

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

DATUM 15 februari 2024
KENMERK CGM/240215-01
ONDERWERP Advies planten met plantvirale constructen i.c.m. Groene perzikluis

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een vergunningsuitbreiding (IG 21_126_2.8-002) met de titel 'Plantvirale vectoren in combinatie met insecten of nematoden', ingediend door Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

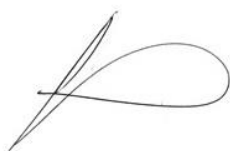
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met plantvirale vectoren, planten en insecten. Hierbij wordt met behulp van genetische modificatie een wildtype plantenvirus (*Turnip yellows virus*, TuYV) geproduceerd in suikerbietplanten. In de aangevraagde werkzaamheden wordt gekeken of Groene perzikluis (*Myzus persicae*) in staat is TuYV te verspreiden van de geïnfecteerde suikerbietplanten naar ongeïnfecteerde zaailingen. De Groene perzikluis is een bekende verspreider van TuYV en andere plantenziektes.

De werkzaamheden zullen plaatsvinden in een insectenkooi in een PKM-II kascompartiment met sluis. Bladluizen van 3-4 dagen oud zullen in een klemkooitje 3 dagen op een geïnfecteerde plant voeden, waarna ze verplaatst worden naar een suikerbietzaailing omgeven door een nylon zakje. Na 3 à 4 dagen op de zaailing worden de luizen gedood en wordt de plant nog 4 weken gemonitord op ontwikkeling van virussymptomen.

De COGEM is van oordeel dat bij de uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met de virus-bevattende planten en insecten op inperkingsniveau PKM-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

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden dr. ir. A.B. Bonnema, prof. dr. ir. G. Messelink, dr. ir. R.Y. van der Weide en prof. dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inperkingsmaatregelen bij werkzaamheden met een plantvirale vector i.c.m. Groene perzikluis

COGEM advies CGM/240215-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de uitbreiding van een vergunning van de Wageningen Universiteit (IG 21-126). De uitbreiding betreft werkzaamheden met suikerbietplanten (*Beta vulgaris*) waar door middel van inoculatie met *Agrobacterium tumefaciens* de genoomsequentie van *Turnip yellows virus* (TuYV) tot expressie wordt gebracht. Op deze planten worden vervolgens enkele dagen Groene perzikluizen (*Myzus persicae*) gezet, die mogelijk als vector voor dit virus kunnen optreden. Na de mogelijke opname van dit virus worden de bladluizen doorgezet op gezonde suikerbietzaailingen. De COGEM is gevraagd te adviseren over de benodigde inperkingsmaatregelen bij de experimenten zoals deze beschreven zijn in de uitbreidingsaanvraag. In de aanvraag is geen gedetailleerde informatie overlegd over de gebruikte virale constructen en de wijze waarop de inoculatie wordt uitgevoerd.

2. Biologie van *Turnip yellows virus*

Turnip yellows virus (TuYV; Familie: *Solemoviridae*, genus *Polerovirus*) is een plantenvirus en als zodanig ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{1,2} TuYV heeft een enkelstrengs positief RNA-genoom. Het floëemgebonden-virus wordt enkel verspreid door bladluizen (Hemiptera: Aphididae), die het na opname levenslang vasthouden en kunnen verspreiden wanneer zij voeden op ongeïnfecteerde planten.³ TuYV heeft een brede waardplantenreeks, waaronder sierteeltgewassen en voedselgewassen.⁴ Symptomen van infectie met TuYV zijn onder andere vergeelde bladeren en een groeiachterstand ten opzichte van ongeïnfecteerde planten, hoewel infectie ook zonder symptomen kan verlopen.^{5,6}

3. Biologie van de groene perzikbladluis

In Nederland komen ongeveer 600 soorten bladluizen (Aphidoidea) voor, waaronder de Groene perzikluis (*Myzus persicae*).^{7,8,9} Bladluizen voeden op het floëem van de plant en kunnen plantenvirussen verspreiden die in het floëem aanwezig zijn.¹⁰ Groene perzikluizen zijn meestal ongevleugeld, maar komen in hun volwassen vorm ook voor mét vleugels. Deze bladluizen zijn respectievelijk 1,7 tot 2,0 mm en 1,8 tot 2,1 mm lang.¹⁴ Vleugels ontstaan voornamelijk wanneer sprake is van een hoge populatiedichtheid tijdens de gevoelige pre-adulte fase, of later in het groeiseizoen wanneer gevleugelde individuen op zoek gaan naar een nieuwe waardplant.^{11,12}

Groene perzikluizen kunnen zich zowel geslachtelijk als ongeslachtelijk voortplanten.¹³ Geslachtelijke voortplanting vindt plaats in de herfst en winter, wanneer de bladluizen eieren leggen die overwinteren. In de warme maanden, of in een warme kas, zullen bladluizen zich ongeslachtelijk voortplanten. Hierbij leggen de bladluizen geen eieren, maar baren deze levende jongen die meteen na de geboorte beginnen met het voeden aan plantsappen.¹³ Deze parthogenetische vrouwtjes krijgen 6 tot 17 dagen na de geboorte nakomelingen (nimfen), waarbij het gemiddelde rond de 10 à 11 dagen ligt.¹⁴ Hogere

temperaturen versnellen het ontwikkelingsproces.¹⁵ Eén vrouwtje krijgt per dag gemiddeld 1,6 nimfen.¹⁴ Hierdoor plant de bladluis zichzelf snel in grote getale voort.⁹

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om wildtype virale genoomsequenties in planten tot expressie te brengen met behulp van inoculatie met *A. tumefaciens*. De werkzaamheden zullen plaatsvinden in een PKM-II compartiment met sluis. Daarnaast zullen alle planten altijd in een insectenkooi staan wanneer hier insecten op zijn geplaatst (geweest). De planten waar de bladluizen aan worden geïntroduceerd staan op een plateau in een waterbak met een zeepoplossing. Het overplaatsen van bladluizen zal plaatsvinden boven een witte ondergrond op een plateau in een waterbak met zeepoplossing. De planten zullen handmatig en voorzichtig water gegeven worden. Er zullen gedurende het hele experiment gele vangplaten in het kascompartiment hangen.

4.1 Productie van gg-plantenvirus in planten

De aanvrager wil gebruik maken van wildtype suikerbietplanten (*B. vulgaris*). Deze planten zullen worden geïnoculeerd met genetisch gemodificeerd (gg-) *A. tumefaciens* waardoor plantvirale vectoren met de volledige coderende sequentie van TuYV in de plant worden gebracht. Door inoculatie met gg-*A. tumefaciens* zal de virale sequentie tot expressie komen in plantencellen en zullen de planten verder door TuYV worden geïnficeerd. Het virus zal gelijk zijn aan het wildtype virus. Omdat het virus geproduceerd zal worden met behulp van een gg-*A. tumefaciens*, wordt deze aangemerkt als gg-plantenvirus.

4.2 Plaatsing van Groene perzikluizen op geïnficeerde planten

1 à 2 weken na inoculatie met de gg-*A. tumefaciens* worden er bladluizen op de plant gezet. De opgepotte planten zullen in een insectenkooi op een plateau in een waterbak met een zeepoplossing worden geplaatst. Per systemisch geïnficeerd blad zullen 2 tot 3 klemkooitjes bevestigd worden, met daarin 10 bladluizen. Deze bladluizen zijn bij aanvang van het experiment 3 à 4 dagen oud.

4.3 Doorzetten van bladluizen op ongeïnficeerde planten

Na 3 dagen op de plant worden de bladluizen met een natgemaakt penseel uit de klemkooitjes verwijderd, geteld, en overgezet op een suikerbietzaailing in dezelfde insectenkooi. De aanvrager geeft aan dat bladluizen niet gemakkelijk van een plant vallen. Het overzetten zal plaatsvinden boven een wit vel papier dat geplaatst wordt op een plateau in een bak met zeepwater. De zaailingen zullen – samen met de mogelijk geïnficeerde bladluizen – individueel verpakt worden in een nylon zakje en in de insectenkooi blijven staan. Het aantal bladluizen per zaailing zal volgens de aanvrager gering zijn en er zou geen sprake zijn van ‘crowding’. De bladluizen blijven 3 à 4 dagen op de zaailing in de nylon zak.

Na het overzetten van de bladluizen op de zaailingen worden de agro-geïnoculeerde planten in een andere insectenkooi geplaatst. Ook hier staan de planten op een plateau in een waterbak met een zeepoplossing. Er zal gedurende één week dagelijks worden gecontroleerd of er bladluizen zijn

achtergebleven. Deze zullen mechanisch worden gedood. De planten zullen hier ongeveer 3 weken blijven staan, waarna ze vernietigd zullen worden door ze te autoclaveren.

4.4 Verwijderen van bladluizen van de planten

Na 3 à 4 dagen van incubatie zullen de nylon zakjes worden verwijderd van de zaailingen. Per plant worden de bladluizen – die dan 9-11 dagen oud zijn – en hun eventueel geproduceerde nakomelingen geteld en mechanisch gedood. De zaailingen zullen gedurende één week dagelijks worden gecontroleerd op mogelijk achtergebleven bladluizen. Vanaf 3 weken nadat de bladluizen op de zaailingen gezet zijn, zal wekelijks bladmateriaal afgenomen worden om door middel van RT-qPCR te toetsen of de gebruikte zaailingen geïnfecteerd zijn met TuYV. Na maximaal 6 weken vanaf de incubatie met de mogelijk geïnfecteerde bladluizen zal het experiment beëindigd worden, waarna de planten worden vernietigd door ze te autoclaveren.

5. Eerder COGEM advies

In 2013 heeft de COGEM onderzoek laten uitvoeren naar de mogelijkheden voor inperkingsmaatregelen bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde geleedpotigen (onder andere insecten).¹⁶ Zo heeft de COGEM geformuleerd dat voor kleine geleedpotigen zoals bladluizen de maaswijdte van gaas en verplaatsing door luchtstromen extra aandacht vereist.¹⁷ De COGEM heeft naar aanleiding van dit onderzoeksrapport een basis-set van maatregelen opgesteld als uitgangspunt voor inperking van gg-geleedpotigen. 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.

In 2021 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met onder andere adulte bladluizen in combinatie met verschillende plantvirale vectoren.¹⁸ Hierbij werden aanvullende maatregelen gesteld, omdat er mogelijk na afloop van het experiment eieren, larven en insecten op de plant, in de insectenkooi of klimaatkamer achter konden blijven.

6. Overweging

6.1 Plantenvirussen en inoculatie

Bij de aangevraagde werkzaamheden worden planten gebruikt waarin wildtype genoomsequenties van plantenvirussen tot expressie gebracht door middel van agro-inoculatie (plantvirale constructen die met behulp van *gg-A. tumefaciens* in de planten worden geïntroduceerd). Bij de aanvraag is echter geen gedetailleerde informatie overlegd over de virale constructen. De COGEM merkt op dat indien er alleen gebruik wordt gemaakt van wildtype genoomsequenties, 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.

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.¹⁹ De COGEM merkt op dat de inperkingsmaatregelen die noodzakelijk zijn om te voorkomen dat de virussen die geproduceerd zijn met behulp van *A. tumefaciens* zich verspreiden, ook de eventuele uitsleep van de *A. tumefaciens* zullen voorkomen.

6.2 Eigenschappen van de insecten en populatiedichtheid

De COGEM wijst er op dat de effectiviteit van de inperkingsmaatregelen afhankelijk is van de populatiedichtheid van de organismen in het experiment. De populatiedichtheid is van belang bij bladluizen, die gevoelig zijn voor 'crowding', wat de kans op ontsnapping hoger maakt omdat zij onder zulke omstandigheden mogelijk vleugels kunnen vormen.¹¹ Het aantal bladluizen dat in deze werkzaamheden gebruikt zal worden is klein. Daarbij is het van belang dat de insecten niet langer dan de duur van het experiment op de planten aanwezig blijven. De COGEM acht de kans op 'crowding' verwaarloosbaar klein wanneer de werkzaamheden worden uitgevoerd binnen de gestelde termijn en met kleine aantallen insecten.

Bij aanvang van de aangevraagde werkzaamheden zal gebruik worden gemaakt van 3 à 4 dagen oude bladluizen: kleine en mobiele insecten die plantenvirussen kunnen overdragen. Wanneer de bladluizen van de zaailingen worden afgehaald zijn deze 9 à 11 dagen oud. De tijd die nodig is voor bladluizen om te ontwikkelen tot adult is ten dele afhankelijk van de temperatuur waarop de experimenten uitgevoerd worden. De COGEM acht het mogelijk dat er adulte bladluizen aanwezig zijn wanneer de nylon zakjes verwijderd worden. Omdat er in de proefopzet geen sprake zal zijn van 'crowding', is de kans verwaarloosbaar klein dat er gevleugelde bladluizen aanwezig zijn in de nylon zakjes. Wel dient er rekening gehouden te worden met de aanwezigheid van zowel nimfen als adulte bladluizen wanneer de nylon zakjes verwijderd worden.

6.3 Insectengaas

Bij de aangevraagde werkzaamheden worden – in een insectenkooi – bladluizen in een klemkooitje gezet, of op een zaailing die omsloten wordt door een nylon zakje. Er is aangegeven dat de maaswijdtes van het gaas van de insectenkooi en het klemkooitje geschikt is voor bladluizen. De maaswijde van het nylon zakje is niet verder gespecificeerd. Ook is niet beschreven of en hoe het nylon zakje gesloten wordt. De COGEM is van oordeel dat het ontsnappen van de insecten uit de huidige proefopstelling beperkt kan worden door een maaswijde te gebruiken die geschikt is voor bladluizen en door het nylon zakje aan de onderzijde af te sluiten, bijvoorbeeld door de plantenpot te omwikkelen met een elastiek.

6.4 Insectenvallen

De aangevraagde werkzaamheden met de planten en bladluizen zullen plaatsvinden in een insectenkooi in een PKM-II compartiment met sluis, waarbij de insecten in klemkooitjes of nylon zakjes zitten. De aanvrager geeft aan dat er gedurende het experiment gele insectenvallen aanwezig zullen zijn in het kascompartiment.

De COGEM heeft eerder geadviseerd om werkzaamheden met gg-geleedpotigen in een verblijf te laten plaatsvinden waarbij de werkruimte een sluis heeft.²⁰ Hierbij achtte de COGEM het noodzakelijk dat er zowel in de werkruimte als in de sluis vallen geplaatst worden. Bij het plaatsen van insectenvallen dient bovendien rekening gehouden worden met de aantrekking van verschillende kleuren vangplaten op verschillende insecten. Bovenstaande in overweging nemende kan de COGEM zich vinden in de beschreven proefopstelling waarbij gele vangplaten in de PKM-II compartimenten zijn geplaatst. De COGEM adviseert hierbij de gele vangplaten ook in de sluis te plaatsen.

6.5 Insectenvrij maken van de insectenkooien en planten

Na het verwijderen van de bladluizen van de planten, blijven de planten maximaal 4 weken in de insectenkooi staan. Zoals eerder opgemerkt zullen er zeer waarschijnlijk nog insecten op de planten aanwezig zijn bij de beëindiging van het experiment. De aanvrager geeft hierbij aan gedurende één week elke dag te controleren op de aanwezigheid van bladluizen. De COGEM adviseert dat de controle met één week verlengd dient te worden iedere keer dat er een bladluis wordt gevonden.

Het kan niet volledig worden uitgesloten dat er na het verwijderen van de planten geen insecten in de insectenkooi achterblijven. Eventueel in de kooi achtergebleven insecten dienen gedood te worden. De COGEM merkt verder op dat niet geheel uitgesloten kan worden dat er insecten terecht komen in de klimaatkamer, derhalve zal de gehele klimaatkamer waarin de insectenkooi zich bevindt behandeld moeten worden om eventuele insecten te doden.

7. Advies

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden in PKM-II met sluis, met inbegrip van de onderstaande aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

- De planten worden gehuisvest in insectenkooien die geplaatst zijn in de van toepassing zijnde categorie van fysische inperking PKM-II;
- De insectenkooi heeft gaas met een maaswijdte die geschikt is voor Groene perzikluizen;
- De planten staan in de insectenkooi op een plateau omringd door zeepwater;
- De bladluizen op de planten zijn omgeven door een klemkooitje of nylon zakje. De klemkooitjes en nylon zakjes dienen een maaswijdte te hebben die geschikt is voor Groene perzikluizen. De nylon zakjes met bladluizen dienen aan de onderzijde afgesloten te worden;
- Bij aanvang van het experiment en bij het overzetten tussen de planten worden alle Groene perzikluizen geteld. Het overzetten van de Groene perzikluizen gebeurt boven een witte ondergrond;
- Planten waarvan Groene perzikluizen zijn verwijderd, worden dagelijks gecontroleerd op aanwezigheid van eventueel achtergebleven individuen tot 1 week na het vinden van de laatste individuen;
- De Groene perzikluizen worden aan het einde van het experiment gedood;

- In de PKM-II ruimte en de aangrenzende sluisruimte zijn vallen aangebracht die geschikt zijn voor de Groene perzikluis;
- De opgepotte planten staan in plastic bakken waarin run-off water wordt opgevangen. Na gebruik wordt de inhoud van de bakken gesteriliseerd en de bakken ontsmet;
- Na afloop van het experiment dienen mogelijk aanwezige insecten in de insectenkooi en PKM-II ruimte gedood te worden.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Taxonomy of *Turnip yellows virus*. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202203790&taxon_name=Turnip%20yellows%20virus (bezoekt op 9-2-2024)
2. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2024-01-01> (bezoekt: 5-2-2024)
3. Ng JC & Perry KL (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol. Plant Pathol.* 5: 505-511
4. Schliephake E *et al.* (2000). Investigations on the vector transmission of the *Beet mild yellowing virus* (BMVY) and the *Turnip yellows virus* (TuYV). *J. Plant. Dis. Prot.* 107: 81-87
5. Jones RAC *et al.* (2007). Yield-limiting potential of *Beet western yellows virus* in *Brassica napus*. *Aust. J. Agric. Res.* 58: 788-801
6. Nancarrow N *et al.* (2022). Symptomless *Turnip yellows virus* infection causes grain yield loss in lentil and field pea: A three-year field study in south-eastern Australia. *Front. Plant Sci.* 13: 1049905
7. Waarneming.nl Bladluis <https://waarneming.nl/species/28187/> (bezoekt op 12-2-2024)
8. Waarneming.nl. Groene perzikluis - *Myzus persicae* <https://waarneming.nl/species/158834/> (bezoekt op 12-2-2024)
9. Koppert. Groene perzikluis - Bestrijding, schade en ontwikkeling <https://www.koppert.nl/uitdagingen/bestrijding/bladluizen/groene-perzikluis/> (bezoekt: 5-2-2024)
10. Groenkennisnet Beeldenbank – Bladluizen <https://www.beeldenbankgewasbescherming.nl/space/BEEL/9053662/Bladluizen> (bezoekt: 12-2-2024)
11. Müller CB *et al.* (2001). The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecol. Entomol.* 26: 330-340
12. Abbot P *et al.* (2018). Chemical ecology and sociality in aphids: Opportunities and directions. *J. Chem. Ecol.* 44: 770-784
13. Simon JC *et al.* (2010). Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids. *C. R. Biologies* 333: 488-496
14. Capinera JL (2008). Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). In: Capinera JL (eds) *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht
15. Liu S & Meng X (1999). Modelling development time of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) at constant and natural temperatures. *Bull. Entomol. Res.* 89: 53-63
16. Booi K (2013). Options for containment of genetically modified mobile arthropods. Wageningen University & Research Centre. COGEM onderzoeksrapport CGM/2013-02

17. COGEM (2013). Inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen onder ‘ingeperkt gebruik’. COGEM advies CGM/130416-01
18. COGEM (2021). Advies planten met plantvirale constructen in combinatie met insecten. COGEM advies CGM/210920-01
19. Zeidan M & Czosnek H (1994). Acquisition and transmission of *Agrobacterium* by the whitefly *Bemisia tabaci*. Mol. Plant Microbe Interact. 7: 792-798
20. COGEM (2013). Containment measures for activities involving the use of GM arthropods under conditions of ‘contained use’. COGEM advies CGM/130416-01