intergenic region’ (IR) in twee richtingen (bidirectioneel) afgelezen. De IR-sequentie vormt een ‘stem loop’ en is essentieel voor replicatie en transcriptie van het virale genoom. Het virale ssDNA komt de plant binnen en wordt m.b.v. plantenfactoren gedupliceerd tot dsDNA. De virale mRNA worden afgelezen van het dsDNA. Verder is het dsDNA essentieel voor de replicatie. Begomovirussen kennen drie verschillende replicatiemechanismen. Bij ‘complementary-strand’ replicatie (CSR) wordt alleen dsDNA gegenereerd, bij ‘rolling circle’ replicatie (RCR) alleen ssDNA en bij ‘recombination-dependent’ replicatie (RDR) kan zowel dsDNA als ssDNA worden geproduceerd. Voor de verspreiding van TYLCV is de productie van ssDNA essentieel. Dit gebeurt bij TYLCV via ‘rolling circle’ replicatie waarbij het dsDNA dient als template.

De ssDNA moleculen worden ingepakt in een door het viraal genoom gecodeerde eiwitmantel en kunnen dan via de witte vlieg overgebracht worden naar andere planten.

Het ORF C1 (*rep*) is essentieel voor initiatie van de ‘rolling circle’ replicatie. Het Rep eiwit zorgt voor de herkenning en binding aan de ‘origin of replication’ (IR regio). C2 en C3 spelen een rol bij de replicatie en de pathogeniteit van het virus. C3 stimuleert de replicatie door interactie met verschillende planteneiwitten.

Het ORF V1 en V2 coderen voor het manteleiwit en transporteiwit (resp. *coating protein*, CP en *pre-coat protein of movement protein*). De producten van de ORF's V1, V2 en C4 zijn betrokken bij het transport van het virus in de plant. Deze drie eiwitten controleren het virale DNA transport naar de kern, uit de kern en via de plasmodesmata naar de buurcellen. Een functioneel CP is essentieel voor virusdeeltjesvorming en insecttransmissie. V2 is gekoppeld aan verspreiding van het virus in en tussen de plantencellen onderling en speelt een rol in de onderdrukking van (delen van) het gastheersysteem.

Geminivirussen zijn door hun beperkte genoom in grote mate afhankelijk van de gastheercellen en kunnen tijdens infectie diverse processen in de plant beïnvloeden. Zo kunnen ze de celcyclus van de plant beïnvloeden om replicatie van hun virale DNA te induceren, maar hebben ze ook invloed op de genexpressie patronen in de plant, celdood, macromoleculair transport en kunnen ze interfereren in cellulaire signaleringsprocessen en eiwitproductie om het afweersysteem van de gastheer te onderbreken of blokkeren.⁹

Recombinatie lijkt in belangrijke mate bij te dragen aan de genetische diversiteit van begomovirussen zoals TYLCV.^{10,11,12} Individuele planten en cellen kunnen gecoïnfecteerd worden door verschillende virussen. In geminivirussen zijn recombinaties bekend tussen verschillende stammen, soorten, genussen en tussen families.¹³ De precieze mechanismen die recombinatie beïnvloeden zijn onbekend, wel zijn er verschillende recombinatie ‘hot’ en ‘cold’ spots geïdentificeerd.⁴

1.3 Het p1470/pIR-X expressiesysteem

Het vectorsysteem waarmee de aanvrager beoogt te gaan werken bestaat uit de p1470 vector en de pIR-X satellietvector. De vectoren zijn opgebouwd uit enkele onderdelen van het TYLCV en een bacterieel plasmide.

De p1470 vector is gebaseerd op de TYLCV vector IL-60-BS.^{14,15} IL-60-BS heeft een 60 bp deletie in het gen dat voor het virale manteleiwit codeert (deze aanpassing wordt aangeduid met IL-60). Hierdoor ontstaat een ‘kreupel’ virus dat geen virusdeeltjes meer kan vormen en geen ziektesymptomen veroorzaakt. Daarnaast heeft IL-60-BS een plasmide (pBluescript II KS1) geïnsereerd in het replicatie (*rep*) gen. Hierdoor is vermenigvuldiging van ssDNA via ‘rolling circle’ replicatie niet meer mogelijk waardoor het virus zich niet meer kan verspreiden. Het virus kan zich alleen nog maar m.b.v. specifieke plantengenen vermenigvuldigen via de dubbelstrengs DNA intermediair. Genexpressie met het IL-60-BS systeem in planten is systemisch maar transiënt. De aanvrager stelt dat de vector niet zaadoverdraagbaar is en niet wordt doorgegeven aan volgende generaties.¹⁶ Voor het gebruik als genexpressievector is alleen de replicatie en expressie van het dsDNA van belang. Doordat geen virusdeeltjes worden gevormd, is verspreiding van IL-60-BS via witte vlieg onmogelijk.

De p1470 vector waarmee de aanvrager voornemens is te gaan werken mist t.o.v. IL-60-BS nog een aantal andere virale genen. Naast de hierboven genoemde elementen zijn in p1470 alleen nog getrunceerde V1 en V2 ORF, een gedeeltelijk C1/4 ORF en de intergenic region (IR) van TYLCV aanwezig. Zowel V1 (CP) als V2 (*pre coat protein*) zijn getrunceerd en hebben een deletie van 20 aminozuren in de N-terminus. Het C1/C4 gen, coderend voor het replicatie initiator eiwit, heeft zowel een 284 bp deletie in C1 als een 133 bp deletie in C4. De intergenic region (IR) is volledig.

Daarnaast wil de aanvrager werken met een pIR-X satelliet vector om gewenste genen tot expressie te brengen. Deze plasmide vector bevat de 'inverted repeat' van TYLCV en een tot expressie te brengen gen. Dit zijn verschillende donorgenen die betrokken zijn bij ziekteresistentie afkomstig van *Fusarium oxysporum*, *Meloidogyne incognita*, *Lycopersicon* spp., *Nicotiana* spp., *Arabidopsis thaliana* of *Petunia hybrida*. Daarnaast bevat de pIR-X vector een 'multiple cloning site' die geflankeerd wordt door een 35S promotor en een 35S terminator afkomstig uit het *Cauliflower mosaic virus*. De gemodificeerde TYLCV sequenties die in de pIR-X satelliet vector aanwezig zijn bestaan uit de 'intergenic region', een deel van het gen dat codeert voor het pre-coat protein V2 (met 60 bp deletie) en een klein stukje van de 5'untranslated region van het manteleiwit V1. De pIR-X vector kan zich niet autonoom repliceren en kan ook het donorgen niet zelfstandig tot expressie brengen. In aanwezigheid van p1470 (of andere IL-60-BS) afgeleiden of het wildtype virus worden zowel p1470 als pIR-X gerepliceerd en wordt het donorgen tot expressie gebracht.

2. Voorgenomen werkzaamheden

Het wijzigingsverzoek betreft een aanvraag voor de toevoeging van een expressiesysteem aan een vergunning waarin al gewerkt wordt met op aardappelvirus X (PVX) en tabaksratelvirus (TRV) gebaseerde expressievectoren. Het betreft ggo werkzaamheden met een zogenaamd 'disarmed' TYLCV. De aanvrager wil de vectoren p1470 en pIR-X vermeerderen in *E. coli* om vervolgens zaden en zaailingen van *Lycopersicon* spp. en *Nicotiana* spp. te inoculeren met de vectoren door ze in een DNA oplossing te plaatsen. Het behandelde plantmateriaal wordt vervolgens uitgezaaid met als doel het transiënt tot expressie brengen van genen, of delen hiervan, betrokken bij de interactie tussen planten en hun pathogenen.

3. Overweging en advies

Door de verwijdering van (delen van) genen in het p1470/pIR-X expressiesysteem kan er geen op TYLCV gebaseerd virus ontstaan dat in staat is tot replicatie en verspreiding buiten de plant. Door de aanpassingen is vermenigvuldiging via 'rolling circle' replicatie niet meer mogelijk waardoor geen ssDNA wordt gevormd waarmee het virus zich kan verspreiden. Door een deletie in V1 kan bovendien geen manteleiwit gevormd worden. Het virus kan zich alleen nog maar m.b.v. specifieke plantengenen vermenigvuldigen via een dubbelstrengs DNA intermediair. Bovendien kan satellietvector pIR-X niet repliceren of genen tot expressie brengen zonder de aanwezigheid van p1470. De COGEM is van mening dat het beschreven vectorsysteem biologisch is ingeperkt en dat de vermeerdering van de vectoren in *E. coli* kan plaatsvinden op ML-I niveau.

De aanvrager wil zaden en zaailingen van *Lycopersicon spp.* en *Nicotiana spp.* inoculeren met p1470/pIR-X en deze vervolgens uitzaaien en opkweken. De COGEM is van mening dat de vectoren p1470 en pIR-x op zichzelf niet in staat zijn om virusdeeltjes te vormen en zich te verspreiden buiten de plant. Het vectorsysteem kan zich enkel als dsDNA repliceren in de plantencellen. Hierbij zal het donorgen tot expressie worden gebracht.

Gezien de kans op recombinatie, zou de eventuele aanwezigheid van verwante virussen een risico kunnen vormen. Door aanwezigheid van ander begomo- en geminivirussen zou p1470/pIR-X kunnen recombineren of kunnen worden gecomplementeerd waardoor bepaalde functies hersteld worden en er toch ssDNA en manteleiwitten gevormd kunnen worden. De grootte van het genoom van geminivirussen lijkt echter aan een maximum gebonden. De beperking van de grootte van het genoom wordt toegeschreven aan onder meer de vorm en grootte van het ssDNA dat wordt ingepakt door de CP.¹⁷ Concrete data over de exacte capaciteit van de virusdeeltjes is echter niet voorhanden. Aangezien geminivirussen een genoom hebben tussen de 2,5 en 3 kb, wordt gedacht dat dit rond de 3kb ligt.¹⁸ Dit zou betekenen dat zelfs als het vectorsysteem p1470 (5340kb) / pIR-X (4366kb) door recombinatie of complementatie in staat is ssDNA deeltjes te vormen, deze niet kunnen worden ingepakt in een virusmantel en daardoor niet kunnen verspreiden naar andere planten.

Het p1470/ pIR-X vectorsysteem kan op twee manieren in aanraking komen met aanverwante virussen waarbij recombinatie zou kunnen optreden: via het uitgangsmateriaal en of via infectie door witte vlieg. Volgens de aanvrager zijn TYLCV en daarvan afgeleide vectoren niet zaadoverdraagbaar. Hij verwijst hierbij naar een publicatie van Peretz *et al.* (2007). De groep van Peretz onderzocht zaad uit de vruchten van planten die de IL-60-BS TYLCV vector bij zich droegen. 1 van de 108 onderzochte F1 planten bleek IL-60-BS-GUS tot expressie te brengen. Volgens de onderzoekers is de aanwezigheid van IL-60-BS-GUS bij de F1 plant mogelijk veroorzaakt door 'mechanische' besmetting van het zaad met de vector. Bewijs of controleproeven hiervoor ontbreken echter. De 60 F2 nakomelingen van de F1 planten bevatten geen IL-60-BS-GUS. Ook in de 10 onderzochte F3 planten werd IL-60-BS-GUS niet aangetroffen, waarmee zaadoverdraagbaarheid onwaarschijnlijk lijkt. In een onderzoek van Mozes-Koch *et al.* (2012) worden de expressievectoren en virusdeeltjes na verloop van tijd echter in de gehele plant (ook buiten het floëem) aangetroffen, waaronder in pollen. Dit maakt aannemelijk dat er virale vector in bloemen en in zaadbeginsels aanwezig kunnen zijn. Omdat TYLCV bekend staat als niet mechanisch overdraagbaar, acht de COGEM het niet uitgesloten dat TYLCV afgeleide vectoren in enige mate zaadoverdraagbaar kunnen zijn.

Voor het uitzaaien van de geïnoculeerde zaden en zaailingen adviseert de COGEM een inperkingsniveau van PCM-I / PKM-I met als aanvulling dat het uitgangsmateriaal; zaden en zaailingen van *Lycopersicon spp.* en *Nicotiana spp.*, aantoonbaar vrij moet zijn van begomo- en geminivirussen. Daarnaast dienen effectieve maatregelen genomen te worden om introductie en verspreiding van witte vlieg te voorkomen. Dit is een standaard werkvoorschrift op PCM-I en PKM-I niveau. Bij de uitvoering van de werkzaamheden op de genoemde inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Melzer MJ *et al.* (2009). Tomato Yellow Leaf Curl. College of Tropical Agriculture and Human Resources. Plant disease, dec. 2009, PD-70
2. NVWA website: quarantaine(waardige) organismen. Internet: <http://www.vwa.nl/onderwerpen/werkwijze-plant/dossier/quarantaine-waardige-organismen/q-organismen> (bezocht 18 december 2013)
3. EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. Internet: [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02\(22\)_A1A2_2013.pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02(22)_A1A2_2013.pdf) (bezocht 18 december 2013)
4. Diaz-Pendon JA *et al.* (2010). Tomato yellow leaf curl viruses: ménage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Mol Plant Pathol.* 2010 Jul;11(4):441-50. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00618.x.
5. Mansour A and Al-Musa-A (1992). Tomato yellow leaf curl virus: host range and virus-vector relationships. *Plant Pathol* 41:122-125
6. Brown JK and Czosnek H (2002). Whitefly transmission of plant viruses. In RT Plumb ed, advances in botanical research, Vol. 36, Academic Press, New York, pp.65-100
7. Navot N *et al.* (1991). Tomato yellow leaf curl virus: a white fly transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology*, 185: 151-161
8. Glick E, Levy Y and Gafni Y (2009). The viral etiology of tomato yellow leaf curl disease – a review. *Plant protect. Sci.* 45(3): 81-97
9. Hanley-Bowdoin L *et al.* (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature reviews Microbiology* 11: 777-788
10. Berrie LC, Rybicki EP and Rey MEC (2001). Complete nucleotide sequence and host range of South African cassava mosaic virus; further evidence for recombinations amongst begomoviruses. *J.gen. virol.* 82:53-58
11. Morilla G *et al.* (2004). A tete a tete of Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in single nuclei. *J. Virol.* 78, 10715-10723
12. Lima ATM *et al.* (2013). Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *Journal of general virology* 94:418-413
13. Garcia-Andes S *et al.* (2007). Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365, 210-219
14. Mozes-Koch R *et al.*(2012). Expression of an entire bacterial operon in plants. *Plant Physiol* 158(4):1883-1892.
15. Peretz Y *et al.* (2007). A universal expression/silencing vector in plants. *Plant physiol* 145(4):1251-1263.
16. Kashina BD (2003). Biomolecular relationships among isolates of tomato yellow leaf curl Tanzania virus. *Phytoparasitica* 31: 188-199
17. Rojas MR *et al.* (1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* 95:105-113
18. Briddon RW *et al.* (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10:97