

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

**DATUM** 05 juni 2014  
**KENMERK** CGM/140605-01  
**ONDERWERP** Advies Inschaling van werkzaamheden met een *gene targeting* systeem voor gerichte modificatie van planten

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een wijziging van de vergunning met de titel 'Efficiënte gene targeting in planten d.m.v. inhibitie van niet-homologe recombinatie' van de Universiteit Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een zogenoemd *gene targeting* systeem om planten gericht te modificeren. De aanvrager wil constructen in de plant brengen die onder andere sequenties van het *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV) bevatten. CpCDV is een plantenvirus uit het genus *Mastrevirus* dat schade veroorzaakt aan de kikkererwt en de gewone boon. Het virus komt vooral voor in Zuid-Afrika, het Midden-Oosten en Zuid-Azië en wordt door dwergcicaden overgedragen.

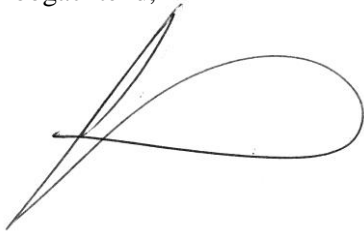
De CpCDV sequenties zorgen ervoor dat de constructen in de plant sterk worden vermeerderd. Hierdoor neemt in korte tijd de hoeveelheid DNA toe en wordt de expressie van de genen in het construct verhoogd. Dit verhoogt de kans dat een beoogd gen in het plantengenoom ingebouwd wordt. Door het ontbreken van bepaalde virale genen kan er geen infectieus virus worden gevormd en kunnen de transgene sequenties niet van cel naar cel verspreiden. De COGEM is daarom van mening dat het beschreven vectorsysteem biologisch ingeperkt is.

Er bestaat een theoretische kans op recombinatie met verwante virussen. In het uiterste geval kan een wild-type virus een transgene sequentie uit de vector opnemen, waardoor er in theorie een gemodificeerd virus ontstaat. De COGEM is daarom van mening dat het plantmateriaal vrij moet zijn van mastrevirussen.

De COGEM is van mening dat de door aanvrager beschreven handelingen op ML-I, PCM-I, PKM-I niveau plaats kunnen vinden. Bij de uitvoering van de werkzaamheden op de genoemde inperkingsniveaus en onder navolging van het aanvullende voorschrift 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,

A handwritten signature in black ink, consisting of a long, sweeping horizontal stroke that loops back to the left, with a vertical stroke intersecting it from the bottom left.

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 prof. dr. ir. R.A.A. van der Vlugt, Hoogleraar Ecologische Plantenvirologie, Wageningen Universiteit.*

# Inschaling van werkzaamheden met een *gene targeting* systeem voor gerichte modificatie van planten

## COGEM advies CGM/140605-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijziging van de vergunning (IG 03-059) van de Universiteit Leiden met de titel ‘*Efficiënte gene targeting in planten d.m.v. inhibitie van niet-homologe recombinatie*’. De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met een *gene targeting* systeem waarbij gebruik gemaakt wordt van *Rhizobium radiobacter* (voorheen *Agrobacterium tumefaciens*). Het T-DNA gedeelte van de gebruikte vectoren bevat sequenties van het *Bean yellow dwarf virus*. De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden op het laagste inperkingsniveau (ML-I, PCM-I, PKM-I) uit te mogen voeren.

### Herclassificatie *Bean yellow dwarf virus*

De aanvrager geeft aan vectoren te gebruiken met sequenties afkomstig uit *Bean yellow dwarf virus* BeYDV). Volgens het meest recente rapport van de *Geminiviridae Study Group* van de *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) wordt deze naam niet meer erkend.<sup>1</sup> Het BeYDV is geherclassificeerd tot de soort *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV).<sup>1</sup> In het vervolg van dit advies zal daarom gesproken worden van CpCDV.

### *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV)

CpCDV is een plantenvirus dat voorkomt in Zuid-Afrika, het Midden-Oosten en Zuid-Azië.<sup>2,3</sup> Het virus behoort tot het genus *Mastrevirus* in de familie *Geminiviridae*.<sup>4</sup> CpCDV infecteert alleen tweezaadlobbige (dicotyle) planten. De gastheren van het virus zijn de kikkererwt (*Cicer arietinum*) en de gewone boon (*Phaseolus vulgaris*).<sup>1</sup> Maar het virus kan ook andere planten infecteren, zoals de doornappel (*Datura stramonium*), tabak (*Nicotiana tabacum*), tomaat (*Lycopersicon esculentum*) en de zandraket (*Arabidopsis thaliana*).<sup>1,2,5</sup> Ook is er een stam geïsoleerd uit katoenplanten die aangetast zijn door het *Cotton leaf curl virus* (CLCV). Het is echter niet duidelijk of de geïsoleerde CpCDV stam een rol speelt bij de epidemiologie van de ziekte veroorzaakt door CLCV.<sup>6</sup> Symptomen van een besmetting met CpCDV zijn chlorose (geelkleuring in de nerven), dwerggroei en omkrullen van jonge bladeren.

Virussen uit het genus *Mastrevirus* worden overgebracht door verschillende soorten dwergcicaden (*Homoptera, Cicadellidae*). In de meeste gevallen is het één soort cicade die één bepaald virus overbrengt. Het is niet bekend welke cicadesoort de vector van CpCDV is.

### Genomische organisatie

Het genoom van CpCDV bestaat uit een enkelstrengs, circulair DNA genoom (ssDNA) van ongeveer 2.6 kb.<sup>2</sup> Het genoom bevat vier open leesramen, die bidirectioneel georiënteerd zijn tussen de *large intergenic region* (LIR) en de *short intergenic region* (SIR). Op de *virion sense*

streng bevinden zich de V1 en V2 leesramen die coderen voor het transporteiwit MP en het manteleiwit CP. In de tegenovergestelde oriëntatie (*complementary-sense streng*) bevinden zich de C1 en C2 open leesramen die elkaar overlappen. Deze leesramen coderen voor het *replication-associated protein* (Rep) en *replication associated protein A* (Rep A). Rep (C1:C2) wordt geproduceerd van *spliced* mRNA terwijl *unspliced* mRNA, RepA (C1) oplevert.<sup>4</sup>

Voor replicatie van CpCDV zijn de LIR en SIR sequenties en de Rep en Rep A eiwitten noodzakelijk.<sup>7</sup> Voordat het enkelstrengs genoom gerepliceerd kan worden, wordt het ssDNA eerst door gastheer DNA-polymerase in dubbelstrengs DNA (dsDNA) omgezet. Het Rep eiwit bindt aan een specifieke sequentie in de LIR van het dsDNA en maakt een knip in één van de strengen. Daarmee initieert het eiwit de zogenoemde *rolling circle* replicatie waardoor in korte tijd een grote hoeveelheid ssDNA wordt gevormd. Het ssDNA wordt ingepakt met manteleiwit waarbij virusdeeltjes ontstaan. De virusdeeltjes worden vervolgens met behulp van het transporteiwit via de plasmodesmata getransporteerd naar andere cellen.<sup>7</sup> Voor transmissie door cicaden is de vorming van virusdeeltjes noodzakelijk.

### **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft in 2013 geadviseerd over een vectorsysteem dat gebaseerd is op het *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV).<sup>8</sup> Het TYLCV behoort net als CpCDV tot de *Geminiviridae* familie maar wordt tot het genus *Begomovirus* gerekend.

### **Gene targeting**

De aanvrager is bezig met het opzetten van een systeem waarmee plantengenomen gericht gemodificeerd kunnen worden. Dit systeem wordt ook wel *gene targeting* genoemd.<sup>7</sup>

*Gene targeting* berust ten eerste op het aanbrengen van gerichte breuken in het DNA met behulp van sequentie specifieke nucleasen, zoals *Zinc-Finger* nucleasen, *Transcription Activator-Like Effector Nucleasen* (TALENs) en *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)-associated protein (Cas) system*.<sup>7</sup> En ten tweede op het inbrengen van een gen van interesse (in de literatuur een *repair construct* genoemd). De inbouw in het plantengenoom kan plaatsvinden via homologe recombinatie of non-homologe recombinatie. De aanvrager wil gebruik maken van homologe recombinatie.

Het inbrengen van voldoende DNA is een beperkende factor bij *gene targeting*. Door gebruik te maken van gemini-virale sequenties wordt deze beperkende factor opgeheven en is het systeem twee tot vier keer zo efficiënt.<sup>7</sup> In het onderhavige systeem wordt gebruik gemaakt van binaire vectoren die de LIR en SIR sequenties van CpCDV bevatten samen met de sequentie van een nuclease en een *repair construct*. Tevens wordt er een tweede vector gebruikt die de CpCDV Rep sequenties bevat. Deze vectoren worden met behulp van *R. radiobacter* in de plant gebracht.

De vectoren zullen constitutief in de plantencellen aanwezig zijn. Door aanwezigheid van de virale sequenties wordt het Ti plasmide met het in te brengen gen gerepliceerd alsof het een virusdeeltje is. Hierdoor neemt de hoeveelheid DNA in korte tijd toe en wordt de expressie van de genen verhoogd. Dit vergroot de kans op breuken in het genoom en de kans dat het beoogde gen in het plantengenoom ingebouwd wordt.

### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager wil dit *gene targeting* systeem gebruiken om specifieke genen via homologe recombinatie in plantmateriaal te brengen. In de aanvraag zijn drie verschillende vectoren beschreven:

#### *pMDC100*

In deze binaire *gateway* vector worden LIR, SIR en/of REP gekloneerd in combinatie met het gen van interesse. Dit construct bestaat volgens de aanvrager uit een deel van het *protoporphyrinogen* (PPO) gen van *A. thaliana* óf het *cruciferine* gen van *A. thaliana* gefuseerd met GFP (Cru-GFP)

#### *pNJB121*

Deze binaire vector bevat LIR, SIR en LIR sequenties waartussen het gen van interesse gekloneerd zal worden.

#### *pNJB82*

Deze binaire vector bevat de C1:C2 ORF coderend voor het Rep en RepA eiwit.

De aanvrager wil *A. thaliana*, *N. tabacum* en *N. benthamiana* planten via *floral dip* transformatie, worteltransformatie of bladponstransformatie transformeren. Daarnaast wil hij agro-infiltratie toepassen. Het is niet helder hoe de aanvrager de experimenten precies uit wil voeren. Zo wordt niet duidelijk of de constructen met de *rep* sequenties of de sequenties voor de nucleasen al in de plant aanwezig zijn of niet. Deze onduidelijkheid is echter niet van invloed op de milieurisicoanalyse.

### **Overweging**

De door aanvrager gebruikte binaire vectoren bevatten geen virale sequenties coderend voor het manteleiwit en het transporteiwit. Hierdoor kunnen er geen virusdeeltjes gevormd worden en is verspreiding via de plasmodesmata naar naastgelegen cellen of transmissie door cicaden niet mogelijk. De vectoren kunnen alleen repliceren.

#### *Complementatie*

Theoretisch gezien bestaat er een kans op complementatie wanneer verwante virussen in de plant aanwezig zijn. Hierdoor zouden bepaalde functies, zoals de vorming van manteleiwitten of transporteiwitten hersteld kunnen worden, wat kan leiden tot de verspreiding van transgene sequenties. De grootte van het genoom van geminivirussen lijkt echter aan een maximum

gebonden. Dit maximum wordt bepaald door de inpakcapaciteit van het virusdeeltje.<sup>9</sup> Aangezien geminivirussen een genoom hebben tussen de 2,5 en 3 kb, wordt gedacht dat deze capaciteit rond de 3kb ligt.<sup>10</sup> De door aanvrager gebruikte binaire vectoren zijn tussen de 11 en 13 kb groot. Wanneer ssDNA gevormd wordt, kan dit niet worden ingepakt in een virusdeeltje en verspreiden.

### *Recombinatie*

Een andere theoretische mogelijkheid is dat de aanwezige transgenen uitgewisseld worden met een wild-type Mastrevirus dat in het plantmateriaal aanwezig is. Hierdoor kan er in theorie een gg-virus ontstaan. Er bestaan volgens het meest recente rapport van de ICTV naast CpCDV nog vijf andere *Mastrevirussen*; het *Tobacco yellow dwarf virus* het *Chickpea chlorosis Australia virus*, het *Chickpea redleaf virus*, het *Chickpea yellows virus* en het *Chikpea chlorosis virus*.<sup>1</sup> Van TYDV is bekend dat het de in aanvraag genoemde dicotyle plantensoorten kan infecteren. De COGEM acht het waarschijnlijk dat dit ook voor de andere mastrevirussen geldt. Daarom is de COGEM van mening dat deze virussen niet aanwezig mogen zijn in het plantmateriaal.

Samenvattend is de COGEM van mening dat het beschreven vectorsysteem biologisch ingeperkt is en dat de door aanvrager beschreven handelingen op ML-I, PCM-I, PKM-I niveau plaats kunnen vinden, met als aanvulling dat het plantmateriaal vrij moet zijn van mastrevirussen. De afwezigheid van dwergcicaden wordt voorgeschreven door het standaard werkvoorschrift 'ongedierte mag niet aanwezig zijn' op PCM-I en PKM-I niveau. Bij de uitvoering van de werkzaamheden op de genoemde inperkingsniveaus en onder navolging van het aanvullende voorschrift, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

### **Referenties**

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://bit.ly/1rcqqid> (PDF)
2. Liu L *et al.* (1997). Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *J Gen Virol.* 78: 2113-2117.
3. Mumtaz H *et al.* (2011). Analysis of the sequence of a dicot-infecting mastrevirus (family *Geminiviridae*) originating from Syria. *Virus Genes.* 42: 422 - 428
4. King AMQ *et al.* (editors) (2012). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego, Elsevier Academic Press
5. Halley-Stott RP *et al.* (2007). The complete nucleotide sequence of a mild strain of Bean yellow dwarf virus. *Arch Virol.* 152(6): 1237-1240
6. Manzoor MT *et al.* (2014). A distinct strain of chickpea chlorotic dwarf virus (genus *Mastrevirus*, family *Geminiviridae*) identified in cotton plants affected by leaf curl disease. *Arch Virol.* 159: 1217-21
7. Baltes NJ *et al.* (2014). DNA replicons for plant genomic engineering. *The Plant Cell* 26: 151-163.
8. COGEM (2013). Werkzaamheden met een 'disarmed' TYLCV expressie systeem. COGEM advies CGM/131219-02.
9. Rojas MR *et al.* (1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* 95:105-113

10. 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