

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

DATUM 21 november 2022
KENMERK CGM/221121-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie twee *Xanthomonas* stammen

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een verzoek van de Universiteit Utrecht om de bacteriestammen *Xanthomonas* sp. WCS2014-23 en *Xanthomonas* sp. Leaf 148 op Bijlage 2, lijst A1 te plaatsen (IG 22-149_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

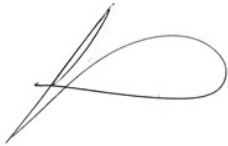
De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestammen *Xanthomonas* sp. WCS2014-23 en *Xanthomonas* sp. Leaf148 en over de plaatsing van deze bacteriestammen op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene gastheerorganismen) van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'. *Xanthomonas* bacteriën zijn plantgeassocieerd en veel soorten staan bekend als plantpathogenen, die schade kunnen veroorzaken aan verschillende voedselgewassen zoals rijst, tomaat, paprika, en bananen. Er zijn echter ook niet-pathogene *xanthomonas*-stammen geïdentificeerd. *Xanthomonas* bacteriën kunnen op veel verschillende plantensoorten aangetroffen worden, maar individuele soorten zijn vaak geassocieerd met een beperkt aantal gastheersoorten.

Xanthomonas stammen WCS2014-23 en Leaf148 zijn geïsoleerd uit de grond en van bladeren afkomstig van gezonde *A. thaliana* planten (Zandraket). Uit onderzoek blijkt dat aanwezigheid van de stam *X. sp. Leaf148* op de bladeren bescherming biedt tegen infectie door een plantpathogene bacterie. In *A. thaliana* mutanten waarin op verschillende manieren de afweer is verstoord, blijkt de Leaf148 stam pathogeen. *Xanthomonas* sp. WCS2014-23 kan in combinatie met enkele andere bacteriestammen de afweer van *A. thaliana* planten versterken.

Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen dat *Xanthomonas* sp. WCS2014-23 en *Xanthomonas* sp. Leaf148 pathogeen zijn voor mens of dier. De COGEM acht het niet uitgesloten dat de stammen pathogeen kunnen zijn voor andere planten dan de Zandraket. Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de *Xanthomonas* stammen WCS2014-23 en Leaf148 ingedeeld dienen te worden in pathogeniteitsklasse 2 als plantpathogene bacteriën.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Vorzitter 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, is COGEM lid dr. J.J.P.A. de Cock niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriestammen *Xanthomonas* sp. WCS2014-23 en *Xanthomonas* sp. Leaf148

COGEM advies CGM/221121-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Universiteit Utrecht (IG 22-149) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestammen *Xanthomonas* sp. WCS2014-23 en *Xanthomonas* sp. Leaf148 en plaatsing van deze stammen op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van gastheerorganismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die niet, op de A-lijsten staan (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieurisicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden. De aanvrager duidt de twee bacteriestammen aan als 'Xanthomonas defensor'. Omdat dit geen erkende soortnaam is, zal deze naam in onderhavig advies niet gebruikt worden en zullen alleen de namen van de *Xanthomonas* isolaten; stammen WCS2014-23 en Leaf148, vermeld worden.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw 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.

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme goed aan te tonen. De afwezigheid van pathogeniteit is echter moeilijk te bewijzen. Daarbij worden gevallen van pathogeniteit gepubliceerd, terwijl er nauwelijks wordt gerapporteerd over de apathogeniteit van micro-organismen. Hierdoor is van veel micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

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.

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem of een onderliggend ziektebeeld, worden in de regel als niet-pathogeen beschouwd en kunnen, als aan één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo1 geplaatst worden.

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. Het genus *Xanthomonas*

Het genus *Xanthomonas* behoort tot de familie *Lysobacteraceae* en het fylum *Pseudomonadota*.² De soorten uit dit genus zijn Gram-negatief en worden vaak gekenmerkt door de productie van een geel pigment, xanthomonadin. De genetische diversiteit binnen het genus is groot. *Xanthomonas* bacteriën zijn geassocieerd met planten en veel soorten staan bekend als plantpathogeen.³ *Xanthomonas* soorten kunnen schade aan voedselgewassen zoals rijst, tomaat, paprika, banaan, citrus, steenvruchten en noten veroorzaken.⁴ Er zijn echter ook niet-pathogene xanthomonas-stammen geïdentificeerd.^{5,6,7} *Xanthomonas* spp. worden op veel verschillende plantensoorten aangetroffen, maar individuele soorten zijn vaak geassocieerd met een beperkt aantal waardplanten.^{4,8}

3.1 Informatie over *Xanthomonas* sp. WSC2014-23

Het *Xanthomonas* isolaat WSC2014-23 is beschreven in een publicatie uit 2018.⁹ De stam is geïsoleerd uit een bodemmonster bij een onderzoek naar veranderingen in de rhizosfeer van *Arabidopsis thaliana* planten (Zandraket) na inoculatie met een plantpathogeen (*Hyaloperonospora arabidopsidis*). In het onderzoek is het *Xanthomonas* isolaat WSC2014-23, samen met twee andere isolaten uit de genera *Microbacterium* en *Stenotrophomonas*, geïdentificeerd als bacteriestammen die significant vaker aanwezig waren in de grond van met *H. arabidopsis* geïnfecteerde *A. thaliana* planten. Wanneer *Xanthomonas* isolaat WSC2014-23 in combinatie met twee andere isolaten aan grond werd toegevoegd, bleken zij een systemische afweerreactie ('induced systemic resistance' (ISR)¹⁰) in de plant te induceren. Aanwezigheid van *Xanthomonas* sp. WSC2014-23 had geen negatieve effecten op het wortelgewicht van de arabidopsisplanten.

Op basis van 16S RNA gensequenties kan *Xanthomonas* isolaat WCS2014-23 niet op soortniveau geïdentificeerd worden. Wanneer gekeken wordt naar de 'average nucleotide identity' (ANI), komt de stam voor 97,5% overeen met de *Xanthomonas* stam Leaf 148, die van het blad van gezonde *A. thaliana* planten is geïsoleerd.¹¹ Met andere *xanthomonas*-stammen was de maximale ANI 91,5%, waaruit geconcludeerd wordt dat *Xanthomonas* isolaat WCS2014-23 een nieuwe onbeschreven soort betreft, of tot een soort behoort waarvan de sequentie (nog) niet in kaart is gebracht.⁹

3.2 Informatie over *Xanthomonas* sp. Leaf148

Xanthomonas sp. Leaf148 is één van de 224 bacteriestammen die geïsoleerd zijn van het blad van gezonde *A. thaliana* planten uit natuurlijke populaties in Duitsland en Zwitserland.¹¹ Ook met deze stam is onderzoek gedaan naar een mogelijk beschermende werking bij *A. thaliana* planten, wanneer deze blootgesteld worden aan het pathogeen *Pseudomonas syringae* DC3000.¹² Aanwezigheid van de Leaf148 stam bood bescherming tegen het pathogeen; de ziekteverschijnselen waren sterk verminderd, en de meeste planten overleefden het experiment met weinig ziekteverschijnselen.

In *A. thaliana* mutanten die gevoeliger zijn voor ziekten (*bak1/bkk1*), veroorzaakte de stam sterfte onder de *A. thaliana* mutanten, ook in afwezigheid van het pathogeen *P. syringae* DC3000.¹² Dit kwam overeen met bevindingen uit een ander onderzoek, waarbij eveneens aangetoond werd dat *Xanthomonas* stam Leaf148 ziekte en sterfte veroorzaakte in afweerverstoorde *A. thaliana* mutanten (*rbohD* knockouts), maar niet in wildtype planten.¹³

Het genoom van Leaf148 is in kaart gebracht. Uit een voorlopige analyse van het genoom is gebleken dat het T3SS17 systeem afwezig is in Leaf148. Dit is een zogenaamd 'type-3 secretion system' (T3SS) dat beschouwd wordt als een virulentiefactor die aanwezig is in pathogene *xanthomonas*-soorten.¹³

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in haar overzichtslijst van pathogeniteitsclassificaties van pathogene en apathogene bacteriën meerdere soorten uit het genus *Xanthomonas* opgenomen.¹⁴ De 27 *xanthomonas*-soorten die op de lijst vermeld zijn, zijn allen als plantpathogene bacteriën ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

5. Pathogeniteitsclassificaties andere beoordelende instanties

De twee stammen worden niet vermeld op de lijsten van andere beoordelende instanties.^{15,16,17}

6. Overweging en advies

Xanthomonas stammen WCS2014-23 en Leaf148 zijn geïsoleerd uit de grond en van bladeren afkomstig van *A. thaliana* planten. Op basis van de ANI, die ook wel aangehouden wordt voor taxonomische indelingen van prokaryoten,¹⁸ is het waarschijnlijk dat deze stammen tot dezelfde soort behoren en voldoende verschillen van andere *Xanthomonas* soorten. Van *X. sp.* WCS2014-23 wordt verondersteld dat de groei van deze stam in de grond gestimuleerd wordt door *A. thaliana* wanneer deze door een pathogeen geïnfecteerd wordt, dat mogelijk voordeel kan bieden voor de plant. Alleen wanneer de stam *X. sp.* WCS2014-23 in combinatie met enkele andere bacteriestammen in de rhizosfeer aanwezig is, kunnen zij de resistentie van *A. thaliana* planten voor het pathogeen verhogen. Er worden geen nadelige effecten waargenomen van *Xanthomonas* stammen WCS2014-23 in gezonde arabidopsisplanten.

De stam *X. sp. Leaf148* is geïsoleerd uit gezonde arabidopsisplanten. Uit onderzoek blijkt dat aanwezigheid van *X. sp. Leaf148* op de bladeren van *A. thaliana* bescherming biedt tegen infectie door de plantpathogeen *P. syringae* DC3000. Voor de *X. sp. Leaf148* stam is gerapporteerd dat deze het T3SS17 gen mist, een belangrijke virulentiefactor. In *A. thaliana* mutanten waarin op verschillende manieren de afweer is verstoord, blijkt de *Leaf148* stam pathogeen. Echter, voor *Xanthomonas* stam *Leaf148* worden geen nadelige effecten waargenomen in gezonde arabidopsisplanten. De twee stammen worden niet vermeld in de databases van de American Phytopathological Society¹⁹ en de 'European and Mediterranean Plant Protection Organization' (EPPO).²⁰

In de beperkt aanwezige wetenschappelijke literatuur over *Xanthomonas* stammen WCS2014-23 en *Leaf148* zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat deze soort pathogeen is voor mens of dier. Met betrekking tot de mogelijke pathogeniteit voor planten, merkt de COGEM op dat de pathogeniteit van *xanthomonas*-stammen sterk afhankelijk kan zijn van de experimentele condities. Zo is er voor *Xanthomonas arboricola* stammen tegenstrijdige berichtgeving over de mogelijke pathogeniteit, die afhankelijk blijkt van de experimentele omstandigheden.²¹ De COGEM merkt tevens op dat onderzoek waaruit gegevens over mogelijke pathogeniteit van deze stammen gehaald kan worden, alleen is uitgevoerd met *A. thaliana* planten. Er is hierdoor een zekere mate van onzekerheid over de pathogeniteit in andere plantensoorten, met name binnen dezelfde familie (*Brassicaceae*). Hoewel *Xanthomonas* soorten in het algemeen sterk aangepast zijn aan hun gastheer en daarmee gastheerspecifiek zijn, kan niet geheel uitgesloten worden dat de *xanthomonas*-stammen WCS2014-23 en *Leaf148* pathogeen kunnen zijn voor andere plantensoorten. Voor de stam *X. sp. Leaf148* is gerapporteerd dat hierin een belangrijke virulentiefactor (T3SS17) ontbreekt. Hoewel de afwezigheid van T3SS genen sterk gecorreleerd is met de afwezigheid van pathogeniteit, zijn er ook enkele pathogene stammen die het T3SS missen.²¹ Mogelijk zijn er ook nog andere virulentiefactoren aanwezig in de stammen die een rol kunnen spelen bij de pathogeniteit in planten.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de bacteriestammen *Xanthomonas sp. WCS2014-23* en *Xanthomonas sp. Leaf148* niet voldoen aan de criteria voor indeling in pathogeniteitsklasse 1, en adviseert zij deze bacteriestammen in te delen in pathogeniteitsklasse 2 als plantpathogene bacteriestammen.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-07-01> (bezocht op 10 november 2022)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - *Xanthomonas*
<https://psn.dsmz.de/genus/xanthomonas> (bezocht op 9 november 2022)
3. Vauterin L *et al.* (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90: 677-682

4. Timilsina S *et al.* (2020). *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 18: 415-427
5. Cesbron S *et al.* (2015). Comparative genomics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* unveil molecular and evolutionary events linked to pathoadaptation. *Front. Plant Sci.* 6: 1126
6. Triplett LR *et al.* (2015). Characterization of a novel clade of *Xanthomonas* isolated from rice leaves in Mali and proposal of *Xanthomonas maliensis* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107: 869-881
7. Vauterin L *et al.* (1996). Identification of non-pathogenic *Xanthomonas* strains associated with plant. *System. Appl. Microbiol.* 19: 96-105
8. Jacques MA *et al.* (2016). Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol* 54: 163-187
9. Berendsen RL *et al.* (2018). Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME Journal* 12: 1469-1507
10. Pieterse CMJ *et al.* (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52: 347-375
11. Bai Y *et al.* (2015). Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. *Nature* 528: 364-369
12. Vogel CM *et al.* (2021). Protective role of the *Arabidopsis* leaf microbiota against a bacterial pathogen. *Nat. Microbiol.* 6: 1537-1548
13. Pfeilmeier S *et al.* (2021). The plant NADPH oxidase RBOHD is required for microbiota homeostasis in leaves. *Nat. Microbiol.* 6: 852-864
14. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën (2021). COGEM advies CGM/211025-01
15. Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen“ (2015). https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?__blob=publicationFile&v=8 (bezocht op 10 november 2022)
16. Federal Office for the Environment (FOEN, 2013). Classification of Organisms. Part 1: Bacteria. Status January 2013. <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht op 10 november 2022)
17. American Type Culture Collection (ATCC). <https://www.atcc.org/> (bezocht op 10 november 2022)
18. Richter M & Roselló-Móra R (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *PNAS* 106: 19126-19131
19. American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/Pages/default.aspx> (bezocht op 10 november 2022)
20. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). EPPO Global Database <https://gd.eppo.int/> (bezocht op 10 november 2022)
21. Te Molder D *et al.* (2021). Machine learning approaches to predict the plant-associated phenotype of *Xanthomonas* strains. *BMC Genomics* 22: 848