

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 10 maart 2022
KENMERK CGM/220310-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden agro-geïnoculeerde planten met gg-virussen in combinatie met nematoden

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Kapstok plantvirale vectoren' (IG 21-188_2.8-000), ingediend door Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden waarbij planten geïnoculeerd worden met genetisch gemodificeerde (gg-)bacteriën die de gg-virale genomen van de plantenvirussen *Tobacco rattle virus* (TRV) of *Potato virus X* (PVX) bij zich dragen, en de virussen kunnen overdragen naar de geïnoculeerde plant. Inoculatie vindt plaats via het blad of de wortels, en bij wortelinoculatie kunnen ook aaltjes gebruikt worden om de bacterie over te brengen op de plant. Na infectie van de plant met deze gg-virussen, worden plantparasitaire aaltjes aan de plant toegevoegd. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau PCM/PKM-II met inachtneming van verscheidene standaard en extra aanvullende voorschriften. Na afloop van het experiment zal het wortelmateriaal geanalyseerd worden in het laboratorium. Deze verdere analyse verzoekt de aanvrager op ML-II en AP-I/ML-I laboratoria uit te voeren. De COGEM merkt op dat uitsleep van de gg-bacterie waarin zich virale genoomsequenties bevinden, via aaltjes mogelijk is. Om dit risico in te perken adviseert de COGEM om naast de standaard aanvullende en voorgenomen extra maatregelen op PKM-II, ook overschoenen te dragen. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is wanneer de werkzaamheden op de hierboven genoemde inperkingsniveaus en met inachtneming van de aanvullende voorschriften worden uitgevoerd.



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

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden dr. ir. A.B. Bonnema en dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van ir. A. S. van Bruggen van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit.

Inschaling van werkzaamheden met agro-geïnoculeerde planten, die gg-plantenvirussen (gg-PVX en gg-TRV) tot expressie brengen, in combinatie met plantparasitaire nematoden

COGEM advies CGM/220310-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag getiteld 'Kapstok plantvirale vectoren' (IG 21-188), is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden waarbij (al dan niet genetisch gemodificeerde (gg-))planten geïnoculeerd worden met de gg-bacterie gg-*Rhizobium radiobacter* (beter bekend als *Agrobacterium tumefaciens*, of *Agrobacterium radiobacter*), als vector voor de gg-plantenvirussen *Tobacco rattle virus* (TRV) of *Potato virus X* (PVX), al dan niet met behulp van plantparasitaire nematoden. Vervolgens zullen deze agro-geïnoculeerde planten geïnfecteerd worden met wildtype plantparasitaire nematoden. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau PCM/PKM-II met inachtneming van verscheidene aanvullende voorschriften. Na afloop van het experiment zal het wortelmateriaal geanalyseerd worden. De aanvrager verzoekt deze verdere analyse op ML-II en AP-I/ML-I uit te voeren.

2. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens planten van de species *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum* en *Arabidopsis thaliana* te inoculeren met gg-*A. tumefaciens*, waarin zich een Ti-plasmide bevindt met de virale genoomsequenties voor *Tobacco rattle virus* (TRV), of *Potato virus X* (PVX). De planten zijn afkomstig uit een eerder experiment en kunnen genetisch gemodificeerd zijn door toevoeging van korte zogenaamde 'dubbelstrengs (ds) hairpin' sequenties, gebaseerd op sequenties afkomstig uit planten of plantparasitaire nematoden.

De COGEM merkt op dat de aanvraag op sommige punten onduidelijk is. De aanvrager stelt dat zowel PVX als TRV genetisch gemodificeerd zijn. Het is echter uit de aanvraag niet duidelijk of alle virale constructen donorsequenties bevatten, welke specifieke donorsequenties het betreft, en waar deze donorsequenties gepositioneerd zijn in het virale genoom. Als donorsequenties zijn vermeld: (partiële) genen en cDNAs van land- en tuinbouwgewassen, *A. thaliana* en verscheidene plantparasitaire nematoden. De COGEM gaat in het onderhavig advies ervan uit dat het zowel bij TRV als bij PVX om gg-virussen gaat, met transgene inserties. Sommige planten zullen zowel met gg-PVX als gg-TRV geïnfecteerd worden.

Inoculatie van de planten met gg-*A. tumefaciens* zal plaatsvinden via het blad of het wortelstelsel. Wortelinoculatie wordt gedaan door een bacteriesuspensie direct bij opgepotte planten te pipetteren, of door nematoden die vooraf gemengd worden met gg-*A. tumefaciens*, bij opgepotte planten te pipetteren. Wortelinoculatie (al dan niet met behulp van nematoden) zal volgens de aanvrager alleen plaatsvinden met gg-*A. tumefaciens* met gg-TRV sequenties.

Na inoculatie van de planten, zullen deze geïnfecteerd worden met de wildtype plantparasitaire nematoden: *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne chitwoodi*, en *Meloidogyne fallax*. Het doel van de werkzaamheden is om onderzoek te doen naar ‘virus-induced gene silencing’ (VIGS), ‘host induced gene silencing’ (HIGS) van nematodegenen, en overexpressie van planten- en nematodegenen, door middel van TRV expressie, en onderzoek te doen naar expressie van het PVX.

De aanvrager is voornemens deze werkzaamheden uit te voeren op PCM/PKM-II met de aanvullende voorschriften zoals die gelden voor activiteiten met planten in associatie met genetisch gemodificeerde plantenvirussen (9.1.5.2.3.1 van de Regeling ggo¹):

- a. Inoculatie vindt plaats in een veiligheidskabinet van klasse II, indien tijdens de inoculatie van de planten(delen) aërosolvorming kan optreden;
- b. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- c. Tijdens inoculatie worden gemorste druppels, of druppelvorming op de plant verwijderd;
- d. De geïnoculeerde planten zijn duidelijk gemerkt, zodat ze van niet-geïnoculeerde planten onderscheiden kunnen worden;
- e. Het water geven gebeurt voorzichtig, waarbij de bovengrondse plantendelen zo min mogelijk worden beroerd;
- f. De opgepotte planten staan in plastic bakken waarin run-off water wordt opgevangen. Na gebruik wordt de inhoud van de bakken gesteriliseerd en worden de bakken ontsmet.

Daarnaast zullen ook de aanvullende voorschriften zoals beschreven onder 9.1.5.2.3.2 gehanteerd worden voor activiteiten met planten met genetisch gemodificeerde micro-organismen die op inperkingsniveau I of II gehanteerd mogen worden. Bovenop bovenstaande maatregelen geldt dan ook:

- b. De planten zijn opgepot alvorens te inoculeren;
- f. Indien het oogsten van zaden aan de orde is, worden de zaden na de oogst gedecontamineerd in een veiligheidskabinet van klasse II.

Wanneer de planten tot bloei komen, zullen tevens de aanvullende maatregelen gehanteerd worden die gelden voor gg-planten aangeduid als insectenbestuiver (beschreven in 9.1.5.2.3.4), windbestuiver (beschreven in 9.1.5.2.3.5), of gemakkelijke zaadverspreiders (beschreven in 9.1.5.2.3.6) om verspreiding van pollen, insecten of zaad te voorkomen.

Bovengronds plantmateriaal zal vanuit het PKM-II compartiment afgevoerd en geautoclaveerd worden. De potten met zilverzand en met nematoden geïnfecteerd wortelmateriaal zullen eerst voorzichtig gespoeld worden in het PKM-II compartiment, zodat de wortels met cysten in een zeef verzameld kunnen worden voor verdere analyse. Deze analyse zal plaatsvinden in het ML-II lab (DNA/RNA isolatie en microscopie), of in een AP-I of ML-I ruimte (microscopie, het betreft hier gesloten handelingen). Het spoelwater wordt vanuit het PKM-II compartiment via een gesloten systeem naar een waterautoclaaf geleid. Zilverzand wordt opgevangen, afgevoerd en geautoclaveerd. Tevens geeft de

aanvrager aan dat als extra aanvullende maatregel na afloop van de experimenten alle bij het spoelen gebruikte materialen worden ontsmet.

Voor handelingen met het materiaal dat op ML-II onderzocht zal worden, worden de aanvullende voorschriften voor activiteiten met gg-micro-organismen die zich via gebruiksvoorwerpen (fomites) kunnen verspreiden (9.1.1.3.3.12) in acht genomen:

- a. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- b. Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II) uitgevoerd.

Het materiaal dat op AP-I of ML-I onderzocht zal worden m.b.v. microscopie zal via drie mogelijke scenario's behandeld en getransporteerd worden:

- 1) Het verzamelde materiaal afkomstig van de PKM-II ruimte zal daar in een onbreekbare gesloten petrischaal geplaatst worden voor transport en observatie in de AP-I/ML-I ruimte, en ongeopend vernietigd worden;
- 2) Het materiaal zal in een VK-II op ML-II een kleuring ondergaan en opgekookt worden om het materiaal af te doden alvorens het naar ML-I/AP-I getransporteerd wordt;
- 3) In een VK-II op ML-II kan een preparaat gemaakt worden zonder kleuring, welke geseald in een onbreekbare gesloten petrischaal naar een microscoop op AP-I/ML-I gebracht zal worden.

Als extra aanvullende maatregelen hanteert de aanvrager op AP-I of ML-I dat:

- a. De genetisch gemodificeerde organismen vooraf in een gesloten eenheid worden gebracht;
- b. De eenheid niet wordt geopend;
- c. De genetisch gemodificeerde organismen na afloop van de werkzaamheden in de gesloten eenheid in een afvalcontainer worden gedaan of worden teruggebracht naar het inperkingsniveau waar ze in de gesloten eenheid zijn gebracht.

3. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2019 geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van *Meloidogyne incognita*, en over de inschaling van werkzaamheden met deze plantparasitaire nematode. Hieronder vielen ook werkzaamheden in associatie met planten op PKM-II.² De COGEM heeft destijds opgemerkt dat de nematoden, eieren en eipakketten van *M. incognita* erg klein en lastig te zien zijn, waardoor gg-*M. incognita* ongezien uit de werkruimte meegenomen zou kunnen worden. Om mogelijke uitsleep van gg-*M. incognita* naar het milieu te voorkomen, adviseerde de COGEM bij werkzaamheden met gg-*M. incognita* handschoenen te dragen. Tevens adviseerde zij voor werkzaamheden met gg-*M. incognita* in associatie met planten, naast de standaardvoorschriften voor werkzaamheden op PKM-II, 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.

4. Overweging

Bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onder 'Ingeperkt Gebruik'

dienen maatregelen genomen te worden om 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.

De aanvrager is voornemens (al dan niet gg-)planten te infecteren met de plantenvirussen gg-PVX en gg-TRV. De planten worden geïnoculeerd met gg-*A. tumefaciens* met Ti-plasmiden met virale genomsequenties, al dan niet met behulp van plantparasitaire nematoden. Vervolgens zullen de agro-geïnoculeerde planten geïnfecteerd worden met verscheidene wildtype plantparasitaire nematoden. Hierbij zal volgens de aanvrager transiënte post-transcriptionele ‘gene silencing’ plaatsvinden. Vervolgens zal het wortelmateriaal, met de daarin aanwezige nematoden, verzameld worden voor verdere analyse. De aanvrager is voornemens deze werkzaamheden uit te voeren op PCM/PKM-II met inachtneming van een aantal aanvullende voorschriften. De COGEM is gevraagd of de plantparasitaire nematoden niet kunnen interacteren met gg-PVX en gg-TRV en geen invloed hebben op de verspreiding van deze virussen, en of de getroffen maatregelen voldoende zijn om mens en milieu te beschermen.

4.1 Interactie tussen de virussen die in de plant tot expressie worden gebracht

Gedurende de agro-inoculatie kunnen planten met zowel gg-PVX als gg-TRV geïnfecteerd worden. PVX (genus *Potexvirus*, familie *Alphaflexiviridae*) en TRV (genus *Tobravirus*, familie *Virgaviridae*) zijn beiden RNA-plantenvirussen met een enkelstrengs RNA genoom. Het genoom van TRV is gesegmenteerd en verdeeld over twee RNA segmenten, die elk in een apart virusdeeltje worden ingepakt. Het RNA1 kan onafhankelijk van RNA2 repliceren en binnen de plant verspreiden. Het RNA2 codeert voor het manteleiwit (‘coat protein’) en is derhalve nodig om virusdeeltjes te produceren.³ TRV heeft een zeer breed gastheerbereik en kan overgedragen worden door bepaalde vrijlevende wortelaaltjes uit de familie *Trichodoridae*, genera *Trichodorus* en *Paratrichodorus*.^{4,5} De interactie tussen het virus en deze nematoden is zeer specifiek en afhankelijk van virale eiwitten waarvan de gensequenties op het RNA2 liggen.^{3,4,5}

De voornaamste gastheren van PVX zijn kruidachtige planten, met name uit de nachtschadefamilie (*Solanaceae*). Overdracht van PVX gebeurt via mechanische transmissie, er zijn geen natuurlijke vectoren van PVX beschreven.^{6,7} Naar PVX is veel onderzoek gedaan in het kader van plant-virus interacties en antivirale mechanismen in de plant.

De aanvrager stelt dat TRV en PVX niet aan elkaar verwant zijn en dat zij niet kunnen recombineren tot een chimeer virus als zij beide in een plant tot expressie komen. De COGEM heeft in de literatuur geen aanwijzingen gevonden dat deze virussen kunnen recombineren. Zij acht de kans op recombinatie tussen deze virussen die niet aan elkaar verwant zijn, verwaarloosbaar klein.

4.2 Uitsleep van gg-plantenvirussen of gg-*A. tumefaciens* via nematoden

Inoculatie van (gg-)planten met gg-*A. tumefaciens* zal plaatsvinden via blad- of wortelinoculatie. Bij wortelinoculatie kan gebruik gemaakt worden van plantparasitaire nematoden als vector om infectie met gg-*A. tumefaciens* te bewerkstelligen. Na agro-inoculatie worden de planten, waarin gg-PVX en gg-TRV aanwezig zijn, geïnfecteerd met wildtype plantparasitaire nematoden.

4.2.1 Overdracht gg-A. tumefaciens via nematoden

De informatie in de aanvraag over het gebruik van plantparasitaire nematoden als vehikel voor inoculatie met gg-A. *tumefaciens* is zeer beperkt. Ook wordt niet vermeld welke nematodesoort hiervoor wordt gebruikt. De aanvrager meldt dat de nematoden voorafgaand aan de inoculatie geïnficeerd/besmet worden met gg-A. *tumefaciens*. De wondjes die in de plantenwortel ontstaan door het binnendringen van de nematoden, zouden een positieve invloed hebben op de infectie-efficiëntie van gg-A. *tumefaciens*. In de aanvraag wordt echter niet beschreven hoe de nematoden geïnficeerd of besmet worden. In een publicatie van Karimi *et al.* waarin het gebruik van nematoden als vector voor overdracht van A. *tumefaciens* naar plantenwortels beschreven wordt, is aangegeven dat er een mengsel van nematoden en A. *tumefaciens* gebruikt wordt voor inoculatie.⁸ De COGEM acht het aannemelijk dat deze methode ook in onderhavige aanvraag gebruikt zal worden. Zij acht het derhalve niet uitgesloten dat gg-A. *tumefaciens* aan de buitenkant van de nematode aanwezig kan blijven. Aanwezigheid van bodembacteriën (waaronder Rhizobia) op nematoden wordt in de literatuur beschreven en kan bevorderlijk zijn voor de verspreiding van de bacterie naar de plantenwortel.⁹

4.2.2 Overdracht van (gg-)PVX en (gg-)TRV via nematoden

Na de agro-inoculatie van planten met gg-PVX en/of gg-TRV, worden de planten geïnficeerd met verscheidene plantparasitaire nematoden. *G. rostochiensis*, *G. pallida* en *H. schachtii* (familie *Heteroderidae*), zijn cysteaaltjes, waarbij vrouwelijke aaltjes na het binnendringen van de plantenwortel opzwellen en met het achterlijf uit de wortel barsten, waarna bevruchting door mannelijke aaltjes op kan treden. Na de bevruchting sterft het vrouwtje, en ontwikkelen de eieren zich in het verharde achterlijf, de cyste. Vaak zijn cysteaaltjes sterk gespecialiseerd op één of meerdere gewassen.¹⁰ *G. rostochiensis* en *G. pallida* zijn ook wel bekend als aardappelcysteaaltjes, en *H. schachtii* is een bietencysteaaltje. *M. incognita*, *M. chitwoodi* en *M. fallax* (familie *Meloidogynidae*) zijn wortelknobbelaaltjes. Aangetaste planten vertonen vaak knobbels op de wortels of knollen van planten, al is de vorming van knobbels afhankelijk van de *Meloidogyne*-soort en de plant. Eieren worden in een soort gelatinepakket in en op de knobbels gelegd. De soorten *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *M. chitwoodi* en *M. fallax* komen in Nederland voor en zijn binnen de Europese Unie aangemerkt als quarantaine organismen¹¹ en tevens opgenomen in het register van quarantaine-organismen van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA).¹²

De plantparasitaire nematoden *G. rostochiensis*, *G. pallida*, *H. schachtii*, *M. incognita*, *M. chitwoodi* en *M. fallax* zijn geen vectoren voor TRV en PVX en kunnen de virussen derhalve niet verspreiden. Deze nematode-species behoren tot een andere taxonomische groep dan de nematoden die als vector op kunnen treden voor TRV. PVX wordt enkel mechanisch overgedragen, en niet via vectoren. De COGEM is van oordeel dat infectie van deze nematoden met gg-TRV en gg-PVX, en overdracht van deze virussen via de nematoden in de onderhavige aanvraag uitgesloten is.

5. Advies

De COGEM merkt op dat uitsleep van gg-A. *tumefaciens* met virale genomsequenties via nematoden mogelijk is. De aanvrager is voornemens de agro-inoculatiewerkzaamheden en infectie van de agro-geïnoculeerde planten met wildtype nematoden uit te voeren op PKM-II met de aanvullende

voorschriften zoals die gelden voor activiteiten met planten in associatie met genetisch gemodificeerde plantenvirussen (9.1.5.2.3.1 van de Regeling ggo) en voor activiteiten met planten met genetisch gemodificeerde micro-organismen die op inperkingsniveau I of II gehanteerd mogen worden (9.1.5.2.3.2). Wanneer de planten tot bloei komen, zullen tevens de aanvullende maatregelen gehanteerd worden die gelden voor gg-planten aangeduid als insectenbestuiver (beschreven in 9.1.5.2.3.4), windbestuiver (beschreven in 9.1.5.2.3.5), of gemakkelijke zaadverspreiders (beschreven in 9.1.5.2.3.6).

Conform de werkvoorschriften voor PKM-II die voorgeschreven zijn in de Regeling ggo,¹³ moet materiaal dat in aanraking is geweest met ggo's worden geïnactiveerd voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd, en dient al het biologisch afval verzameld te worden in breukvaste, lekdichte containers die gesloten kunnen worden of in een gelijkwaardige verpakking. Het afval dient te worden geïnactiveerd voordat het de inrichting verlaat of moet ter onmiddellijke verbranding worden aangeboden aan een afvalverbrandingsinstallatie. Ook dienen werkoppervlakken direct na besmetting, aan het eind van de werkzaamheden, en aan het einde van iedere werkdag, te worden gedesinfecteerd. Tevens moet passende beschermende kleding worden gedragen, dat na afloop van de werkzaamheden in de kweekcel of kas achtergelaten wordt.

Het wortelmateriaal zal in het PKM-II compartiment voorzichtig gespoeld en gezeefd worden om wortels en cysten te verzamelen voor verdere analyse. Hierbij hanteert de aanvrager als extra aanvullende maatregel dat de bij het spoelen gebruikte materialen ontsmet worden. Het spoelwater zal vanuit het PKM-II compartiment via een gesloten systeem naar de waterautoclaaf worden geleid en aldaar worden geautoclaveerd. De verdere analyse van het met nematoden geïnfecteerde wortelmateriaal, waarin zich tevens gg-*A. tumefaciens* en gg-plantenvirus kan bevinden, zal plaatsvinden in het ML-II lab (DNA/RNA isolatie en microscopie), of de AP-I/ML-I ruimte (microscopie). Bij de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau zullen tevens de aanvullende maatregelen gehanteerd worden die gelden voor ggo's die zich via gebruiksvoorwerpen (fomites) kunnen verspreiden (9.1.1.3.3.12). De COGEM acht de veiligheid voor mens en milieu afdoende gewaarborgd indien de werkzaamheden met betrekking tot de DNA/RNA isolatie en microscopische analyse van wortelmateriaal op ML-II worden uitgevoerd, met inachtneming van de voorgestelde aanvullende maatregelen.

De preparaten die op AP-I of ML-I geanalyseerd worden, zullen in de PKM-II ruimte in een gesloten eenheid worden geplaatst en eventueel op het ML-II lab in een VK-II geprepareerd worden (bijvoorbeeld voor kleuring, of het maken van een preparaat waarvoor de petrischaal tijdelijk geopend wordt) en opnieuw ingesloten worden. De handelingen op AP-I of ML-I inperkingsniveau betreffen gesloten handelingen en het materiaal zal na afloop in de gesloten eenheid in een afvalcontainer worden gedaan of teruggebracht worden naar het inperkingsniveau waar ze in de gesloten eenheid zijn gebracht (PKM-II). De COGEM is van oordeel dat de maatregelen die genomen worden om de handelingen op ML-I en AP-I uit te voeren, afdoende zijn om verspreiding te voorkomen. De COGEM gaat er hierbij vanuit dat de petrischalen waarin het materiaal vervoerd wordt, geseald zijn.

De COGEM merkt op dat bij het verzamelen van het wortelmateriaal op PKM-II rekening gehouden dient te worden met het feit dat de nematoden, eipakketten en hun eieren erg klein en lastig te zien

kunnen zijn. Hierdoor bestaat de mogelijkheid dat nematoden die mogelijk besmet kunnen zijn met gg-*A. tumefaciens* ongezien worden meegenomen uit de werkruimte, bijvoorbeeld doordat de medewerker gg-eieren onder de nagels heeft of besmette grond onder de schoenen. Om mogelijke uitsleep van met gg-*A. tumefaciens* besmette nematoden naar het milieu te voorkomen, adviseert de COGEM naast de standaard aanvullende maatregelen op PKM-II en de extra maatregelen zoals genoemd door de aanvrager, bij de werkzaamheden ook het volgende extra aanvullende voorschrift te hanteren, vergelijkbaar met het werkvoorschrift zoals opgesteld door de NVWA voor werkzaamheden met risicovolle organismen¹⁴:

- Tijdens de werkzaamheden worden overschoenen gedragen.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de standaard aanvullende maatregelen op PKM-II en ML-II en de genoemde extra maatregelen (i.e., ontsmetten van materiaal dat gebruikt is bij het spoelen, het dragen van overschoenen, en de gesloten handelingen op ML-I/AP-I) op PKM-II en ML-I/AP-I voldoende inperking bieden om uitsleep van gg-virussen of nematoden waaraan mogelijk gg-*A. tumefaciens* met virale genoomsequenties gehecht zijn, te voorkomen. 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. Regeling genetisch gemodificeerde organismen (GGO) milieubeheer (2013) <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01> (bezoekt: 2 maart 2022)
2. COGEM (2019). Pathogeniteitsclassificatie *Meloidogyne incognita* en inschaling van werkzaamheden met gg-*M. incognita*. COGEM advies CGM/190201-01
3. MacFarlane SA (1999). Molecular biology of the tobnaviruses. J. Gen. Virol. 80: 2799-2807
4. MacFarlane SA (2003). Molecular determinants of the transmission of plant viruses by nematodes. Mol. Plant Pathol. 4: 211-215
5. Brown DJF *et al.* (1995). Transmission of viruses by plant nematodes. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 223-249
6. Lico C *et al.* (2015). The two-faced Potato virus X: From plant pathogen to smart nanoparticle. Front. Plant Sci. 6: 1009
7. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). The ICTV report on virus classification and taxon nomenclature. Genus Potexvirus. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/alphaflexiviridae/1330/genus-potexvirus (bezoekt: 2 maart 2022)
8. Karimi M *et al.* (2008). Nematodes as vectors to introduce *Agrobacterium* into plant roots. Mol. Plant Pathol. 1: 383-387
9. Costa S *et al.* (2021). Interaction of symbiotic rhizobia and parasitic root-knot nematodes in legume roots: from molecular regulation to field application. MPMI 34: 470-490
10. Aaltjes.net, Corteva Agriscience (2022). <https://www.aaltjes.net/aaltjes> (bezoekt: 3 maart 2022)

11. 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: 3 maart 2022)
12. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA). Register Q-organismen. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/fytosanitaire-wetgeving-vanaf-14-december-2019/documenten/export/fytosanitair/voorschriften/algemeen/register-q-organismen-en-q-waardige-organismen> (bezocht: 3 maart 2022)
13. Regeling genetisch gemodificeerde organismen (GGO) milieubeheer (2013). <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01#Bijlage9> (bezocht: 7 maart 2022)
14. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Eisentabel R&D Fyto versie 5. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/rd-fyto-2019-829/documenten/import/fytosanitair/nvwa-import-fytosanitair/publicaties/eisentabel-rd-fyto> (bezocht: 10 maart 2022)