



AANWIJZING PA-01

IN-VITRO VERMEERDERING VAN POOTAARDAPPELEN 2021-2022

De vaste commissie voor pootaardappelen heeft, gelet op artikel 1.3 van het keuringsreglement, de volgende aanwijzingen voor de productie van in-vitro materiaal van pootaardappelen vastgesteld. Deze zijn van kracht per **1 juli 2021**.

De aanwijzing is als volgt ingedeeld:

1. Definities	2
2. Bepalingen voor producenten	2
2.2 Faciliteiten en ruimten	2
2.3 Voorschriften en protocollen	2
2.4 Richtlijnen Regeling GGO	3
2.5 Administratie.....	3
2.6 Toetsing door producent	3
3. Uitgangsmateriaal en introducties	3
3.1 Herkomst.....	3
3.2 Ontvangst.....	3
3.3 Opslag en opkweek.....	4
3.4 Toetsing ziekten	4
4. Productie microplantjes en microknollen	5
4.1 Stockfase.....	5
4.2 Productiefase (microplantjes en microknollen)	5
5. Productie miniknollen en vitroplantjes	5
5.1 Teelt.....	5
5.2 Toetsing.....	6
6. Certificering en levering	6
7. Classificatie en keuring	7
8. Toezicht	7
BIJLAGE 1	8
BIJLAGE 2	9

In dit document zijn de door de NVWA vastgestelde eisen voor toetsing op Q-organismen opgenomen (bijlage 1). Deze eisen vallen niet onder de verantwoordelijkheid van de NAK.

1. Definities

Deze aanwijzing heeft betrekking op de productie van:

- **Microplantjes** plantjes die onder steriele omstandigheden in-vitro zijn geproduceerd en in-vitro worden geleverd (reageerbuisplantjes).
- **Microknollen** knollen die onder steriele omstandigheden in-vitro zijn geproduceerd (reageerbuisknollen).
- **Vitroplantjes** plantjes rechtstreeks afkomstig van in-vitro geproduceerd materiaal en gegroeid onder ziektevrrije (geconditioneerde) omstandigheden.
- **Miniknollen** knollen rechtstreeks afkomstig van vitroplantjes, gegroeid onder ziektevrrije (geconditioneerde) omstandigheden.

Dit materiaal wordt in deze aanwijzing aangeduid als “in-vitro materiaal” tenzij anders is aangegeven.

Voor de productie van in-vitro materiaal geldt het “schema in-vitro vermeerdering” zoals opgenomen in bijlage 1. Hierin zijn tevens de eisen voor toetsing van de NVWA opgenomen. De productie van in-vitro materiaal wordt onderverdeeld in de fasen screening, in-vitro en in-vivo.

2. Bepalingen voor producenten

2.1 Registratie in-vitro bedrijven

De bedrijven die zich bezig houden met de productie van in-vitro materiaal voor pootgoeddoeleinden, zoals genoemd in hoofdstuk 1, moeten bij de NAK zijn geregistreerd als producent van in-vitro materiaal. Daartoe dient het bedrijf te beschikken over geschikte laboratorium/ kasfaciliteiten/ ruimten en eigen voorschriften zoals in deze aanwijzing nader zijn omschreven. De NAK beoordeelt door middel van een bedrijfsbezoek of wordt voldaan aan de in deze aanwijzing gestelde eisen. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de in-vitro en in-vivo fase.

2.2 Faciliteiten en ruimten

Een bedrijf dient te beschikken over:

- een laboratorium waarin onder steriele omstandigheden kan worden gewerkt in geval van productie van microplantjes en microknollen
- geconditioneerde ruimten in geval van productie van vitroplantjes en miniknollen.

Nadere eisen worden hierna genoemd.

2.3 Voorschriften en protocollen

Het bedrijf dient te beschikken, voor zover van toepassing, over eigen voorschriften/ protocollen voor ontvangst, opslag/ bewaring, codering/ waarborging identiteit, hygiënemaatregelen, bereiding van voedingsmedia, instandhouding, vermeerdering, opslag groeimedium, gewasverzorging, certificering en levering.

2.4 Richtlijnen Regeling GGO

In de screening- en in-vitro fase dient bij de vermeerdering van in-vitro materiaal en eventueel onderzoek minimaal volgens de in de bijlage 2 aangegeven richtlijnen te worden gewerkt, die zijn gebaseerd op de richtlijnen uit de Regeling genetisch gemodificeerde organismen.

2.5 Administratie

De producent dient een goede en inzichtelijke administratie te voeren:

- vastlegging van de identiteit, gezondheidstoestand, bewerkingen en behandelingen van het in-vitro materiaal, zoals opslag, bewaring, monsternamen voor onderzoek, verwijdering (ziek) materiaal, snijden, meristemen, uitplanten, teelthandelingen en afleveren. Gedurende het gehele productieproces dient de identiteit van het materiaal te zijn gewaarborgd door middel van een deugdelijke en visueel herkenbare codering en labeling
- registratie van de afzonderlijke batches groeimedium; batches mogen niet worden gemengd
- registratie van elke 'aanmaak-eenheid' (combinatie batch en ras).

2.6 Toetsing door producent

Het bedrijf kan op verzoek en na onderzoek en toestemming van de NAK de toetsing op bacteriën en virussen zelf uitvoeren. Is dit niet het geval dan dient het onderzoek te worden uitgevoerd door de NAK te Emmeloord.

3. Uitgangsmateriaal en introducties

3.1 Herkomst

Het uitgangsmateriaal voor snelle vermeerdering mag alleen worden genomen uit voor de keuring opgegeven percelen of de opbrengst van goedgekeurde percelen of in-vitro materiaal dat is geproduceerd door een bij de NAK aangesloten producent. Een kweker is gerechtigd uit al het door hem geteelde materiaal van zijn ras te kiezen.

In-vitro materiaal (in-vitro aangeleverd) van Europese herkomst, mits voorzien van een officieel certificaat i.c.m. plantenpaspoort kan direct worden doorvermeerderd tot microknollen, microplantjes, miniknollen en of vitroplantjes.

Materiaal van buiten de EU mag alleen als uitgangsmateriaal worden ingenomen als de NVWA hiervoor een invoervergunning heeft afgegeven en het materiaal door de NVWA is vrijgegeven.

3.2 Ontvangst

Voor de ontvangst en inname van uitgangsmateriaal en in-vitro aangeleverd materiaal dient het bedrijf te beschikken over voorschriften, waarin de werkwijze bij ontvangst is vastgelegd. Het materiaal dient visueel herkenbaar te worden gelabeld en gecodeerd en gescheiden van ander getoetst en ziektevrij materiaal te worden opgeslagen en in stand gehouden. De herkomst van het uitgangsmateriaal en introducties van vitro materiaal moeten worden vastgelegd. In geval van buitenlands materiaal moet een kopie (of origineel indien bedrijf zelf importeert) van het plantenpaspoort (EU) of fytosanitair certificaat (derde landen) worden ingenomen en bewaard. Materiaal zonder bekende herkomst mag niet worden gebruikt.

3.3 Opslag en opkweek

Het uitgangsmateriaal dient ruimtelijk gescheiden van ander in-vitro of in-vivo materiaal te worden opgeslagen en/of in stand gehouden, totdat het is getoetst en vrij is bevonden op de hierna, onder 3.4, genoemde organismen. Handelingen aan dit materiaal dienen zodanig te gebeuren, dat contact en besmetting van ander materiaal is uitgesloten.

Tijdens de opkweek dient het materiaal visueel te worden geïnspecteerd. Zieke en verdacht zieke planten moeten worden verwijderd en vernietigd of eventueel via meristeem cultuur ziektevrij worden gemaakt en opnieuw worden getoetst op de onder 3.4 genoemde ziekten.

3.4 Toetsing ziekten

Introductie (screening)fase:

Het uitgangs(kandidaat)materiaal moet voordat het wordt vermeerderd vrij bevonden zijn van:

- Pectobacterium spp. en Dickeya spp. / Erwinia generiek
- virussen: bladrol, X, S, M, A, Y, V, PMTV en TRV
- bruinrot
- ringrot
- PSTVd

Introductie:

Knollen toetsen op:

- Pectobacterium spp. en Dickeya spp. + generiek Erwinia (PCR)
- bruinrot en ringrot
- bacteriën (Bouillontoets of ander selectief medium); vloeibaar medium gebruiken
- PMTV
- TRV

Moederplant toetsen op:
(gegroeid vanuit knol)

- virussen
- PSTVd

Stengeldelen toetsen op:

- bacteriën (Bouillontoets of ander selectief medium)
- virussen
- PSTVd
- bruinrot
- ringrot

In-vitro materiaal:

Indien het materiaal (microknollen/microplantjes) in-vitro wordt geleverd en is gecertificeerd door de NAK of officieel is gecertificeerd met een plantenpaspoort door een officiële EU-instantie, kan zonder toetsing op hiervoor genoemde ziekten worden gestart met de vermeerdering. Voor buitenlands materiaal moet er een officieel bewijs zijn van toetsing en vrij (bevonden) zijn van PSTVd, ringrot, bruinrot en virussen aanwezig zijn.

Productiefase stock:

Van de 1^e vermeerdering 10 % van de planten van elke lijn toetsen op bruinrot en ringrot. Voor alle verplichte toetsingen zie schema in-vitro vermeerdering (eisen NAK en NVWA).

4. Productie microplantjes en microknollen

4.1 Stockfase

4.1.1 Opslag stock

Het materiaal dat aangehouden wordt als stock dient onder steriele omstandigheden te worden opgeslagen in afgesloten ruimten of compartimenten. Bewerking en behandelingen van het materiaal dienen onder steriele omstandigheden te worden verricht.

4.1.2 Toetsing

Van iedere introductie moet minimaal 10% van het materiaal dat in stock staat in de eerstvolgende vermeerdering worden getoetst op bacteriën met een vloeibaar selectief medium. Voor introductie van buitenlands in-vitro materiaal geldt dat ook op de in 3.4 genoemde virussen moet worden getoetst, indien geen bevestiging van onderzoek hierop aanwezig is. Uit het schone materiaal kan een nieuwe stock worden opgezet. Bij positieve uitslagen dient het al het materiaal van de betreffende lijn te worden verwijderd en vernietigd.

4.2 Productiefase (microplantjes en microknollen)

4.2.1 Bewerken en vermeerderen

Bewerkingen en vermeerderingen dienen onder steriele omstandigheden te worden verricht. Het materiaal moet onder steriele omstandigheden worden opgeslagen in afgesloten ruimten of compartimenten tot het moment van verdere vermeerdering tot vitroplant of miniknol.

4.2.2 Toetsing

Iedere eerste vermeerdering moet minimaal 10% van het materiaal worden getoetst op bacteriën met een selectief medium, tenzij de productie direct is opgezet vanuit stock materiaal dat is geproduceerd op het eigen bedrijf en/of deze toets bij de introductie is uitgevoerd. Bij positieve uitslagen dient minimaal de betreffende bemonsterde productie eenheid te worden verwijderd.

5. Productie miniknollen en vitroplantjes

5.1 Teelt

De teelt van miniknollen dient plaats te vinden in een geconditioneerde ruimte en onder geconditioneerde omstandigheden. Dit houdt in, dat:

- de teelt plaatsvindt in een luisdichte ruimte (ventilatieopeningen dienen luisdicht te zijn afgesloten), die alleen kan worden betreden via een sluis (luisdichte ruimte); de maximum maaswijdte van luizengaas bedraagt 0,49*0,88 mm.
- in de ruimte zich geen ander plantmateriaal bevindt, dat niet rechtstreeks is voortgekomen uit vitro cultures (met uitzondering van een volgende vermeerdering vanuit miniknollen (productie PB1) en teelt vanuit zaad van Europese herkomst zijn wel toegestaan). Plantmateriaal van soorten waarvan bekend is, dat die waardplant zijn van quarantaineziekten van aardappel mogen niet in dezelfde ruimte staan, tenzij kan worden aangetoond dat dit vitromateriaal voorkomt uit vitro cultures die zijn getoetst op de in deze aanwijzing genoemde quarantaineziekten.
- nieuwe potgrond dat is voorzien van het R.H.P. (Regeling Handelspotgronden) keurmerk of ander gelijkwaardig groeimedium wordt gebruikt. Het groeimedium moet zodanig worden

opgeslagen dat geen gevaar bestaat voor besmetting vanuit de omgeving (n.v.t. bij hydroponic systemen).

- het groeimedium* geen contact heeft met de volle grond; teelt in containers op worteldoek is toegestaan mits 'capillair' contact van wortels met de grond is uitgesloten.
- na elke productiecyclus de tabletten/ potten etc. worden schoongemaakt en ontsmet.
- de luizensituatie wordt bewaakt d.m.v. vangbakken of vangplaten.
- ingeval van de aanwezigheid van luizen een deugdelijke bestrijding plaatsvindt. Er dient een beheersplan voor ziekten en plagen aanwezig te zijn.
- het gewas regelmatig moet worden geïnspecteerd op het voorkomen van ziekten, plagen en afwijkingen. In geval van aanwezigheid van ziekten, plagen en afwijkingen, die een risico inhouden voor de kwaliteit, dienen maatregelen te worden genomen.
- onkruid direct moet worden verwijderd.
- geen gebruik mag worden gemaakt van oppervlaktewater. Regenwater is wel toegestaan mits dit wordt opgevangen/opgeslagen in permanente (bijvoorbeeld kunstmatig of ingedamde) bassins mits contact met oppervlaktewater en andere mogelijke bronnen van bruinrotbacteriën voorkomen wordt, minimaal te bereiken door:
 - * geen instroom van oppervlaktewater via drains etc. mogelijk;
 - * vrij houden van onkruidwaardplanten (bitterzoet, grote brandnetel, nachtschade);
 - * geen beregening op aangrenzende kavels/percelen met oppervlaktewater (mag geen risico zijn van afspoeling, overwaaien etc. van oppervlaktewater).
- hygiënevoorschriften op basis van een risicoanalyse aanwezig moeten zijn en personeel/bezoekers hierover zijn/worden geïnstrueerd.

5.2 Toetsing

In de laatste productiecyclus dient van iedere introductie/lijn 0,5% van de planten (monster regelmatig verdeeld over partij; minimaal 4 planten) te worden getoetst op de virussen bladrol, X, S, M, A, Y en V. Toetsing vindt plaats aan het blad.

Bij positieve uitslagen dient minimaal de bemonsterde productie-eenheid te worden verwijderd.

6. Certificering en levering

Het in-vitro materiaal dat in het verkeer wordt gebracht dient te worden gecertificeerd in nieuwe zakken. Het materiaal wordt gecertificeerd als prebasispootgoed (model 110 met rasstatus en model 510 of 910 voor rassen zonder rassenlijst-status) met de aanduiding:

- microplantjes
- microknollen
- miniknollen
- vitroplantjes

Op het certificaat wordt verder vermeld:

- prebasispootgoed **PBTC**
- soort (Nederlands en Latijn)
- ras
- teler(producent)nummer
- datum certificering

* Het medium waarin de teelt van miniknollen plaatsvindt, bijvoorbeeld veensubstanties, klei en cocopeat.

- teeltland
- maat(facultatief); gedrukt of gestempeld
- oogstjaar (productiejaar)
- “EG-plantenpaspoort”
- certificaat nummer
- aantal (knollen of plantjes) of kg, gedrukt of gestempeld
- “GGO” (indien van toepassing)
- code ZP-d1 (Rhizomanie)

Microplantjes en microknollen mogen alleen als zodanig worden gecertificeerd als het in-vitro (steriel) wordt geleverd. In geval van levering van vitroplantjes en van miniknollen direct aan de eindgebruiker kan de sluiting van het fust achterwege blijven. Elk fust moet wel voorzien worden van een certificaat.

De producent kan zonder verdere toestemming de certificaten aanbrenge. De certificaten kunnen worden gebruikt vanaf datum van oogst tot 1 juli daaropvolgend. **Dat geldt ook voor de certificering van microplantjes.**

De producent moet een registratie bijhouden van de gebruikte certificaatnummers gekoppeld aan de afgeleverde hoeveelheden en afleveradressen.

De producent moet van de kweker of vertegenwoordiger toestemming hebben om te certificeren en af te leveren.

7. Classificatie en keuring

Miniknollen, microknollen en vitroplantjes worden bij aangifte voor de keuring beschouwd als uitgangsklasse (**PBTC**). Zie verder Aanwijzing Veldkeuring PA-05 punt 4.6 Uitgangsmateriaal en classificatie.

8. Toezicht

De NAK voert toezicht uit op de productie door middel van bedrijfsbezoeken. Minimaal één keer per jaar zullen de bedrijven worden bezocht. In geval van ernstige tekortkomingen kan certificering worden geblokkeerd.

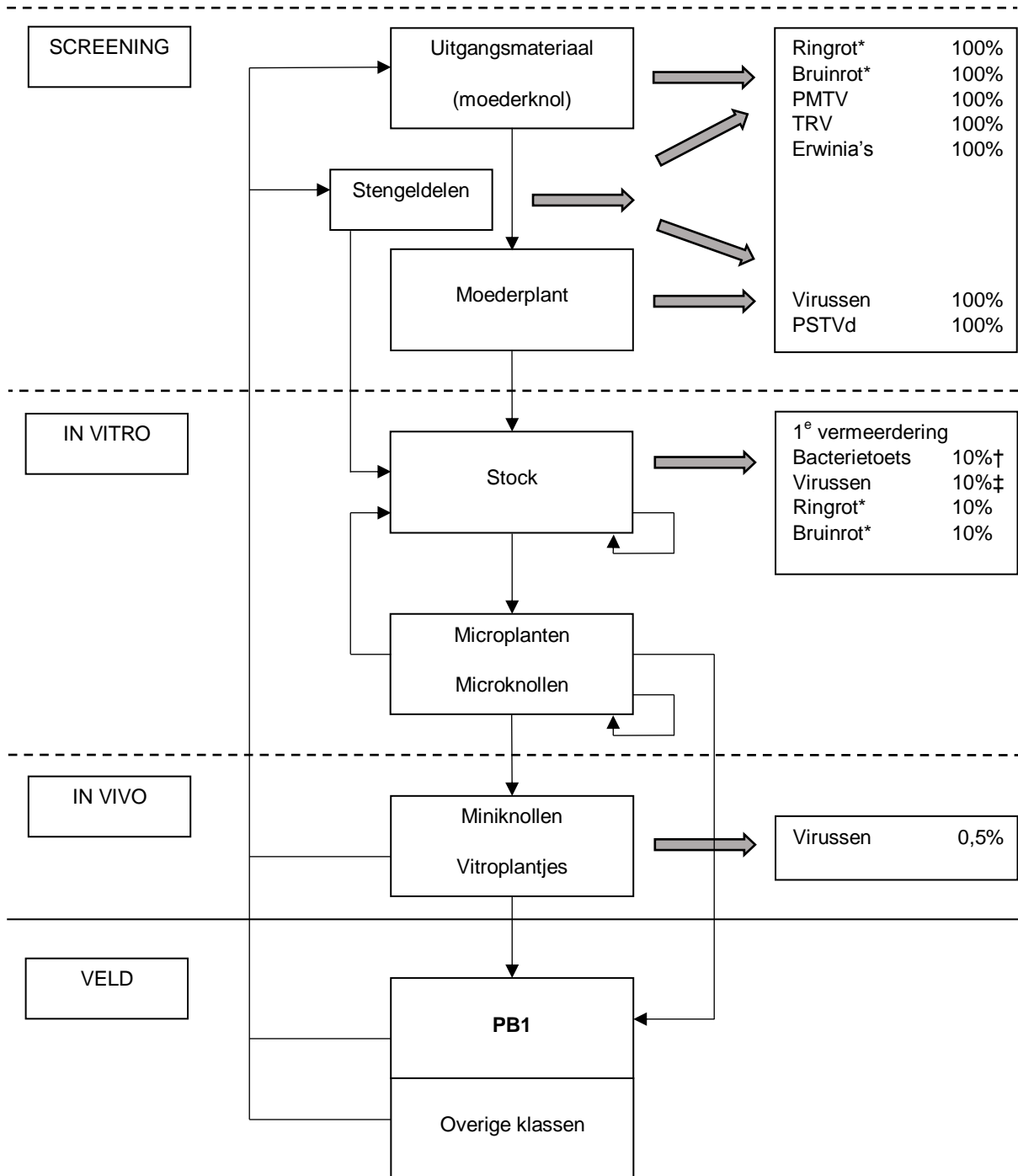
In aanvulling op de jaarlijks audit kan de NAK een survey uitvoeren, voorafgaande aan aflevering aan de eindgebruiker, per ras en producent.

Dr. E. Casteleijn
secretaris vaste commissies
pootaardappelen en zaaizaden

Bijlagen: 2

**Schema in-vitro vermeerdering
(eisen NAK en NVWA*)**

Omvang steekproef



† Kan ook worden uitgevoerd bij introductie.
‡ Geldt alleen voor introducties waarvan geen bewijs van onderzoek aanwezig is.

Richtlijnen voor screening en in-vitro fase in laboratorium; hoofdstuk 2.4. aanwijzing PA-01

Richtlijnen voor screening en in-vitro fase in laboratorium zijn deels gebaseerd op richtlijnen uit de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (fysische inperking categorie ML-I en PL werkruimte).

1. Inrichtingsvoorschriften ML-1

Ruimte

- a. de werkruimte bestaat uit een permanente structuur, waarvan de werkoppervlakten, vloeren, wanden en deuren zijn afgewerkt met niet absorberend materiaal, en waarvan de werkoppervlakte bestand zijn tegen water, desinfecteermiddelen en ontsmettingsreagentia en gemakkelijk zijn schoon te maken
- b. de werkruimte wordt betreden via een deur die is voorzien van namen en telefoonnummers van ten minste één voor de ruimte verantwoordelijk persoon.

Uitrusting

- c. een autoclaaf is aanwezig op de locatie
- d. een wastafel en een dispenser voorzien van zeep, of een voorziening waarmee handen met een gevalideerde methode ontsmet kunnen worden is aanwezig in de werkruimte
- e. in de werkruimte of sluis is een aparte kapstok voor werkkleding aanwezig
- f. apparatuur is in deugdelijke staat

2. Werkvoorschriften ML-1

Algemeen

- a. de werkruimte wordt schoon en netjes gehouden;
- b. eten, drinken, roken, het aanwezig hebben van eet- of drinkgerei, het aanbrengen van cosmetica en het opslaan van voedsel en dranken in de werkruimte zijn verboden;
- c. pipetteren met de mond is verboden;
- d. ongedierte mag niet aanwezig zijn;
- e. na besmetting worden besmette oppervlakten direct gedesinfecteerd;
- f. door morsen van of ongevallen met quarantaine organismen besmette kleding wordt voor het wassen gesteriliseerd of gedesinfecteerd;
- g. persoonlijke bezittingen waaronder kleding die niet gedragen wordt, worden buiten de werkruimte opgeborgen.

Tijdens werkzaamheden

- h. tijdens de werkzaamheden zijn de deuren en de ramen van de werkruimte gesloten;
- i. er wordt passende beschermende kleding gedragen. Deze kleding wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten;

Beëindigen werkzaamheden

- j. de werkoppervlakten worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;
- k. bij het verlaten van de werkruimte worden de handen gewassen met zeep, of ontsmet met een gevalideerde methode.

Afval en besmet materiaal

- I. al het biologische afval en besmet materiaal wordt verzameld in breukvaste, lekdichte containers die gesloten kunnen worden of in een gelijkwaardige verpakking. Het afval wordt geïnactiveerd voordat het uit het laboratorium verwijderd wordt of wordt ter onmiddellijke verbranding aangeboden aan een afvalverbrandingsinstallatie.