

Advies betreffende: **Moleculaire veredeling van siergewassen**

Kennisgever: **Genetwister Technologies B.V.**

COGEM kenmerk  
**CGM/010118-01**

BGGO nummer  
**GGO 99-213/1**

Datum advies  
**18 januari 2001**

## Het experiment

Kennisgever gaat de plantengenen waarvoor interesse bestaat tot expressie brengen in modelplanten middels een viraal systeem. Hiertoe worden twee virussen gebruikt te weten het TNV en STNV. Van beide virussen worden RNA transcripten gemaakt waarin het manteleiwitcistron ontbreekt. Tevens worden planten gemodificeerd met een STNV construct waarin het manteleiwitcistron ontbreekt. Daarnaast worden constructen vervaardigd waarin het replicase cistron van TNV is opgenomen en planten vervaardigd waarin dit replicase cistron tot expressie wordt gebracht. Door deze verschillende componenten van dit systeem in een plant bij elkaar te brengen wordt naar mening van de kennisgever replicatie van het STNV en TNV verkregen zonder dat er autonoom replicerende virusdeeltjes kunnen ontstaan.

## De virussen

Tabaksnecrosevirus (TNV) en zijn satelliet virus (STNV) behoren tot de *Tombusviridae* familie, genus *Necrovirus*. Verspreiding in de natuur vindt plaats via de schimmel *Olpidium* en via mechanische verspreiding. Er vindt geen verspreiding via pollen plaats. Het virus heeft een breed gastheerbereik en kan geassocieerd zijn met het satelliet tabaksnecrosevirus (STNV). Het satelliet virus is voor zijn replicatie volledig afhankelijk van TNV omdat het slechts voor zijn eigen manteleiwit codeert. Er zijn verschillende satelliet virussen bekend; de stammen STNV-1 en -2 worden beiden gerepliceerd door stam A van TNV (TNV-A). STNV-C wordt gerepliceerd door TNV-D. TNV-A en -D zijn verwante maar wel verschillende virussen. Dit is ook het geval voor STNV-1 en -2 en STNV-C.

## De inschaling en motivatie

### *Inschaling onderdeel 1 van het voorblad*

In dit onderdeel worden de handelingen beschreven met genetisch gemodificeerde planten die gemodificeerd zijn met het TNV replicase gen en een 35S-STNV cDNA construct waarin het manteleiwitgen vervangen is door een plantegen. De modificatie

met het TNV-replicase gen leidt tot expressie van dit eiwit, de modificatie met het STNV-construct leidt tot de expressie van het planteneiwit.

Wanneer planten geïnfecteerd zouden worden door wild-type TNV van buitenaf dan zal het STNV-RNA met dit virus gaan repliceren maar niet bemanteld worden. De kans dat onbemanteld STNV met het helpervirus mechanisch wordt overgedragen naar niet-transgene planten is theoretisch aanwezig, maar in de praktijk zijn geen voorbeelden bekend van onbemantelde STNV-mutanten die co-repliceren of zich verspreiden met een TNV-helpervirus. De biologische inperking is derhalve voldoende gewaarborgd. Inschaling conform artikel 6.6.1.c van de Richtlijnen op VMT-niveau geeft voldoende inperking.

### *Inschaling onderdeel 2 van het voorblad*

In dit onderdeel worden de handelingen beschreven waarbij het TNV-RNA, het STNV-RNA en het construct met het TNV replicasegen via particle gun of micro-injectie in de plant worden gebracht. Een andere optie is dat de planten gemodificeerd zijn met het TNV replicasegen en het eiwit tot expressie brengen.

#### *1) TNV-RNA construct en STNV-RNA construct*

Beide RNA's zullen repliceren met behulp van het TNV replicase gen maar er worden geen virions gevormd omdat van beide virussen de mantelproteïnen ontbreken. Aangezien het mantelproteïne niet nodig is voor cel-tot-cel transport zal de infectie zich wel kunnen verspreiden vanuit de primair geïnfecteerde cellen. Deze infectie zal mechanisch overdraagbaar zijn naar gezonde planten, maar met een lagere efficiëntie dan met wild-type virus het geval zou zijn.

#### *2) STNV-RNA construct en TNV replicase gen construct*

Zonder replicase gen zal het STNV-RNA alleen vertaald worden in de cellen waar het is ingebracht, cel-tot-cel transport is niet mogelijk. Met het replicase gen construct zal het STNV-RNA zich vermeerderen in de cellen waarin het is ingebracht. Door afwezigheid van transportproteïnen zal cel-tot-cel verspreiding niet plaatsvinden.

#### *3) STNV-RNA construct en plant die het TNV replicase gen tot expressie brengt*

Het STNV-RNA zal vertaald worden en repliceren in de cellen waar het is ingebracht. Door afwezigheid van transportproteïnen zal geen cel-tot-cel transport optreden.

Voor optie 2 en 3 gelden dezelfde overwegingen als voor onderdeel 1. Er zal replicatie-competent STNV-RNA accumuleren zonder helpervirus. Inschaling conform onderdeel 1 is hierop van toepassing.

In optie 1 accumuleert zowel replicatie-competent TNV als STNV beiden zijn niet bemanteld. Theoretisch kan deze infectie mechanisch naar andere planten overgedragen worden, er zijn echter in de praktijk geen voorbeelden van dergelijke infecties bekend. Ook bij een infectie van planten met wildtype TNV van buitenaf is de biologische inperking voldoende gewaarborgd. Inschaling conform onderdeel 1 is van toepassing.

## **Opmerkingen**

Het meest logische experiment zou naar mening van de Cogem zijn: infectie van STNV-transgene planten met TNV-RNA waaruit het manteleiwit gedeleteerd is of co-transformatie van het STNV- en TNV-replicase construct. Deze experimenten worden echter niet door de kennisgever beschreven. De risico's van dergelijke experimenten zijn vergelijkbaar met het experiment beschreven onder onderdeel 2, optie 1.

Daarnaast wijst de Cogem op het feit dat aangezien het plantpathogenen betreft de kennisgever gehouden is aan de richtlijnen van de Plantenziektkundige Dienst met betrekking tot het veilig werken met plantpathogenen.