

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
dhr. J.J. Atsma  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

DATUM: 29 augustus 2011  
KENMERK: CGM/110829-01  
ONDERWERP: Advies ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde sluipwespen (*Nasonia vitripennis*)

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde sluipwespen in het kader van de vergunningaanvraag 'opzetten van transgene *N. vitripennis* wespen met behulp van het vector PiggyBac voor onderzoek naar het gedrag van het insect' (IG 11-049) van de Rijksuniversiteit Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

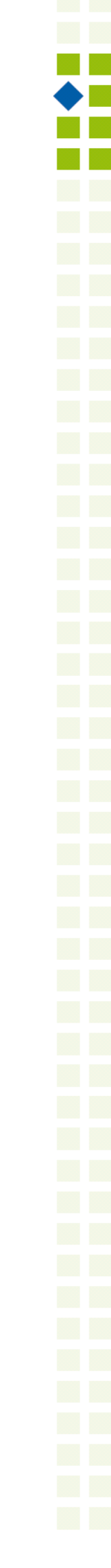
De COGEM is verzocht te adviseren over het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde sluipwespen (*Nasonia vitripennis*). *Nasonia vitripennis* komt overal ter wereld voor. Het is een parasitoïde sluipwesp van verschillende soorten vliegen. De vrouwtjeswespen leggen hun eieren in de poppen van deze vliegen die op organisch materiaal zoals rottend vlees en uitwerpselen te vinden zijn.

De aanvrager wil het gedrag van *N. vitripennis* onderzoeken. De D-I ruimte is voorzien van een sluis die wordt afgesloten door een deur en een gordijn van insectengaas. De sluipwespen worden in insectenkooien, buizen of flessen gehouden. Voordat deze geopend worden, worden de insecten geïmmobiliseerd met behulp van CO<sub>2</sub>.

Na afloop van het experiment worden de sluipwespen gedood door autoclaving. Ook alle materialen die met de gg-sluipwespen in aanraking kunnen zijn geweest worden geautoclaveerd. Voor transport naar de elders in het gebouw aanwezige autoclaaf moeten de sluipwespen en de eventueel in de gebruikte materialen aanwezige sluipwespen door bevriezing geïmmobiliseerd worden. Transport van deze materialen naar de autoclaaf vindt plaats in goed afgesloten zakken of containers.

De COGEM wijst erop dat er tijdens eventuele onvoorziene incidenten waarbij gg-sluipwespen voortijdig zijn bijgekomen of mogelijk zijn ontsnapt speciale aandacht noodzakelijk is om te voorkomen dat gg-sluipwespen via werkkleding en dergelijke buiten het verblijf gebracht zouden kunnen worden.

De COGEM is van mening dat wanneer de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *N. vitripennis* sluipwespen in een D-I ruimte worden uitgevoerd die is aangepast aan werkzaamheden met gg-insecten en wanneer daarbij enkele aanvullende maatregelen in acht genomen worden, de risico's van werkzaamheden met deze gg-sluipwespen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen, het hieruit voortvloeiende advies en het onderliggende onderzoeksrapport treft u hierbij als bijlagen aan.

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman

Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs

Dr. I. van der Leij

# Ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde sluipwespen (*Nasonia vitripennis*)

## COGEM advies CGM/110829-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde (gg-) sluipwespen (*Nasonia vitripennis*). De aanvrager wil gg-sluipwespen gebruiken om het gedrag van deze sluipwespen te onderzoeken. De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *N. vitripennis* of andere gg-sluipwespen. Wel heeft zij eerder geadviseerd over de afdoding van gg-insecten<sup>1</sup> en over de inperking van genetisch gemodificeerde *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera exigua* en diverse bladluissoorten.<sup>2,3</sup>

### Kenmerken van *Nasonia vitripennis*

*Nasonia vitripennis* behoort tot de Bronswespen (Hymenoptera: Chalcidoidea) en is een sluipwesp van zo'n 3 mm lang die als modelorganisme wordt gebruikt in de evolutionaire en ontwikkelingsbiologie. *N. vitripennis* plant zich voort via arrhenotokie. Dit is een bijzondere vorm van voortplanting (parthogenese) waarbij uit onbevuchte eieren mannetjes ontstaan, terwijl uit bevruchte eieren vrouwtjes ontstaan.<sup>4</sup>

*N. vitripennis* is een parasitoïde sluipwesp van verschillende soorten vliegen zoals Bromvliegen (Diptera: Calliphoridae) en Dambordvliegen (Diptera: Sarcophagidae).<sup>5</sup> De vrouwtjeswespen leggen hun eieren in de poppen van deze vliegen. Zij voeden zich met het lichaamsvocht van de vliegenpoppen en waarschijnlijk ook met nectar.<sup>11</sup>

Voordat de volwassen vrouwtjeswespen hun eieren in de vliegenpop leggen, injecteren zij gif in de vliegenpop. Dit gif verhindert het optreden van afweerreacties in de vliegenpop en blokkeert de ontwikkeling van de vlieg. Ook worden door het gif voedingsstoffen voor de larven vrijgemaakt.<sup>6</sup> Een geparasiteerde vliegenpop ontwikkelt zich niet tot een volwassen vlieg, maar gaat dood. Na het inbrengen van het gif legt de vrouwtjeswesp eieren in de vliegenpop. Na zo'n twee dagen komen er larven uit de eieren, die zich met het weefsel van de vliegenpop voeden en zich binnen de vliegenpop verpoppen.<sup>7</sup> Na ongeveer twee tot drie weken knagen de volwassen sluipwespen zich een weg naar buiten en komen uit de vliegenpop tevoorschijn.<sup>7,8</sup>

De mannetjes komen iets eerder tevoorschijn dan de vrouwtjes en wachten bij de vliegenpop totdat de vrouwtjes verschijnen, waarna ze met hen paren. Na de paring gaan de vrouwtjeswespen op zoek naar een nieuwe vliegenpop om eieren in te leggen.<sup>9</sup>

Mannetjeswespen hebben kleine, rudimentaire vleugels en kunnen daardoor niet of nauwelijks vliegen.<sup>10</sup> Vrouwtjeswespen vliegen wel. De langste waargenomen vlucht van een vrouwtjeswesp duurde meer dan 2 uur.<sup>11</sup>

*N. vitripennis* komt overal ter wereld voor. Zij kan in gematigde klimaatgebieden van Noord-Amerika, Europa en Noord-Azië, waarin de beschikbaarheid van vliegenpoppen in de winter beperkt is, overleven door in diapauze te gaan. Dit is een periode waarin de ontwikkeling van het insect stilstaat. Bij *N. vitripennis* wordt diapauze in de moeder geïnduceerd (o.a. door

daglengte, temperatuur, afwezigheid van gastheren)<sup>12</sup>, en zij programmeert haar nakomelingen om in diapauze te gaan. De nakomelingen gaan in het vierde en laatste larvale (instar) stadium in diapauze. Dit gebeurt op de dag waarop de larve zich normaal gesproken verpopt (dag 6 na het uitkomen van de larve).<sup>13</sup> De larven kunnen een diapauze periode van twee jaar nog overleven, waarna ze zich normaal tot volwassen insecten ontwikkelen.<sup>9</sup>

### **Genetische gemodificeerde *N. vitripennis***

De aanvrager (Rijksuniversiteit Groningen) wil het gedrag van *N. vitripennis* onderzoeken met behulp van genetische modificatie. Het gedrag van de gg-sluipwespen wordt met behulp van een microscoop bekeken. Dit gebeurt in een D-I ruimte. Ook worden de weefsels van de gg-sluipwespen met behulp van microscopie onderzocht.

De aanvrager zal de eieren en/of larven genetisch modificeren via micro-injectie op D-I inperkingsniveau. De sluiwespen worden genetisch gemodificeerd met neuronale genen en koolhydraatmetabolisme genen van *N. vitripennis* zelf. Ook zullen de reporter genen GFP en DsRed en afgeleiden hiervan worden gebruikt. Deze genen zijn respectievelijk afkomstig van de kristalkwal (*Aequorea victoria*) en de schijfanemoon (*Discosoma* spp.). Om de expressie van de geïntroduceerde genen te reguleren worden promotoren van *N. vitripennis* of van *D. melanogaster* gebruikt.

De genetische modificatie wordt uitgevoerd met behulp van het piggyBac systeem, dat uit twee plasmiden bestaat, die beide op de veel gebruikte pUC18 vector gebaseerd zijn.

Het pBac-[3xP3-ECFPaf] plasmide bevat een gencassette, die aan beide kanten geflankeerd wordt door een 13 bp inverted en een 19 bp subterminale repeat. Deze repeat regio's worden herkend door het piggyBac transposase, dat op een helperplasmide tot expressie wordt gebracht. Het transposase eiwit zorgt ervoor dat de gencassette in het genoom van *N. vitripennis* wordt ingebouwd.

De gencassette bevat het 'gen van interesse' en een reporter gen dat codeert voor een fluorescerend eiwit. Dit reporter gen staat onder controle van de 3xP3 promotor van *D. melanogaster* die zorgt voor expressie van het gen in de ogen van het insect. De aanwezigheid van het fluorescerende eiwit in de ogen van getransformeerde *N. vitripennis* zorgt ervoor dat genetisch gemodificeerde nakomelingen gemakkelijk geselecteerd kunnen worden.

Het opgroeien en kweken van de genetisch gemodificeerde *N. vitripennis* gebeurt op D-I inperkingsniveau.

Het piggyBac transposase gen, dat onder controle staat van de *hsp70* promotor van *D. melanogaster*, is op een helper plasmide (phsp-pBac) aanwezig en kan zelf niet in het genoom van *N. vitripennis* worden ingebouwd omdat de 13 bp inverted en de 19 bp subterminale repeat aan de 5' kant van het gen verwijderd zijn.

### **Overwegingen en advies**

De vergunningaanvraag betreft werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *N. vitripennis* onder ingeperkt gebruik, waarbij ontsnapping van de sluiwespen voorkomen moet worden om ervoor te zorgen dat gg-sluipwespen zich niet in het milieu verspreiden. *N. vitripennis* is een sluiwesp die wereldwijd voorkomt en zich voortplant via arrhenotokie. Dit betekent dat er uit onbevuchte eieren mannetjes ontstaan, terwijl uit bevruchte eieren vrouwtjes ontstaan. *N. vitripennis* parasiteert vliegpoppen van verschillende soorten vliegen zoals Bromvliegen

(Diptera: Calliphoridae) en Dambordvliegen (Diptera: Sarcophagidae), die voorkomen op organisch materiaal zoals rottend vlees en uitwerpselen.

Het vervaardigen, opkweken en de gedraganalyses van de genetisch gemodificeerde *N. vitripennis* vinden plaats in een D-I ruimte die aan werkzaamheden met gg-insecten is aangepast. Gezien de aard van de gg-organismen moeten hierbij een aantal aanvullende maatregelen worden genomen om ontsnapping van genetisch gemodificeerde *N. vitripennis* te voorkomen. Conform eerdere COGEM adviezen over genetisch gemodificeerde insecten<sup>1,2</sup> zijn onder andere de volgende voorschriften van toepassing:

*Inrichtingsvoorschriften:*

- Het verblijf heeft een sluis waarvan de opening aan de buitenkant is voorzien van een deur en de opening aan de binnenkant is afgesloten met een gordijn van insectengaas. De deur is aan de onderzijde voorzien van veegborstels en aan de zij- en bovenkant zijn tochtstrips in de sponning aangebracht.
- Kapstokken voor werkkleding zijn in de sluis aangebracht; kapstokken voor dagelijkse kleding zijn buiten het verblijf aangebracht.
- Alle ventilatieopeningen zijn voorzien van insectengaas.
- Een voor de betreffende insecten aangepaste elektrische insectenval, vangplaten en, indien bruikbaar, een voedselval zijn in het verblijf en in de sluis aangebracht.
- Een autoclaaf is in het gebouw aanwezig en een diepvries is in de sluis aanwezig.

*Werkvoorschriften:*

- Het vervoer van gg-sluipwespen gebeurt in breuk- en lekvrije gesloten containers.
- Na afloop van het experiment worden de gg-sluipwespen geautoclaveerd. Voor transport naar de autoclaaf worden de gg-sluipwespen gedurende 10 uur in de in de sluis aanwezige -20°C vriezer bevroren om hen te immobiliseren. Het transport naar de autoclaaf gebeurt in een voor *N. vitripennis* volledig afsluitbare, breuk- en lekvrije container.
- Werkkleding wordt voordat deze de D-I ruimte verlaat gedurende minimaal 10 uur in de in de sluis aanwezige -20°C vriezer bevroren zodat eventueel op de kleding aanwezige insecten geïmmobiliseerd worden. Daarna wordt de werkkleding in goed afgesloten zakken of containers verpakt en geautoclaveerd.
- Besmet materiaal (zoals geparasiteerde vliegenpoppen) en afval dienen minimaal 10 uur in de in de sluis aanwezige -20°C vriezer te worden bevroren voordat zij worden geautoclaveerd. Voor transport naar de autoclaaf worden de besmette materialen en/of het afval in goed afgesloten zakken of containers verpakt.
- Open handelingen met gg-sluipwespen (volwassenen en larven) en geparasiteerde vliegenpoppen dienen zoveel mogelijk voorkomen te worden zodat de kans dat sluiwespen of vliegenpoppen door incidentele luchtstromen worden verplaatst geminimaliseerd wordt.
- Om ontsnapping van genetisch gemodificeerde *N. vitripennis* tijdens handelingen te voorkomen worden de insecten voordat insectenkooien (en dergelijke) geopend worden, geïmmobiliseerd door gedurende minimaal 2 minuten pure CO<sub>2</sub> in de container (van maximaal 75 ml) met maximaal 300 sluiwespen te blazen. Om de sluiwespen immobiel te houden worden ze in een op ijs gekoelde petrishaal geschud of op een matje waar CO<sub>2</sub> uitkomt.

Daarnaast wijst de COGEM erop dat er tijdens eventuele onvoorziene incidenten waarbij gg-sluipwespen voortijdig zijn bijgekomen of zijn ontsnapt, de gg-sluipwespen bijvoorbeeld via werkkleding in de sluis of via het lichaam of haar van de medewerker buiten het verblijf gebracht zouden kunnen worden. Daarom is de COGEM van mening dat bij eventuele incidenten speciale aandacht noodzakelijk is om te voorkomen dat gg-sluipwespen met de medewerker meeliften, bijvoorbeeld door in de sluis de werkkleding direct te bevriezen en te autoclavieren en de medewerker daar visueel te laten controleren op de aanwezigheid van gg-sluipwespen.

De COGEM is van mening dat wanneer de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *N. vitripennis* sluiptwespen in een D-I ruimte worden uitgevoerd die is aangepast aan werkzaamheden met gg-insecten en wanneer daarbij de eerder genoemde aanvullende maatregelen in acht genomen worden, de risico's van werkzaamheden met deze gg-sluipwespen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. COGEM (2005). Afdoding van genetisch gemodificeerde insecten. COGEM Advies CGM/050215-04
2. COGEM (2000). Advies kennisgeving GGO 00-063. COGEM Advies CGM/001016-01
3. COGEM (2001). Transgene landbouwinsecten. COGEM Advies CGM/010424-01
4. Verhulst EC (2011). Genetic basis of sex determination in the haploidiploid wasp *Nasonia vitripennis*. PhD thesis. Rijksuniversiteit Groningen
5. Werren Lab – Department of Biology – University of Rochester (2011). Nasonia research. Internet [www.rochester.edu/College/BIO/labs/WerrenLab/WerrenLab-NasoniaResearch.html](http://www.rochester.edu/College/BIO/labs/WerrenLab/WerrenLab-NasoniaResearch.html). dd 22 augustus 2011
6. Laboratorium voor Zoofysiologie – Universiteit Gent (2011). Studie over de sluiptwesp *Nasonia vitripennis* [www.zoofysiologie.ugent.be/onderzoek\\_nasonia.htm](http://www.zoofysiologie.ugent.be/onderzoek_nasonia.htm) dd 22 augustus 2011
7. Zweverink Y (2011). Werken met wespen: 'n moal wat aans. [www.yvonnezweverink.nl/artikel-in-vakblad-impuls/](http://www.yvonnezweverink.nl/artikel-in-vakblad-impuls/) dd 22 augustus 2011
8. Werren JH and Loehlin DW (2009). Strain maintenance of *Nasonia vitripennis* (parasitoid wasp). Cold Spring Harb Protocol 2009(10): pdb.prot5307
9. Grillenberger BK (2009). Biogeography, population genetics and mating systems of natural *Nasonia* populations. PhD thesis. Rijksuniversiteit Groningen.
10. Werren JH (2000). Nasonia: an ideal organism for research and training. Internet [www.rochester.edu/College/BIO/labs/WerrenLab/nasonia/NASworkshop.pdf](http://www.rochester.edu/College/BIO/labs/WerrenLab/nasonia/NASworkshop.pdf) dd 23 augustus 2011
11. King B (1993). Flight activity in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). Journal of Insect Behaviour 6: 313-321
12. Saunders DS (1965). Larval diapause of maternal origin: induction of diapause in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). J. Exp. Biol. 42: 495-508
13. Wolschin F and Gadau J (2009). Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*. PLoS ONE 4: e6394