

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. B. Visser
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 20 september 2021
KENMERK CGM/210920-01
ONDERWERP Advies planten met plantvirale constructen in combinatie met insecten

Geachte mevrouw Visser,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag (IG 21-126_2.8-000) met de titel 'Plantvirale vectoren in combinatie met insecten of nematoden', ingediend door de Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

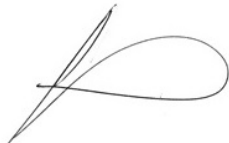
Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag, betreffende werkzaamheden met planten en insecten. In de planten wordt via genetische modificatie technieken een wildtype plantenvirus geproduceerd. De planten bevatten één van drie soorten plantenvirussen: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Voor de aangevraagde werkzaamheden worden op de plantenbladeren (niet-gemodificeerde) insecten gezet: Tabakswittevlieg (*Bemisia tabaci*), bladluis (*Aphidoidea*) óf trips (*Thrips*). Deze plaaginsecten zijn bekende verspreiders van de betreffende plantenvirussen. De werkzaamheden zullen plaatsvinden in een insectenkooi, in een laboratorium op inperkingsniveau II (ML-II). De insecten worden op een plantenblad geplaatst, dat wordt omhuld door een nylon zakje dat is afgedicht met spons. De insecten worden na 48 uur van het blad gehaald en afgedood door bevriezing. Na afloop van het experiment worden de planten dubbel verpakt en vernietigd. Eventueel achtergebleven insecten in de insectenkooi worden weggevangen met insectenvallen.

De insecten hebben zeer gevarieerde eigenschappen en afmetingen. De COGEM is van oordeel dat er aanvullende maatregelen genomen moeten worden omdat bij het vernietigen van de virus-bevattende planten na afloop van het experiment rekening gehouden dient te worden met de aanwezigheid van achtergebleven eieren, larven en insecten op de plant, in de insectenkooi of de klimaatkamer. De COGEM is van oordeel dat bij de uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met de virus-bevattende planten en insecten, op inperkingsniveau ML-II, met inbegrip van aanvullende voorschriften, 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. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
 DG Milieu en Internationaal

*Dit advies is mede tot stand gekomen met de inbreng van dhr. T. Bukovinszki,
entomologisch deskundige bij de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit.*

*Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet
betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

Werkzaamheden met planten met plantvirale constructen in combinatie met insecten

COGEM advies CGM/210920-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag van de Wageningen Universiteit (IG 21-126). De vergunningaanvraag betreft werkzaamheden met planten waarbij d.m.v. inoculatie met *Agrobacterium tumefaciens* de genomsequenties van plantenvirussen tot expressie worden gebracht. Vervolgens worden er insecten die als vector kunnen optreden op de planten geplaatst. De COGEM is gevraagd te adviseren over de benodigde inperkingsmaatregelen bij de experimenten zoals beschreven in de aanvraag. In de aanvraag is geen gedetailleerde informatie overlegd over de gebruikte virale constructen en de wijze waarop de agro-inoculatie wordt uitgevoerd.

2. Organismen en plantvirussen betrokken bij de werkzaamheden

Bij de voorgenomen werkzaamheden zijn verschillende organismen betrokken. In *Nicotiana benthamiana* of *Solanum lycopersicum* (Tomaat) planten zullen met behulp van *Agrobacterium tumefaciens* de virale genomsequentie tot expressie gebracht worden van het *Cucumber mosaic virus* (CMV), Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) óf het Tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV). Op de planten worden vervolgens *Bemisia tabaci* (Tabakswittevlieg), insecten behorende tot de *Aphidoidea* (Bladluis) óf *Thrips* (Trips) geplaatst. In de aanvraag zijn de bladluis en trips niet op soortsniveau gespecificeerd.

2.1 Biologie van plantenvirussen

2.1.1 *Cucumber mosaic virus*

CMV (familie *Bromoviridae*, genus *Cucumovirus*) is een plantenvirus en als zodanig ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹ CMV is een positief enkelstrengs RNA virus en heeft een brede waardplantenreeks, waaronder sierteeltgewassen en voedselgewassen.² De bekendste symptomen van CMV-infectie zijn het ontstaan van lichtgroene tot gele, en soms necrotische, kringen en vlekken op de bladeren.² CMV wordt verspreid door insecten, voornamelijk bladluizen, maar kan ook overgedragen worden via het plantenzaad en plantensap.^{3,4}

2.1.2 *Tomato yellow leaf curl virus*

TYLCV (familie *Geminiviridae*, genus *Begomovirus*) is een plantenvirus en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Naast TYLCV zijn er nog twaalf TYLCV-achtige virussen, die alle dezelfde ziekte veroorzaken: 'tomato yellow leaf curl disease' waarbij de plantenbladeren typerend krullen en vergelen.⁵ TYLCV is een enkelstrengs circulair DNA virus dat voornamelijk tomatenplanten infecteert en wordt overgedragen door Tabakswittevlieg.^{6,7} Het is onduidelijk of het virus zich kan repliceren in zijn insect-vector: studies die tot op heden zijn verschenen, lijken elkaar tegen te spreken.⁷ Het virus komt voor in de Middellandse regio's van Europa en is in Nederland één keer aangetroffen in 2007.^{8,9}

De 'European and Mediterranean Plant Protection Organization' (EPPO) adviseert om TYLCV als quarantaine-virus te beschouwen.¹⁰ De Europese Unie categoriseert het virus als een 'regulated non-quarantine pest' (RNQP), aangezien het virus al aanwezig is het een deel van de EU, waarbij wel maatregelen zijn ingesteld om diens verspreiding in te perken.¹¹

2.1.3 *Tomato spotted wilt orthospovirus*

TSWV (familie: *Tospoviridae*, genus: *Orthospovirus*) is eveneens een plantenvirus en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. TSWV is een negatief enkelstrengs RNA virus. Voor dit plantenvirus zijn meer dan 1000 planten beschreven als gastheer, waaronder voedselgewassen zoals tomaat. Het virus wordt verspreid door een aantal trips-soorten.¹² In tegenstelling tot de meeste andere plantenvirussen, kan TSWV repliceren in zijn insect-vector, de trips.¹³ TSWV-infectie wordt gekenmerkt door groeiremming en necrose, al kunnen de symptomen per gewas uiteenlopen.¹⁴ Ook dit virus wordt aangemerkt als quarantaine-plaag door de EPPO en is door de EU gecategoriseerd als RNQP.¹⁵

2.2 *Biologie van plaaginsecten*

2.2.1 *Bemisia tabaci*

B. tabaci (Tabakswittevlieg) komt voor op een groot aantal kruidachtige planten en gewassen zoals komkommer, tomaat en aubergine.^{16,17} De Tabakswittevlieg komt sinds 1987 voor in de Nederlandse kassen en kan meer dan 100 virussen verspreiden waaronder TYLCV.¹⁸ De Tabakswittevlieg voedt zich op het floëem van de plant.²¹ De ontwikkelingssnelheid en levensduur van de insecten hangt af van de temperatuur en het gewas waarop ze zich bevinden.^{19,20} De ontwikkeling van ei tot volwassen stadium duurt bij 28°C ongeveer twee weken, maar kan oplopen tot twee maanden bij 16°C.^{20,21} De Tabakswittevlieg zet zijn eieren af aan de onderkant van het blad.¹⁶ De eieren zijn bolvormig, 0,2 mm groot en komen bij 25°C na ongeveer 7 dagen uit.¹⁹ De Tabakswittevlieg kent vier larvale stadia: het eerste larvale stadium kan zich verplaatsen, de latere stadia zitten vast aan het blad.¹⁶ In het vierde larvale stadium ontwikkelt de larve zich tot een ronde pop van circa 0,7 mm.¹⁶ Het volwassen insect is 1 mm groot en heeft zijn vleugels verticaal (parallel) langs het lichaam staan.¹⁶ De volwassen insecten leven ongeveer één tot twee weken bij 30°C, afhankelijk van het gewas waarop het insect zich bevindt.

2.2.2 *Aphidoidea*

Insecten behorend tot de superfamilie *Aphidoidea* worden ook wel bladluizen genoemd. Alleen al in Nederland komen ongeveer 600 soorten bladluizen voor, die allemaal tot de familie *Aphididea* gerekend worden.²² Volwassen bladluizen zijn 1,5 tot 4 mm lang en voeden op het floëem van de plant.²³ De ontwikkelingssnelheid en levensduur van bladluizen is eveneens afhankelijk van de temperatuur en de waardplant. Bladluizen kunnen zich ongeslachtelijk voortplanten, waarbij de insecten geen eieren leggen, maar levende jongen baren.²⁴ Bladluizen planten zichzelf in korte tijd in grote getale voort. Veel soorten kunnen zich daarnaast ook geslachtelijk voortplanten, dit vindt plaats ter overwintering.²⁴ In de warme maanden of in een warme kas zullen bladluizen zich ongeslachtelijk voortplanten. Bladluizen zijn meestal ongevleugeld, maar bij ongunstige omstandigheden, bijvoorbeeld bij een hoge populatiedichtheid ('crowding') of later in het groeiseizoen, ontwikkelen zich gevleugelde individuen die op zoek gaan naar een nieuwe waardplant.^{25,26}

2.2.3 Thrips

Thrips (tripsen) zijn kleine gevleugelde insecten. In Nederland komt regelmatig de *Thrips tabaci* (Tabakstrips) voor, maar in de Nederlandse kassen wordt bijvoorbeeld ook de tropische tripssoort *Thrips parvispinus* (pepertrips) aangetroffen.^{27,28} Volwassen tripsen zijn zeer klein: van 0,8 tot 1,2 mm lang.²⁹ Tripsen tasten het plantenweefsel direct aan door de plantencellen leeg te zuigen, en kunnen ook als vector voor verschillende plantenvirussen optreden. Tripsen leggen eieren en kennen twee larvenstadia, twee popstadia en een gevleugeld adult stadium. De levensduur van de tripsen is temperatuur- en soortafhankelijk. De levensduur van *T. tabaci* tripsen zou bijvoorbeeld ongeveer 27 dagen bij 20°C bedragen, en 17 dagen bij 25°C.³⁰ Tripsen leggen eieren in plantenweefsel. De eieren van *T. tabaci* kunnen bij 25°C al na ongeveer 2,8 dagen uitkomen, wanneer deze zich op komkommerplanten bevinden.³¹ De larven gaan vervolgens het pre-pop stadium in, gevolgd door een stadium als pop. De (pre)poppen van sommige tripsensoorten, waaronder *T. tabaci*, komen vaak in de grond terecht.³²

3. Voorgenomen werkzaamheden

3.1 Productie van planten met plantvirale constructen

De aanvrager is voornemens om via agro-inoculatie wildtype virale genoomsequenties in planten tot expressie te brengen, teneinde plantvirale infecties te bewerkstelligen. Hiertoe worden constructen die wildtype genoomsequenties van plantenvirussen bevatten m.b.v. *A. tumefaciens* in *N. benthamiana* en *S. lycopersicum* (Tomaat) ingebracht. Bij deze experimenten zullen de volledige (wildtype) sequenties van drie verschillende soorten plantvirussen worden gebruikt: CMV, TYLCV en TSWV. Door de inoculatie met gg-*A. tumefaciens* zullen de virale sequenties tot expressie komen in plantencellen en de planten verder door de virussen geïnfecteerd worden. De geproduceerde virussen zullen gelijk zijn aan de betreffende wildtype virussen.

3.2 Incubatie van de virus-bevattende planten met insecten

Na 1 tot 2 weken na de inoculatie met gg-*A. tumefaciens*, worden er niet-gemodificeerde insecten van één van de volgende soorten op de planten geplaatst: Tabakswittevliegen, bladluizen en tripsen. De opgepote planten worden hiervoor in een insectenkooi geplaatst, die zich bevindt in een kleine klimaatkamer, in een ML-II laboratorium. In de klimaatkamer zullen gedurende het experiment insectenvallen aanwezig zijn. De plantenbladeren worden omhuld met een nylon zakje. Het nylon zakje is aan de “onderkant”, bij de stengel van de plant, vastgemaakt en afgesloten met behulp van een stukje spons wat wordt vastgebonden met draad. Het andere uiteinde van het nylon zakje, de “bovenkant”, is open om insecten op het blad te kunnen zetten. Bij het dichtmaken van de zakjes wordt ook aan de bovenkant een stukje spons met draad gebruikt.

Volgens de aanvrager zal er uitsluitend gebruik gemaakt worden van virusvrije en volwassen insecten. De insecten worden geïmmobiliseerd door ze 15 minuten op ijs te zetten, waarna het buisje met de insecten via ‘sleeves’ in de insectenkooi met de planten wordt gebracht en de insecten vervolgens op een met een nylon zakje omhuld blad worden geplaatst. Na het overbrengen van de geïmmobiliseerde insecten wordt ook de “bovenkant” van het nylon zakje afgesloten. De insecten blijven maximaal 48 uur op het blad.

3.3 Verzamelen van insecten en blad na incubatie

Na afloop van de incubatietijd op het blad worden de insecten verzameld door het openen van de “bovenkant” van het nylonzakje. De insecten worden in een buisje opgevangen of m.b.v. een borsteltje of ‘insectenverzamelapparaat’ (aspirator) verzameld. De buisjes worden in ziploc-zakken geplaatst en voor 15 minuten op ijs gezet, om de insecten te immobiliseren, en de insecten worden vervolgens afgedood door de busjes gedurende een periode van minstens 24 uur in een -80°C vriezer te plaatsen. Vervolgens worden de dode insecten vermalen in vloeibare stikstof voor verdere verwerking, zoals bijvoorbeeld RNA extractie. De bladeren waarop de insecten zich bevonden, wordt binnen de kooi via de ‘sleeves’ afgeknipt en in een afsluitbare buis gedaan. De buis met de bladeren wordt buiten de kooi meteen in vloeibare stikstof ingevroren en in een -80°C vriezer bewaard tot verdere verwerking en analyse.

3.4 Het insectvrij maken en vernietigen van virus-bevattende planten

De experimenten in het ML-II laboratorium, met de insectenkooien in de kleine klimaatkamers, zullen niet langer dan een week duren. Er wordt gerekend vanaf het moment dat de planten in de insectenkooi worden geplaatst (voor aanvang van het experiment) tot het moment dat de planten worden vernietigd (na afloop van het experiment). Er zullen uitsluitend volwassen insecten op de planten worden geplaatst, die daar voor 48 uur verblijven. Nadat het experiment is afgelopen en alle insecten zijn verzameld, worden insectenvallen in de insectenkooien met de planten geplaatst. De insectenkooien met insectenvallen zullen 1 tot 2 dagen in de klimaatkamers blijven staan om eventueel achtergebleven insecten te vangen. Vervolgens worden de planten dubbel verpakt, verzegeld en als ggo-afval vernietigd.

5. Eerder COGEM advies

In 2013 heeft de COGEM onderzoek laten uitvoeren naar de mogelijkheden voor inperkingsmaatregelen bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde geleedpotigen (o.a. insecten).³³ De COGEM heeft naar aanleiding van dit onderzoeksrapport een basis-set van maatregelen opgesteld als uitgangspunt voor inperking van gg-geleedpotigen.³⁴ Daarnaast heeft de COGEM een lijst met overwegingen opgesteld, gebaseerd op de gevarieerde eigenschappen van verschillende geleedpotigen, die gebruikt kan worden om de inperkingsmaatregelen uit te breiden of eventueel te versoberen.³⁴ De COGEM heeft daarbij er op gewezen dat bij het inperken van kleine geleedpotigen (o.a. trips en luizen) de maaswijdte van het gebruikte gaas en verplaatsing door luchtstromen extra aandacht vereist.

6. Overweging

6.1 Plantenvirussen en agro-inoculatie

Bij de aangevraagde werkzaamheden worden planten gebruikt waarin wildtype genomesequenties van plantenvirussen tot expressie gebracht door plantvirale constructen die m.b.v. *gg-A. tumefaciens* in de planten zijn aangebracht. Bij de aanvraag is echter geen gedetailleerde informatie overlegd over de virale constructen. De COGEM merkt op dat indien er gebruik wordt gemaakt van enkel wildtype genomesequenties, de plant-geproduceerde virussen gelijk zullen zijn aan de wildtype virussen.

Derhalve zullen risico's voor mens en milieu bij werkzaamheden met deze gg-geproduceerde virussen gelijk zijn aan eventuele risico's bij werkzaamheden met de wildtype pathogene plantenvirussen.

Na 1 tot 2 weken na inoculatie met gg-*A. tumefaciens* zullen er insecten op de plant worden geplaatst. Resterend gg-*A. tumefaciens* dat na deze periode eventueel nog aanwezig is in de plant zou mogelijk in contact kunnen komen met de insecten. Verspreiding van *A. tumefaciens* via insecten is mogelijk.³⁵ De COGEM merkt op dat de inperkingsmaatregelen die noodzakelijk zijn om te voorkomen dat de door middel van Agro-inoculatie geproduceerde virussen zich verspreiden ook de eventuele uitsleep van de *A. tumefaciens* zullen voorkomen.

6.2 Eigenschappen van de insecten

Bij de aangevraagde proeven wordt gebruik gemaakt van drie soorten kleine en mobiele insecten die plantenvirussen kunnen overdragen. In de proeven zal alleen gebruik gemaakt worden van adulte insecten, en zij kunnen zich in zeer korte tijd voorplanten. De ontwikkelingstijd van de insecten is afhankelijk van de insectensoort, de temperatuur en de plant waarop zij zich bevinden. Volwassen bladluizen kunnen zich onmiddellijk vermeerderen op de waardplant. Tabakswittevliegen en tripsen zullen eieren leggen. De eieren van de Tabakswittevlieg komen bij 25°C na ongeveer 7 dagen uit, bij tripsen duurt dit nog geen drie dagen.^{19,24} Bij hogere temperaturen (tot circa 35°C) zullen de eieren sneller uitkomen.

Gezien het bovenstaande, acht de COGEM het zeer waarschijnlijk dat er insecteneieren op en in de planten aanwezig zullen zijn. Tevens zullen er zeer waarschijnlijk bladluislarven aanwezig zijn, al zullen deze goed zichtbaar zijn op de planten. Ook kan er niet volledig uitgesloten worden dat trips-eieren zullen uitkomen tijdens de werkzaamheden, die ongeveer vier dagen duren: het 48-urige experiment met de 2 dagen alvorens de planten worden vernietigd. Waarschijnlijk zal dit te kort zijn om een volledige ontwikkeling naar de volgende generatie te laten plaatsvinden. De kans op uitkomen van de eieren van de Tabakswittevlieg is verwaarloosbaar klein. Gezien het bovenstaande moet rekening gehouden worden met de aanwezigheid van zowel eieren, poppen, larven als adulte insecten, gedurende de experimenten en bij het vernietigen van het plantenmateriaal.

6.3 Insectengaas

Bij de aangevraagde werkzaamheden worden in een insectenkooi, insecten op een plantenblad gezet dat omsloten wordt door een nylon zakje dat is afgesloten met een stuk spons en draad. De maaswijdtes van het gaas van de insectenkooi en van het nylon zakje zijn hierbij niet gespecificeerd. Van de drie insectensoorten is de trips het kleinste, waarbij tripsen van het adulte stadium niet groter zijn dan 1 mm.³⁰ Pasgeboren tripsen kunnen echter een grootte hebben van ongeveer 100 µm.³²

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het ontsnappen van de insecten uit de huidige proefopstelling beperkt kan worden door gebruik te maken van maaswijdtes die geschikt zijn voor het betreffende insect. Zo zal voor experimenten met tripsen gebruik gemaakt moeten worden van gaas met een maasgrootte van 80 µm of kleiner. Tevens dient het te gebruiken sponsmateriaal voldoende afgedicht te zijn voor werkzaamheden met de verschillende insectensoorten.

6.4 Insectenvallen

De aangevraagde werkzaamheden met de planten en insecten zullen plaatsvinden m.b.v. nylon zakjes om de plantenbladeren, in een insectenkooi, in een kleine klimaatkamer, in ML-II laboratorium. De aanvrager geeft aan dat er gedurende het experiment insectenvallen aanwezig zullen zijn in de klimaatkamer. De COGEM heeft eerder geadviseerd om werkzaamheden met gg-geleedpotigen in een verblijf te laten plaatsvinden waarbij de werkruimte een sluis heeft.³⁴ Daarbij achtte de COGEM het noodzakelijk dat zowel in de werkruimte als in de sluis vallen geplaatst worden. De COGEM acht de inperking van de proefopstelling met een insectenkooi, in een klimaatkamer, in een ML-II laboratorium vergelijkbaar met die van de eerder geadviseerde werkruimte met sluis, maar zij is van oordeel dat naast de voorgestelde insectenvallen in de klimaatkamer ook vallen in het ML-II laboratorium geplaatst dienen te worden.

Bij het plaatsen van insectenvallen dient er mee rekening gehouden te worden dat verschillende typen vangplaten aantrekkelijk zijn voor verschillende insecten: gele vangplaten voor de wittevlies en gevleugelde bladluis, en blauwe vangplaten voor diverse tripsensoorten. Opgehangen vangplaten werken alleen voor gevleugelde insecten. De COGEM is van oordeel dat de insectenkooi omgeven moet worden door één of een aantal plakvellen, als aanvulling op de opgehangen vangplaten in het ML-II laboratorium en de klimaatkamer. Hierdoor kunnen lopende insecten worden gevangen.

6.5 Het afdoden van de insecten

De vergunningaanvrager heeft aangegeven in deze experimenten de adulte insecten, die vanaf het blad worden verzameld, af te doden door bevriezing bij -80°C voor minimaal 24 uur. De COGEM is van oordeel dat deze methode voldoende is voor het doden van de insecten. Het bladmateriaal waarop de insecten zich bevonden wordt eveneens verzameld, in vloeibare stikstof ingevroren en bij -80°C bewaard. De COGEM is van oordeel dat, gezien er mogelijk eieren, larven of insecten op de bladeren aanwezig kunnen zijn, de bladeren op eenzelfde manier behandeld moeten worden: de buisjes met materiaal moeten in een zip-loc zakje, 15 minuten op ijs, gevolgd door bevriezing bij voor minimaal 24 uur.

6.6 Het insectvrij maken en vernietigen van de virus-bevattende planten

Na het verzamelen van de insecten van de plantenbladeren en het afknippen van de desbetreffende bladeren, zullen insectenvallen in de insectenkooien geplaatst worden. De planten blijven nog één tot twee dagen in de kooien met insectenvallen staan, om insecten weg te vangen die mogelijk buiten de met-nylon zakjes-omhulde bladeren terecht zijn gekomen.

Zoals eerder opgemerkt, zullen er zeer waarschijnlijk nog insecten, maar ook eieren en larven op de planten aanwezig zijn bij de beëindiging van het experiment. De COGEM merkt op dat door het plaatsen van insectenvallen mogelijk niet alle aanwezige insecten weggevangen zullen worden. Een herbivoor insect zal enkel op de insectenval terecht komen als deze de plant afwijst, en bewust op zoek gaat naar een nieuwe waardplant.³² Daarbij kunnen er (pre)poppen van tripsensoorten in de grond terecht zijn gekomen. De COGEM is van oordeel dat de plant samen met de potgrond dubbel ingepakt en afgesloten dient te worden, alvorens het vernietigd wordt. Hierbij dient de plant direct vernietigd te worden, om het uitkomen van eieren en het verder ontwikkelen van larven voor te zijn.

Het kan niet volledig worden uitgesloten dat na het verwijderen van de virus-bevattende plant, insecten (volwassenen, larven of eieren) in de insectenkooi kunnen achterblijven. Eventueel in de kooi achtergebleven insecten dienen gedood te worden, bijvoorbeeld door de kooi gesloten onder te dompelen in heet water of de kooi in een vriezer te zetten voor enkele dagen (-20°C of kouder). De COGEM merkt verder op dat niet uitgesloten kan worden dat er ook insecten terecht komen in de klimaatkamer, derhalve zal de gehele klimaatkamer waarin de insectenkooi zich bevindt, behandeld moeten worden om eventuele insecten te doden. Dit kan bijvoorbeeld door de klimaatkamer op een hoge temperatuur te zetten (45°C of warmer) met een zo laag mogelijke relatieve luchtvochtigheid en met plakvallen erin voor 3-4 dagen, of door de afgesloten klimaatkamer gedurende langere tijd na het experiment niet te gebruiken waardoor de achtergebleven insecten door voedselgebrek zullen afsterven.

7. Advies

7.1 Inperkingsniveau en aanvullende voorschriften

Gezien het bovenstaande, stemt de COGEM in met de inschaling van de voorgenomen werkzaamheden met de virus-bevattende planten in combinatie met insecten, op inperkingsniveau ML-II. Daarbij dienen de volgende aanvullende voorschriften te worden gehanteerd:

- De planten worden gehuisvest in insectenkooien in een kweekkast die geplaatst is in de van toepassing zijnde categorie van fysieke inperking ML-II;
- De insectenkooi heeft gaas met een maaswijdte die geschikt is voor het betreffende insect;
- De planten komen niet tot bloei;
- Het water geven gebeurt voorzichtig, waarbij de bovengrondse plantendelen zo min mogelijk worden beroerd;
- De opgepote planten staan in plastic bakken waarin run-off water wordt opgevangen. Na gebruik wordt de inhoud van de bakken gesteriliseerd en de bakken ontsmet;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- De handelingen worden uitgevoerd in een insectenkooi met sleeves. Het gaas van de insectenkooi dient geschikt te zijn om het betreffende insect tegen te houden;
- In de kweekkast en in de ML-II ruimte zijn voor *Bemisia tabaci*, *Aphidoidea* of *Thrips* geschikte vallen aangebracht;
- De insectenkooi dient omgeven te worden door één of een aantal plakvellen;
- Afgesloten buizen met *Bemisia tabaci*, *Aphidoidea* of *Thrips*, die zijn blootgesteld aan de virus-bevattende planten, mogen alleen geopend worden indien de insecten geïmmobiliseerd zijn met een gevalideerde methode;
- Bladeren van de planten worden ingehuld met een nylon zakje, waarna insecten op de planten worden geplaatst en het zakje verzegeld wordt zoals beschreven in de aanvraag; de zakjes dienen een maasgrootte te hebben die geschikt is voor het betreffende insect;
- De insecten worden op het einde van het experiment gedood door deze minimaal 24 uur te bevriezen bij -80°C;
- Het verzamelde bladmateriaal wordt voor minimaal 24 uur bevroren bij -80°C;

- Na het verzamelen van de insecten worden gedurende 2 dagen voor *Bemisia tabaci*, *Aphidoidea* of *Thrips* geschikte vallen in de insectenkooi aangebracht alvorens de planten als ggo-afval afgevoerd worden.
- Na afloop van de proef dienen zowel de boven- als de ondergrondse plantendelen samen met de potgrond als GGO-afval afgevoerd en direct vernietigd te worden. Hierbij dient de plant binnen de kooi (door de sleeves) eerst in een zak te worden gezet en afgesloten, daarna wordt de plant buiten de kooi nogmaals verpakt. Voor deze handeling dient de kooi zo kort mogelijk geopend te zijn;
- Na afloop van de proef dienen mogelijk aanwezige insecten in de insectenkooi en de klimaatkamer gedood te worden;

7.2 Populatie-dichtheid

De COGEM wijst er op dat de effectiviteit van de inperkingsmaatregelen afhankelijk is van de populatie-dichtheid van de organismen in het experiment. De populatie-dichtheid is met name van belang bij bladluizen, die gevoelig zijn voor ‘crowding’ wat de kans op ontsnapping hoger maakt.²⁵ In de vergunningsaanvraag zijn geen aantallen insecten vermeldt. De COGEM merkt op dat de experimenten met kleine aantallen insecten uitgevoerd dienen te worden. Daarbij is het van belang dat de insecten niet langer dan de duur van het experiment op de planten aanwezig blijven: wanneer de werkzaamheden worden uitgevoerd binnen de gestelde termijn met kleine aantallen insecten, is de kans verwaarloosbaar dat er ‘crowding’ optreedt.

7.3 Kennis en training van de werknemers

De COGEM heeft in haar eerdere advies betreffende werkzaamheden met gg-geleedpotigen als één van de werkvoorschriften gesteld dat de medewerkers kennis dienen te hebben van de geleedpotige en zijn getraind.³⁴ De COGEM beveelt aan de aanvrager om bij haar werkzaamheden de werknemers te trainen in het hanteren van de insecten, zeker gezien de variatie aan eigenschappen en gedrag van de verschillende insecten.

8. Conclusie

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II, met inbegrip van de bovengenoemde aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2021-04-01> (bezoekt op 13-09-2021)
2. Groenkennisnet. Komkommermozaïekvirus <https://wiki.groenkennisnet.nl/display/BEEL/Komkommermozaïekvirus> (bezoekt op 10-09-2021)
3. Li N *et al.* (2020). Pepper Crop Improvement Against Cucumber Mosaic Virus (CMV): A Review. *Front Plant Sci.* 11598798

4. Mochizuki T & Ohki ST (2012). Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. *Mol. Plant. Pathol.* 13:217–225
5. Yan Z *et al.* (2021). The Global Dimension of Tomato Yellow Leaf Curl Disease: Current Status and Breeding Perspectives. *Microorganisms* 9:740
6. Groen Kennisnet, Tomatengeelkrulbladvirus
<https://wiki.groenkennisnet.nl/display/BEEL/Tomatengeelkrulbladvirus> (bezocht op 10-09-2021)
7. Ghanim M (2014). A review of the mechanisms and components that determine the transmission efficiency of Tomato yellow leaf curl virus (Geminiviridae; Begomovirus) by its whitefly vector. *Virus Res.* 186:47–54
8. EFSA Panel on Plant Health (2014). Scientific Opinion on the pest categorisation of Tomato yellow leaf curl virus and related viruses causing tomato yellow leaf curl disease in Europe. *EFSA Journal* 12:3850-3877
9. Botermans M *et al.* (2009) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato in the Netherlands. *APS Publications* <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1073C>
10. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Tomato Yellow Leaf Curl Virus
<https://gd.eppo.int/taxon/TYLCV0/documents> (bezocht op 06-9-2021)
11. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), Regulated non-quarantine pests
<https://rnqp.eppo.int/> (bezocht op 06-09-2021)
12. Ruark-Seward CL *et al.* (2020). Evolutionary dynamics of Tomato spotted wilt virus within and between alternate plant hosts and thrips. *Sci. Rep.* 10:15797
13. Gupta R *et al.* (2018) An insight into the tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato and thrips interaction. *Plant Biotechnol. Rep.* 12:157-163
14. Groen Kennisnet, Tomatenbronsvlekkenvirus
<https://wiki.groenkennisnet.nl/display/BEEL/Tomatenbronsvlekkenvirus> (bezocht op 10-09-2021)
15. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), Tomato spotted wilt virus
<https://gd.eppo.int/taxon/TSWV00> (bezocht op 06-09-2021)
16. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), *Bemisia tabaci* – data sheet
<https://gd.eppo.int/taxon/BEMITA/documents> (bezocht op 15-09-2021)
17. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit, *Bemisia tabaci*
<https://www.nvwa.nl/documenten/plant/plantenpaspoort/opa/publicaties/bemisia-tabaci-herkennen> (bezocht op 09-09-2021)
18. Groenkennisnet Beeldenbank – Tabakswittevlieg
<https://wiki.groenkennisnet.nl/display/BEEL/Tabakswittevlieg> (bezocht op 09-09-2021)
19. Mansaray A & Sundufu AJ (2009). Oviposition, development and survivorship of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* on soybean, *Glycine max*, and the garden bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Insect Sci.* 9:1
20. Fekrat L & Shishehbor P (2007). Some biological features of cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on various host plants. *Pak. J. Biol. Sci.* 10:3180–3184.
21. Aregbesola OZ *et al.* (2020). Life history and temperature-dependence of cassava-colonising populations of *Bemisia tabaci*. *J. Pest. Sci.* 93:1225-1241
22. Waarneming.nl Bladluis <https://waarneming.nl/species/28187/> (bezocht op 14-09-2021)
23. Groenkennisnet Beeldenbank – Bladluizen <https://wiki.groenkennisnet.nl/display/BEEL/Bladluizen> (bezocht op 09-09-2021)
24. Simon JC *et al.* (2010). Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids. *C. R. Biologies* 333:488–496
25. Müller CB *et al.* (2001). The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecological Entomology* 26:330-340.

26. Abbot P *et al.* (2018). Chemical Ecology and Sociality in Aphids: Opportunities and Directions. *J. Chem. Ecol.* 44:770–784
27. Wageningen Universiteit, Trips herkenningkaart <https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksinstituten/plant-research/glastuinbouw/show-glas/Nieuwe-versie-tripsherkenningkaart-beschikbaar.htm> (bezocht op 14-09-2021)
28. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit, *Thrips parvispinus* <https://english.nvwa.nl/documents/plant/plant-health/pest-risk-analysis/documents/quickscan-thrips-parvispinus-october-2019> (bezocht op 14-09-2021)
29. Diaz-Montano J *et al.* (2011). Onion thrips (Thysanoptera: Thripidae): a global pest of increasing concern in onion. *J. Econ. Entomol.* 104:1–13
30. Groenkennisnet Beeldenbank – Trips <https://wiki.groenkennisnet.nl/display/BEEL/Trips+-+ui> (bezocht op 09-09-2021)
31. Pourian HR *et al.* (2009). Study on biology of onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber (var. Sultan) in laboratory conditions. *J. Plant Prot. Res.* 49:4
32. Communicatie met geraadpleegde externe deskundige: dr. T. Bukovinszki, entomologisch deskundige Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit
33. Booij K (2013). Options for containment of genetically modified mobile arthropods. Wageningen University & Research center. COGEM onderzoeksrapport CGM/2013-02
34. COGEM (2013). Containment measures for activities involving the use of GM arthropods under conditions of ‘contained use’. COGEM advies CGM/130416-01
35. Zeidan M & Czosnek H (1994). Acquisition and transmission of *Agrobacterium* by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7:792–798