

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 01 februari 2019
KENMERK CGM/190201-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Meloidogyne incognita* en inschaling van werkzaamheden met gg-*M. incognita*

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'PG determination of Meloidogyne Incognita' (IG 18-225_2.8-000), ingediend door Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de nematode *Meloidogyne incognita* en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *M. incognita* waarin een plasmide met een fluorescentiegen is ingebracht.

M. incognita, ook wel het 'warmteminnende wortelknobbelaaltje' genoemd, is een tropische soort die veel plantensoorten kan infecteren. *M. incognita* is een obligate parasiet van planten en vormt knobbels op de wortels, wat de wortelfunctie verstoort. De nematode komt incidenteel voor in Nederlandse kassen, en is buiten de kas niet waargenomen in Nederland. De COGEM adviseert *M. incognita* als plantpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

De COGEM acht de veiligheid voor mens en milieu afdoende gewaarborgd, indien de voorgenomen werkzaamheden met betrekking tot de constructie, het kweken, het isoleren van gg-*M. incognita* en de werkzaamheden met *M. incognita* in associatie met planten op inperkingsniveau II worden uitgevoerd. Bij de werkzaamheden worden een aantal aanvullende maatregelen geadviseerd. Deze worden in het onderhavige advies verder gespecificeerd.

Onder de genoemde voorwaarden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.



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
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van prof. dr. ing. G. Karssen van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit

Pathogeniteitsclassificatie *Meloidogyne incognita* en inschaling van werkzaamheden met gg-*M. incognita*

COGEM advies CGM/190201-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag getiteld 'PG determination of *Meloidogyne Incognita*' (IG 18-225), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Meloidogyne incognita* en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *M. incognita*. Het doel van de werkzaamheden is om een gg-*M. incognita* te genereren die een fluorescentiegen tot expressie brengt, om hiermee de interactie tussen de gastheer (de plant) en het pathogeen (de nematode) te bestuderen.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant,
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen,
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie,
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

3. *Meloidogyne*

M. incognita is een wortelknobbelaaltje en behoort tot de familie *Meloidogynidae* en het genus *Meloidogyne*. Er zijn ongeveer 100 soorten bekend.¹ *Meloidogyne* (= Grieks voor ‘appelvormig vrouwtje’) of wortelknobbelaaltjes zijn plantparasitaire nematoden met een zeer brede waardplantreeks. Aangetaste planten hebben vaak knobbel op de wortels of knollen van planten. De vorming van knobbel is afhankelijk van de *Meloidogyne* soort en de plant en zijn soms zeer klein of afwezig. Deze nematoden kunnen bijna alle hogere plantensoorten infecteren waaronder belangrijke gewassen (aardappel, wortel, tomaat).^{1,5} De knobbeltjes verstoren de wortelfunctie en remmen hierdoor de ontwikkeling van het gewas, dit leidt tot kwaliteitsverlies en veel economische schade.⁵

Wortelknobbelaaltjes kunnen worden ingedeeld in warmte- en koudemiddende soorten. In Nederland zijn de belangrijkste *Meloidogyne* soorten *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla* en *M. naasi*. *M. naasi* geeft schade bij grassen en granen. *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla* veroorzaken bij de meest algemene akkerbouwgewassen zoals aardappel, en bij dahlia en gladiool kwaliteitsverlies.² *M. chitwoodi* en *M. fallax* zijn binnen de Europese Unie aangemerkt als quarantaine organismen.³

3.1 *Levenscyclus van Meloidogyne*

De generatieduur of levenscyclus van wortelknobbelaaltjes verschilt per soort en hangt af van de bodemtemperatuur en in mindere mate van de uit de plant verkregen voedingsstoffen.⁴

Het volwassen vrouwtje legt eieren in een gelatineachtige substantie, het eipakket, aan de buitenkant van de plantenwortel. Hierdoor zijn de eieren redelijk goed beschermd tegen ongunstige omstandigheden. Het eipakket bevat gemiddeld 200-500 eieren, maar kan tot 1000 eieren bevatten. In deze eieren ontwikkelen zich de eerste-stadium juvenielen (J1). De juvenielen uit dit stadium vervellen in het ei naar tweede-stadium juvenielen (J2). Onder gunstige omstandigheden die bepaald worden door de temperatuur en vochtigheid komen de J2 uit het ei. Dit is het infectieuze mobiele stadium waarbij het organisme in de bodem op zoek gaat naar een waardplant en deze bij de worteltip binnendringt.^{1,2,4,5}

De J2 voeden zich en stimuleren de plant tot de vorming van ‘reuzencellen’ welke een permanente voedingsbron vormen voor de nematode. Het weefsel rondom de ‘reuzencellen’ zwelt op en leidt tot knobbel op de wortels.^{1,2,4,5}

Na drie vervellingen ontstaat uit een J2, via J3- en J4 stadia, een volwassen vrouwtje of mannetje. De J3 en J4 bevinden zich in de wortels en zijn immobiel. Volwassen mannetjes verkrijgen hun mobiliteit en kunnen de wortel verlaten om eventueel te paren (veel wortelknobbelaaltjes vermeerderen zich echter parthenogenetisch). Volwassen vrouwtjes blijven sedentair aanwezig in de plant.^{1,2,4,5} Deze stadia worden daarom nooit in grondmonsters aangetroffen.⁴

3.2 *M. incognita*

Het zogenaamde ‘warmteminnende wortelknobbelaaltje’ [*Meloidogyne incognita* (Kofoid&White, 1919) Chitwood, 1949] is een tropisch wortelknobbelaaltje. *M. incognita* komt wereldwijd voor in (gecultiveerde) grond in warmere en tropische gebieden.^{5,6} In Europa is *M. incognita* een oprukkende soort waarvan het verspreidingsgebied zich uitbreidt. Het wordt op akkers tot ongeveer ter hoogte van Parijs aangetroffen (pers. comm. expert).

M. incognita komt incidenteel voor in Nederlandse kassen, en is buiten de kas niet waargenomen in Nederland. De warmteminnende soort, die goed gedijt bij een temperatuur tussen de 10 en 20°C, kan een probleem vormen bij de kasteelt van biologische groenten. De nematode is pathogeen voor alle belangrijke vruchtgroentegewassen, zoals komkommer, tomaat en paprika.⁴

4. Voorgenomen werkzaamheden

De werkzaamheden die in de onderhavige vergunningaanvraag worden beschreven, kunnen verdeeld worden in vier handelingen:

1. Constructie van gg-*M. incognita*
2. Kweken van gg-*M. incognita* in gesloten kweeksystemen
3. Isoleren van de gg-eieren van gg-*M. incognita*
4. Werkzaamheden met gg-*M. incognita* in associatie met planten

In de hierop volgende paragrafen worden de werkzaamheden nader toegelicht.

4.1 Constructie van gg- *M. incognita*

De aanvrager is voornemens een genetisch gemodificeerde (gg-) *M. incognita* te genereren die een fluorescentiegen coderend voor het ‘green fluorescent protein’ (GFP) tot expressie brengt. Hiervoor worden eieren of J2 juvenielen met behulp van een ‘gene gun’ getransformeerd met een voor GFP-coderend expressieplasmide. De eieren en/of juvenielen worden gepositioneerd op een laagje agar en bedekt met folie om opspatten te voorkomen. Vervolgens worden gouddeeltjes met daarop het expressieplasmide DNA ‘afgevuurd’ op de eieren/aaltjes. De getransformeerde nematoden worden visueel geselecteerd (GFP expressie). De aanvrager is van plan de constructie van gg-*M. incognita* uit te voeren op ML-II inperkingsniveau.

4.2. Kweken gg-*M. incognita* in gesloten kweeksystemen

Na de constructie worden de gg-nematoden in gesloten kweeksystemen verder opgekweekt. Dit gebeurt op *in vitro* groeiende tomatenwortels (in petrischalen of in buisjes met agar) zoals beschreven door Van Bezooijen (2006)⁷, of in een gesloten pot met zilvezand met aardappelscheuten (ongepubliceerd protocol ILVO).

De aanvrager is voornemens deze gesloten kweeksystemen te plaatsen in een ML-II ruimte of in een PKM-II kas. De aanvrager meldt hierbij dat al het materiaal dat in aanraking is geweest met het ggo (bijv. het zilvezand met aardappelen, de gebruikte potten, etc.), wordt geïnactiveerd voordat het

wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd. Dit is conform de standaardwerkvoorschriften die gelden voor ML-II en PKM-II.

4.3 Isoleren van de gg-eieren van *gg-M. incognita*

Na het opkweken van *gg-M. incognita* in gesloten kweeksystemen (zie 4.2) en na de werkzaamheden met *gg-M. incognita* in associatie met planten (zie 4.3) is de aanvrager van plan gg-eieren te isoleren. Hiervoor is hij voornemens gebruik te maken van de ‘blender centrifuge methode’ zoals beschreven door Van Bezooijen (2006).⁷ Hierbij wordt gebruik gemaakt van het soortelijk gewicht van de gg-eieren.

Na het centrifugeren worden de gg-eieren (en gg-nematoden) verzameld door het supernatant door een zeef te passeren. De gebruikte zeven worden met heet water gespoeld (70°C), aan de lucht gedroogd en geautoclaveerd. Bij het wassen van de gg-eieren met behulp van de zeven zal een kleine hoeveelheid wasvloeistof gegenereerd worden, die zal worden opgevangen en geautoclaveerd. Om de wasvloeistof op te vangen wordt een diepe wasbak gebruikt die spetters opvangt en de vloeistof naar een vloeistofhouder geleidt.

De aanvrager is voornemens om de gg-eieren van *gg-M. incognita* op ML-II inperkingsniveau te isoleren. De aanvrager zal de werkoppervlakken desinfecteren aan het eind van de werkzaamheden en al het materiaal dat in aanraking is geweest met het ggo (bijv. wasvloeistoffen, restmateriaal van het isoleren, en zeven) inactiveren voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd. Dit is conform de standaardwerkvoorschriften die gelden voor ML-II.

4.4 Werkzaamheden met *gg-M. incognita* in associatie met planten

Na het isoleren is de aanvrager van plan werkzaamheden met *gg-M. incognita* in associatie met planten uit te voeren. De gg-eieren worden verspreid in grond die in ‘trays’ of potten is aangebracht. Onder de ‘trays’ en potten staat een lekbak. Na het aanbrengen van de gg-eieren worden deze met een schoon laagje grond afgedekt, waarop vervolgens zaadjes worden gezaaid of waarin planten worden verspeend. De gg-nematoden die zich vervolgens ontwikkelen, zullen de planten via de wortels infecteren. In de acht weken daarna zullen regelmatig monsters afgenomen worden voor microscopische analyses, of worden opnieuw gg-eieren geïsoleerd om de *gg-M. incognita* lijn in stand te houden.

Indien er opnieuw gg-eieren worden geïsoleerd (volgens de methode zoals beschreven onder 4.3), wordt de aanhangende grond zoveel mogelijk van de wortels afgeklopt, waarna er met een broes de laatste rest grond boven een dichte ‘tray’ afgespoeld wordt met een minimale hoeveelheid water. Volgens de aanvrager zullen waterspeters die buiten de bak landen, geen gg-eieren bevatten omdat deze stevig vast zitten in de gelei van het eipakket.

De aanvrager is voornemens de werkzaamheden met *gg-M. incognita* in associatie met planten uit te voeren in een PKM-II kas. De aanvrager zal de werkoppervlakken desinfecteren aan het eind van de werkzaamheden en al het materiaal dat in aanraking is geweest met het ggo (bijv. water, grond, ‘trays’ en plantenmateriaal) inactiveren voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd. Dit is

conform de standaardwerkvoorschriften die gelden voor PKM-II. De aanvrager geeft aan dat vloeistofvolumes die te groot zijn om te autoclavieren binnen de kas zullen worden ingedampt, hierbij zal gebruik worden gemaakt van wegwerptrays.

Om uitsleep van gg-*M. incognita* via aanhangende grond te voorkomen is de aanvrager voornemens, bij de bovengenoemde werkzaamheden, de volgende aanvullende maatregelen en werkvoorschriften te hanteren:

- De plantentray of pot staat in een waterdichte bak en de planten krijgen water via de bak om opspattende grond te vermijden;
- Tijdens de werkzaamheden worden overschoenen gedragen.

Met betrekking tot het dragen van overschoenen merkt de aanvrager op dat dit een standaardmaatregel is bij het werken met risicovolle nematoden (bijvoorbeeld quarantaine nematoden).

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over plantpathogene parasieten. Wel heeft zij een aantal humaan- en dierpathogene parasieten geïdentificeerd.⁸

6. Overweging en advies

6.1 Classificatie *M. incognita*

Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend die *M. incognita* relateren aan pathogeniteit voor mens of dier. Gezien zijn leefwijze acht de COGEM het ook niet aannemelijk dat dit wortelknobbelaaltje pathogeen is voor mens of dier. *M. incognita* is een obligate plantenparasiet die schade veroorzaakt bij waardplanten door knobbelvorming op de wortels wat de wortelfunctie verstoort. Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM *M. incognita* als plantpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

6.2 Inschaling werkzaamheden

Bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onder 'Ingeperkt Gebruik' dienen maatregelen genomen te worden ten einde ontsnapping naar het milieu te voorkomen. Deze maatregelen worden bepaald door de aard van het gebruikte organisme en de inrichtings- en werkvoorschriften behorende bij het inperkingsniveau van de werkruimte.

In de gg-*M. incognita* is een plasmide ingebracht die een fluorescentiegen (GFP) tot expressie brengt. De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat deze genetische modificatie van invloed is op de pathogeniteit, de groei en vermenigvuldiging, en de wijze van verspreiding van deze nematode.

Conform een indeling van *M. incognita* in pathogeniteitsklasse 2 adviseert de COGEM de werkzaamheden met betrekking tot de constructie en het isoleren van gg-*M. incognita* op ML-II, het kweken van gg-*M. incognita* op ML-II of PKM-II, en de werkzaamheden met gg-*M. incognita* in associatie met planten op PKM-II in te schalen.

Volgens de aanvrager heeft *M. incognita* geen mechanismen om droogte te overleven en kan het niet overleven in opdrogende vloeistofdruppels, uitgedroogde grond en/of plantendelen.

De COGEM is het eens met de aanvrager dat tweede-stadium juvenielen binnen enkele minuten sterven na verdamping van een waterige oplossing. Eieren, en met name eieren in een eipakket, zijn echter minder gevoelig voor uitdroging. Zo is waargenomen dat na verdamping eieren van *M. incognita* tot 40 minuten kunnen overleven, en tot maximaal 2 weken in droge grond en gedroogd plantenmateriaal (pers. comm. expert). Alle stadia van *M. incognita* gaan bij 60°C binnen enkele minuten dood (pers. comm. expert).

Tijdens de voorgenomen werkzaamheden kan materiaal (zeven, plantenmateriaal, grond, wasvloeistoffen, analysemonsters voor microscopie, water, etc.) besmet raken met de nematoden, eieren of eipakketten van gg-*M. incognita*.

Conform de inrichtingseisen en werkvoorschriften voor ML-II en PKM-II die voorgeschreven zijn in de Regeling ggo, moet materiaal dat in aanraking is geweest met gg-*M. incognita* worden geïnactiveerd voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd.⁹ Geschikte methoden om materialen die in aanraking zijn geweest met het ggo te inactiveren zijn bijvoorbeeld autoclaving of verhitting boven de 60°C. Indien het vloeistofvolume te groot is om te autoclaven, kan deze eerst deels worden verdampt. Hierna kan de resterende vloeistof en de werkweptray waarin de vloeistof heeft gezeten worden verhit of geautoclaveerd.

Conform de inrichtingseisen en werkvoorschriften voor ML-II en PKM-II die voorgeschreven zijn in de Regeling ggo moeten werkoppervlakken direct na besmetting worden gedesinfecteerd, en aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag.⁹ Geschikte middelen die gebruikt kunnen worden om oppervlakken die besmet zijn met het ggo te desinfecteren zijn bijvoorbeeld chloor of 70% alcohol (pers. comm. expert).

Ook moet er rekening gehouden worden met het feit dat de nematoden, de eieren en eipakketten van *M. incognita* erg klein en lastig te zien zijn. Hierdoor bestaat de mogelijkheid dat gg-*M. incognita* ongezien wordt meegenomen uit de werkruimte, bijvoorbeeld doordat de medewerker gg-eieren onder de nagels heeft of besmette grond onder de schoenen. Om mogelijke uitsleep van gg-*M. incognita* naar het milieu te voorkomen, adviseert de COGEM bij werkzaamheden met gg-*M. incognita* aanvullende werkvoorschriften te hanteren.

De COGEM adviseert bij werkzaamheden met gg-*M. incognita* het volgende aanvullende voorschrift te hanteren:

- Tijdens werkzaamheden worden handschoenen gedragen.

Daarnaast adviseert de COGEM bij werkzaamheden met gg-*M. incognita* in associatie met planten, de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- De plantentray of pot staat in een waterdichte bak en de planten krijgen water via de bak;
- Tijdens de werkzaamheden worden overschoenen gedragen.

De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de werkzaamheden op de hierboven genoemde inperkingsniveaus en met inachtneming van de vermelde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd.

Referenties

1. Elling AA (2013). Major Emerging Problems with Minor *Meloidogyne* Species. *Phytopathology*. 103: 1092-1102
2. Wageningen University & Research. *Meloidogyne* spp. (wortelknobbelaaltjes). [http://www.aaltjesschema.nl/Basiskennis/Soortenaaltjes/Meloidogynespp\(wortelknobbelaaltjes\).aspx](http://www.aaltjesschema.nl/Basiskennis/Soortenaaltjes/Meloidogynespp(wortelknobbelaaltjes).aspx) (bezocht: 25 januari 2019)
3. Richtlijn 2000/29/EG van de Raad van 8 mei 2000 betreffende de beschermende maatregelen tegen het binnenbrengen en de verspreiding in de Gemeenschap van voor planten en voor plantaardige producten schadelijke organismen <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2000L0029:20090303:NL:PDF> (bezocht: 25 januari 2019)
4. Van der Wurff AWG *et al.* (2010). Biologische beheersing van wortelknobbelaaltjes in de biologische teelt van groenten en bloemen onder glas : stand van kennis: verslag van onderzoek over de periode 2005 tot 2010. Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk.
5. Nematoden.be. Definitie – *Meloidogyne*. <http://www.nematoden.be/nl/definitie/definitie-meloidogyne/> (bezocht: 23 januari 2019)
6. Trudgill DL Blok VC (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 53-77
7. Van Bezooijen J (2006). *Methods and Techniques for Nematology*. Wageningen University
8. COGEM advies (2012). Classificatie humaan- en dierpathogene parasieten. CGM/120127-01
9. Regeling genetisch gemodificeerde organismen (GGO) milieubeheer (2013) https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-01-01/#Hoofdstuk2_Afdeling2.1_Artikel6 (bezocht: 25 januari 2019)