

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

DATUM 3 september 2014
KENMERK CGM/140903-02
ONDERWERP Advies inperking van werkzaamheden met gg-*Tribolium castaneum*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van de adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 14-046 met de titel 'Visualisatie van eiwitexpressie in *Drosophila melanogaster* en *Tribolium castaneum* embryo's' van de Universiteit Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van en inperkende maatregelen voor handelingen met genetische gemodificeerde kastanjebruine rijstmeelkevers. De kastanjebruine rijstmeelkever, *Tribolium castaneum*, voedt zich op graanproducten en vormt een belangrijke plaag in graanopslagplaatsen. Hoewel deze kevers zich hoofdzakelijk lopend verplaatsen, zijn zij ook in staat over beperkte afstanden te vliegen. Of de kevers daadwerkelijk vliegen lijkt afhankelijk van de temperatuur. Om de embryonale ontwikkeling van *T. castaneum* in kaart te brengen wil de aanvrager deze kevers genetisch modificeren.

De COGEM adviseert de werkzaamheden met gg-*T. castaneum* uit te voeren in een D-I ruimte. Zij adviseert daarbij de volgende inperkende maatregelen te nemen. Ten eerste is de COGEM van mening dat de D-I ruimte voorzien moet zijn van een sluis met een binnendeur van (tenminste) gevalideerd insectengaas. Om de kans dat *T. castaneum* zich vliegend in de ruimte verspreidt te minimaliseren dient de omgevingstemperatuur in deze ruimte op maximaal 22,5°C te worden gehouden. Tijdens de werkzaamheden moeten werkkleding en overschoenen of werkschoenen worden gedragen om uitsleep van gg-*T. castaneum* via de medewerker te voorkomen. Na afloop van de experimenten moeten de gg-kevers worden gedood en moeten de werkkleding en de materialen die met gg-*T. castaneum* in aanraking zijn geweest met een gevalideerde methode worden ontsmet. Aan het einde van de werkzaamheden moeten de werkoppervlakken gedesinfecteerd worden en voor het verlaten van het verblijf moeten de handen worden ontsmet. Tot slot adviseert de COGEM de werknemers goed te instrueren over de leefwijze van *T. castaneum* en het belang van de omgevingstemperatuur voor het inperken van de mobiliteit van gg-*T. castaneum*.



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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. ir. C.J.H. Booij van Plant Research International.

Inperking van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Tribolium castaneum*

COGEM advies CGM/140903-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag van de Universiteit Leiden met als titel 'Visualisatie van eiwitexpressie in *Drosophila melanogaster* en *Tribolium castaneum* embryo's'. De adviesvraag is beperkt tot de inschaling van de productie van en de handelingen met gg-*T. castaneum*. De aanvrager wil de embryonale ontwikkeling van de *T. castaneum* in beeld brengen door de expressie van de markereiwitten EGFP en Lifeact.¹ Speciale aandacht gaat daarbij uit naar de ontwikkeling van de serosa. Dit is een extra-embryonaal membraan, dat het ei beschermt tegen dehydratie en in bijvoorbeeld de fruitvlieg niet aanwezig is.² Om de ontwikkeling van de serosa in beeld te kunnen brengen wil de aanvrager de expressie van EGFP onder controle brengen van regulatoire sequenties van genen die van nature in de serosa van *T. castaneum* tot expressie komen.

Kenmerken van *Tribolium castaneum*

Tribolium castaneum, ook bekend als de kastanjebruine rijstmeelkever behoort tot de orde van de *Coleoptera* (kevers) en de familie *Tenebrionidae* (zwartlijven).³ *T. castaneum* is ongeveer 3-4 mm lang en heeft een kastanjebruine kleur.^{4,5} De dekschilden zijn fijn gestreept. *T. castaneum* plant zich geslachtelijk voort. Een volwassen vrouwtje legt kleine cilindrische witte eitjes. De eitjes zijn ca. 0,5 mm lang. Onder optimale condities kan zij tot 11 eitjes per dag leggen. Gemiddeld legt een volwassen vrouwtje echter 2-3 eitjes per dag.⁶ Gedurende haar leven legt zij ca. 400 eitjes, maar dit kan afhankelijk van de condities oplopen tot 1000 eitjes. Na 3 tot 9 dagen komen er gelige larven met een lichtbruine kop uit de eieren. De larven kunnen tot 8 mm lang worden en vervellen 7-8 maal.^{6,7} Na minimaal 16 dagen verpopt de larve zich. De pop heeft geen cocon en is aanvankelijk geel-wit van kleur. In de loop van de tijd wordt de pop bruiner. Na minimaal 5 dagen komt de kever uit de pop. De kastanjebruine rijstmeelkever kan 1 tot 3 jaar oud worden. De duur van de verschillende ontwikkelingsstadia is afhankelijk van de temperatuur en relatieve luchtvochtigheid.⁶

T. castaneum heeft vermoedelijk een Indo-Australische oorsprong en komt voor in tropische en subtropische gebieden.⁶ De kastanjebruine rijstmeelkever voedt zich met bloem, meel en andere graanproducten en vormt een belangrijke plaag in opslagplaatsen van graanproducten en locaties waar graan wordt verwerkt.^{4,5} Bij hogere temperaturen (>22°C) plant *T. castaneum* zich het hele jaar voort en worden gedurende het hele jaar alle ontwikkelingsstadia aangetroffen.⁶ Bij lagere omgevingstemperaturen (<18°C) en als de meelopslagplaatsen niet worden verwarmd, houdt de voortplanting op en komen de volwassen kevers in een semidormant stadium. In verwarmde meelopslagplaatsen kunnen de kastanjebruine rijstmeelkevers ook in een gematigd klimaat overleven.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over de benodigde inperking van werkzaamheden met gg-*T. castaneum*. In 2009 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling en inperkende maatregelen voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde teken behorend tot de soort *Rhipicephalus microplus* (rundertek).⁸ Zij adviseerde de voorgenomen werkzaamheden uit te voeren in een D-I faciliteit. Daarbij vond de COGEM het van belang dat aanvullende, teek-specifieke, inperkende maatregelen getroffen zouden worden, aangezien de laboratoria voor inperking van micro-organismen zijn toegerust en niet voor de inperking van teken. Om dit te realiseren adviseerde zij enkele, voor *R. microplus* gevalideerde fysieke barrières aan te leggen en gevalideerde methoden voor desinfectie van afval en werkkleding te hanteren.

In 2013 heeft de COGEM in een advies een basisset van voorschriften gegeven die als uitgangspunt kunnen dienen om ontsnapping van gg-geleedpotigen te voorkomen. Daarnaast is een lijst van overwegingen opgesteld die gebruikt kan worden om na te gaan of en met welke maatregelen deze basisset van maatregelen uitgebreid moet worden of eventueel versoerd kan worden.⁹

Naar aanleiding van de publicatie van de ‘Ontwerpregeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013’ in de Staatscourant heeft de COGEM onlangs geadviseerd over de inperkende maatregelen voor werkzaamheden met gg-*Drosophila melanogaster*.¹⁰ Net als bij gg-*R. microplus* adviseerde zij de werkzaamheden uit te voeren in een D-I ruimte. Zij achtte het daarbij van belang dat deze ruimte voorzien was van een sluis met een binnendeur van tenminste gevalideerd insectengaas. Om uitsleep van de gg-insecten te voorkomen, adviseerde de COGEM om tijdens de werkzaamheden werkkleding te dragen en een haarkapje. De werkkleding en de materialen die met gg-*D. melanogaster* in aanraking geweest zijn, dienen na afloop van de experimenten met een gevalideerde methode ontsmet te worden. Tevens moeten de gg-insecten na afloop afgedood worden. Tot slot adviseerde de COGEM de werkoppervlakken te desinfecteren en de handen voor het verlaten van het verblijf ontsmetten.

Voorgenomen werkzaamheden

Voor de vervaardiging van de beoogde gg- *T. castaneum* kevers zal de aanvrager eieren transduceren met een piggyBag vector die de coderende sequentie bevat voor hetzij EGFP, hetzij een Lifeact-EGFP fusie-eiwit. De expressie van deze markergenen zal onder controle staan van verschillende promotersequenties afkomstig uit *T. castaneum* zelf. De transductie vindt plaats door injectie van ieder ei met de piggyBag vector tezamen met een helper-plasmide dat codeert voor het transposase. Na de injectie worden de eieren naar de klimaatcel getransporteerd, waar ze in afgesloten containers kunnen uitkomen en waarna individuele kruisingen ingezet kunnen worden. De gg-kevers worden gehouden in afgesloten bakjes met meel.

Voor de analyse van de eieren worden de kevers eerst met een 600 µm zeef uit het meel gezeefd en in een bak met vers meel geplaatst. Vervolgens worden de eieren met een 300 µm zeef uit het meel gezeefd en op objectglasjes geïmmobiliseerd. De objectglasjes worden in een afgesloten bakje naar de ML-I geclassificeerde microscoopieruimte vervoerd, waar ze met behulp van confocale lasermicroscopie gedurende 1 nacht met tussenpozen van enkele minuten worden gescand. Na afloop

van het experiment worden de eieren afgedood door de microscoopglasjes minstens 10 uur bij -20°C in te vriezen.¹¹

Overwegingen

Algemeen

Bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onder 'ingeperkt gebruik' mogen de betreffende organismen niet ontsnappen. Daarom worden eisen gesteld aan de inrichting van de betreffende ruimte en de manier waarop de werkzaamheden worden uitgevoerd. Dit zijn de zogeheten inrichtings- en werkvoorschriften, die zijn beschreven in bijlage 4: 'Fysische inperking: inrichtings- en werkvoorschriften van de Regeling ggo'.¹²

De inrichtings- en werkvoorschriften voor een gesloten dierversluit zijn gericht op het voorkomen van verspreiding van grotere dieren, zoals muizen, apen, koeien en varkens en niet op de inperking van geleedpotigen. Ook de voorschriften en de inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-micro-organismen in laboratoria zijn niet geschikt om ontsnapping van gg-geleedpotigen te voorkomen. Gg-geleedpotigen zijn vaak klein en kunnen zich actief verplaatsen en verstopten. Geleedpotigen reageren daarbij vaak op licht, geuren en/of vocht. Zij kunnen zich bovendien actief vasthouden aan kleding, huid, haar, planten of bij experimenten gebruikte materialen. Tussen geleedpotigen bestaan grote verschillen in de manier van voortbewegen. Sommige geleedpotigen vliegen, andere kunnen zich met luchtstromen mee laten voeren, terwijl weer andere geleedpotigen lopen. Met al deze eigenschappen moet rekening gehouden worden wanneer werkzaamheden met gg-geleedpotigen beoordeeld worden. De inperkingsmaatregelen die gelden voor een dierversluit moeten bij werkzaamheden met gg-geleedpotigen daarom aangevuld worden met aanvullende maatregelen om ontsnapping van de gg-geleedpotigen te voorkomen.

De COGEM is van mening dat net als vele andere insecten, gg-*T. castaneum* na een eventuele ontsnapping uit de insectenkooien waarin zij worden gehouden, moeilijk terug te vinden kunnen zijn. Daarnaast zijn de eieren en larven erg klein en lastig te zien waardoor ze ongezien meegenomen kunnen worden uit de werkruimte. Zij acht het daarom van belang dat een aantal aanvullende maatregelen worden getroffen om tot een effectieve inperking van gg-*T. castaneum* te komen.

Mobiliteit van T. castaneum

Tenebrionidae soorten zijn over het algemeen slechte vliegers. Veel keversoorten uit deze familie hebben geen vleugels of kunnen hun dekschilden niet uitspreiden. Ook *T. castaneum* wordt zelden vliegend waargenomen en beweegt zich hoofdzakelijk lopend voort.¹³ Toch blijkt uit wetenschappelijk onderzoek dat deze keversoort de graanopslagplaatsen en molens etc. wel verlaat om zich in de omgeving te verspreiden. In een studie van Ridley *et al* wordt melding gemaakt van de vangst van vliegende kevers in vallen die minimaal een kilometer verwijderd waren van de dichtstbijzijnde graanopslag.¹⁴ Of *T. castaneum* vliegt, is afhankelijk van de omgevingstemperatuur, zoals aangetoond in onderzoek van Cox *et al*.¹⁵ Uit deze resultaten blijkt dat voor *T. castaneum* 25°C de minimum temperatuur is voor de initiatie van een vlucht. Bij deze temperatuur vlogen gemiddeld twee uit een groep van 50 wildtype *T. castaneum* kevers. Bij 22.5°C werd echter geen vlucht meer waargenomen.

De aanvrager stelt derhalve voor om de temperatuur in de insectencel op 22,5°C in te stellen om de kans op een vlucht van *T. castaneum* uit te sluiten.

De aanvrager geeft hierbij aan dat voor het onderzoek gebruik gemaakt wordt van een *T. castaneum* stam die door jarenlange inteelt ernstig verzwakt is. De aanvrager stelt jarenlange ervaring met deze specifieke stam te hebben en in deze periode nog nooit een vlucht van *T. castaneum* te hebben waargenomen. Zelfs bij een omgevingstemperatuur van 30°C heeft de aanvrager dit bij deze stam nooit gezien. Om ervoor te zorgen dat de meelkevers tijdens de handelingen niet uit de bakken kunnen klimmen, wordt gebruik gemaakt van bakken met een gladde wand. Dit is een veelgebruikte en beproefde methode om niet-vliegende insecten in te perken.

Alles in overweging nemende, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat *T. castaneum* in het algemeen en de te gebruiken stam in het bijzonder, zich bij een omgevingstemperatuur van 22,5°C vliegend zal kunnen verspreiden. Zij kan echter niet uitsluiten dat ten gevolge van de voorgenomen handelingen incidenteel of per ongeluk kevers, poppen, larven of eitjes buiten de bak kunnen geraken. Gelet op bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat de aanvullende inperkingsmaatregelen gericht moeten zijn op de uitsleep via gebruikte materialen en kleding en het ontsnappen van lopende gg-*T. castaneum*.

Overlevingskansen van *T. castaneum* in Nederland

T. castaneum is een kever die voorkomt in (sub)tropische gebieden. Voor zijn ontwikkeling en overleving is deze kever afhankelijk van een hoge temperatuur (optimum 32,5°C). Onder de 18°C kunnen de volwassen kevers weliswaar overleven, maar komen de embryo's niet tot ontwikkeling.

In Nederland is over de jaren 1981-2010 een gemiddelde dag-nacht temperatuur gemeten van ongeveer 10°C.¹⁶ Dit gemiddelde is ver verwijderd van de gemiddelde temperatuur die nodig lijkt om *T. castaneum* een goede habitat te bieden. Zelfs in de zomermaanden, waarin Nederland een gemiddelde temperatuur kent van ongeveer 17°C wordt deze temperatuur niet gehaald.

Op basis van bovenstaande gegevens acht de COGEM de kans dat *T. castaneum* zich in het Nederlandse milieu blijvend kan vestigen verwaarloosbaar klein. Echter, in zijn ecologische niche, zoals in graanopslagplaatsen kan *T. castaneum* ook in Nederland uitstekend gedijen.

Advies

Inschaling van de vervaardiging van gg-*T. castaneum*

De aanvrager wil *T. castaneum* embryo's transduceren met de markergenen voor Lifeact en EGFP. Lifeact is een peptide van 17 aminozuren, die aan vezelstructuren van actine hecht zonder te interfereren in de dynamiek van actine.¹ Het EGFP is afgeleid van het 'Green Fluorescent Protein' (GFP) dat afkomstig is uit de kwal *Aequorea victoria*. EGFP wordt al jaren gebruikt als marker in biomedisch wetenschappelijk onderzoek. De expressie van deze eiwitten staat onder controle van regulatoire sequenties afkomstig uit *T. castaneum* zelf. Gezien de aard van deze markereiwitten adviseert de COGEM de vervaardiging van gg-*T. castaneum* door middel van microinjectie van betreffend DNA in *T. castaneum* embryo in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

Inschaling van handelingen met gg-*T. castaneum*

Gebaseerd op eerder genoemde overwegingen is de COGEM van mening dat de handelingen met gg-*T. castaneum* op D-I uitgevoerd dienen te worden. Aangezien de standaard geldende voorschriften in dit dierenverblijf gericht zijn op het inperken van grotere dieren dan geleedpotigen acht zij het daarbij van belang dat aanvullende werk- en inrichtingsvoorschriften worden nagevolgd.

Additionele inperkingsmaatregelen

Overeenkomstig haar eerdere advies waarin een basisset van maatregelen voor inperking van geleedpotigen is opgenomen, adviseert de COGEM alle ventilatie openingen in de D-I ruimte te voorzien van insectengaas dat gevalideerd is voor *T. castaneum*, kapstokken te plaatsen in de sluis en de ramen en kieren af te kitten.⁹ Tevens acht de COGEM het van belang dat het betreffende D-I verblijf een sluis bevat met twee deuren, die niet tegelijkertijd geopend kunnen worden. De deuren dienen aan de onderzijde voorzien te zijn van veegborstels en aan de zij- en bovenkant moeten tochtstrips aangebracht worden. De binnendeur mag een gaasdeur zijn met voor *T. castaneum* gevalideerd gaas.

De beperkte mobiliteit van de gg-*T. castaneum* is in belangrijke mate afhankelijk van de temperatuur in de ruimte. Door deze op 22,5 °C te maximaliseren acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat gg-*T. castaneum* zich via de lucht zal verplaatsen. De COGEM adviseert derhalve de D-I faciliteit zodanig uit te rusten dat de temperatuur nauwkeurig gereguleerd kan worden, zodat gegarandeerd kan worden dat deze niet boven de 22,5°C uit komt. De temperatuur in de ruimte dient bovendien duidelijk waarneembaar te zijn voor de medewerkers. Bakken met gladde wanden zijn een bekend en beproefd middel om niet-vliegende insecten in te perken. De COGEM acht het gebruik van gevalideerde bakken afdoende om er voor te zorgen dat de kevers en larven tijdens de handelingen niet uit de bakken kunnen kruipen.

Vanwege de kleine afmetingen zijn de eieren en larven van *T. castaneum* moeilijk waar te nemen en kunnen ze ongemerkt met meelresten buiten de bak geraken en achterblijven of verspreid worden via kleding of schoeisel. Tevens kan de COGEM niet uitsluiten dat bij de voorgenomen handelingen volwassen kevers per ongeluk onopgemerkt buiten de bak terecht komen. Daarom moeten de oppervlakten van de werkbanken na afloop van de werkzaamheden en aan het einde van de dag gedesinfecteerd worden en moeten de handen bij het verlaten van het verblijf ontsmet worden.

Gezien de aard van de voorgenomen werkzaamheden adviseert zij tijdens de werkzaamheden speciale werkschoenen of overschoenen en werkkleding te dragen, om de uitsleep van gg-eitjes, -larven, -poppen of -kevers via kleding of schoenen te voorkomen. Met het oog op de verwaarloosbaar kleine kans dat gg-*T. castaneum* zich in de ruimte via de lucht zal verplaatsen, acht de COGEM het gebruik van een haarnetje niet nodig. De werkkleding dient in de sluis achter te blijven. Voordat de werkkleding en het schoeisel uit de ruimte genomen kan worden, dient het zodanig behandeld te worden dat eventueel aanwezige gg-*T. castaneum* is afgedood.

Ervaringen uit de praktijk met bijvoorbeeld *D. melanogaster* leren dat het voorschrijven van inperkingsmaatregelen alleen onvoldoende garantie biedt om ontsnapping van geleedpotigen te voorkomen. Er zijn talloze gevallen bekend waarbij wild-type geleedpotigen door ontsnapping uit laboratoria buiten aanwezig zijn. Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om medewerkers goed te instrueren over de levenswijze van volwassen kevers en van de larven, het belang van de temperatuur voor de beperkte mobiliteit van de kevers en de potentiële wegen van ontsnapping. Daarnaast adviseert zij vallen te plaatsen. Enerzijds dienen deze vallen als extra vangnet voor een eventuele accidentele ontsnapping van gg-*T. castaneum* uit de bakken. Anderzijds kan met de vallen gemonitord worden of een eventuele onopgemerkte ontsnapping uit de bakken heeft plaatsgevonden.

Samengevat adviseert de COGEM de volgende aanvullende inrichtings- en werkvoorschriften voor de handelingen met gg-*T. castaneum* op D-I inperkingsniveau:

Additionele inrichtingsvoorschriften:

1. Het verblijf heeft een sluis met twee deuren, die niet tegelijkertijd geopend kunnen worden. De deuren zijn aan de onderzijde voorzien van veegborstels en aan de zij- en bovenkant zijn tochtstrips in de sponning aangebracht. De binnendeur mag een gaasdeur zijn met voor *T. castaneum* gevalideerd gaas;
2. De ramen van het verblijf zijn afgekit;
3. Alle kieren zijn afgekit;
4. Alle ventilatieopeningen zijn voorzien van gaas dat gevalideerd is voor *T. castaneum*;
5. Kapstokken voor de werkkleding zijn in de sluis aangebracht;
6. Een diepvriezer (-20°C) is in het verblijf aanwezig;
7. In de werkruimte en de sluis zijn voor *T. castaneum* geschikte vallen, zoals een elektrische val, vangplaten, een voedselval of feromoonval, aangebracht;
8. De temperatuur in het verblijf kan continu gecontroleerd worden en wordt zodanig gereguleerd dat deze niet boven de 22.5°C uitkomt;
9. Een wastafel en een dispenser voorzien van zeep of een andere voorziening voor het gevalideerd ontsmetten van de handen is aanwezig in de werkruimte;
10. Een autoclaaf is in de ruimte aanwezig indien een autoclaaf onderdeel uitmaakt van de gevalideerde methode voor het afdoden van afval of gg-*T. castaneum*.

Additionele werkvoorschriften:

1. Dagelijkse kleding, die niet onder de werkkleding wordt gedragen, dient buiten het verblijf uitgetrokken te worden;
2. Overschoenen of speciaal werkschoeisel vormen een onderdeel van de werkkleding die tijdens de werkzaamheden gedragen moet worden;
3. Alvorens werkkleding het verblijf verlaat wordt deze op een zodanige manier behandeld, dat eventuele aanwezige *T. castaneum* wordt gedood;
4. In het verblijf mogen uitsluitend niet-genetisch gemodificeerde insecten aanwezig zijn indien zij deel uitmaken van het experiment;

5. De gg-*T.castaneum* worden in afgesloten bakken gehouden. Deze bakken hebben gladde wanden waarlangs de kevers en larven niet omhoog kunnen kruipen;
6. Besmet materiaal dient te worden ontsmet en afval moet worden afgedood door een voor *T. castaneum* gevalideerde methode. Hetzelfde gebeurt aan het einde van het experiment met *T. castaneum*;
7. Werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het einde van de werkzaamheden d.w.z. aan het einde van iedere werkdag;
8. Bij het verlaten van het verblijf worden de handen gewassen met zeep of ontsmet met desinfectans;
9. Medewerkers zijn getraind in het werken met gg-*T. castaneum* en hebben kennis over *T. castaneum* m.n. over de eigenschappen die voor de inperking van belang zijn (zoals het vlieggedrag).

Onder navolging van deze aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden met gg-*T. castaneum* op D-I inperkingsniveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Inschaling van handelingen met gg-animale cellen

Gezien de aard van de markergenen waarmee de aanvrager *T. castaneum* wil transduceren en conform artikel 6.5.1. lid e van de Regeling ggo adviseert de COGEM de handelingen met animale cellen afkomstig van gg-*T. castaneum* op ML-I in te schalen.

Referenties

1. Riedl J. *et al.* (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5: 605-607
2. Jacobs C.G.C. *et al.* (2013). The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proc. R. Soc. B.* 280:20131082
3. Krinsky W.L. (2009). Beetles (Coleoptera). In: *Medical and veterinary entomology*. Eds. Mullen G.R. and Durden L.A. Elsevier Academic Press, 101-113
4. Entomology & Nematology, University of Florida (2010). Red and confused flour beetles. Website: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red_flour_beetle.htm (laatst bezocht: 29-08-2014)
5. BioNET-EAFRINET (2011). *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797)-Red Flour Beetle. Website: [http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Tribolium_castaneum_\(Herbst_1797\)_-Red_Flour_Beetle.htm](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Tribolium_castaneum_(Herbst_1797)_-Red_Flour_Beetle.htm) (laatst bezocht: 29-08-2014)
6. Good N.E. (1933). Biology of the flour beetles *Tribolium confusum* Duv. and *T. Ferrugineum* Fab. *J. Agric Res.* 46: 327-334
7. Canadian grain commission (2013). Red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). Website: <http://www.grainscanada.gc.ca/storage-entrepot/pip-irp/rfb-trf-eng.htm> (laatst bezocht: 28-08-2014)

8. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Rhipicephalus microplus* teken. CGM/090907-02
9. COGEM (2013). Inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen onder ingeperkt gebruik. CGM/130416-01
10. COGEM (2014). Inperking van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Drosophila melanogaster*. CGM/140528-01
11. Burks C.S. & Hagstrum D.W. (1999). Rapid cold hardening capacity in five species of coleopteran pests of stored grain. J. Stored Prod. Res. 35: 65-75
12. Ministerie van VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
13. Semeao A.A. *et al.* (2013). Movement of *Tribolium castaneum* within a flour mill. J. Stored Prod. Res. 54: 17-22
14. Ridley A.W. *et al.* (2011). The spatiotemporal dynamics of *Tribolium castaneum* (Herbst): adult flight and gene flow. Mol. Ecol. 20: 1635-1646
15. Cox P.D. *et al.* The effects of temperature on flight initiation in a range of moths, beetles and parasitoids associated with stored products. J. Stored Prod. Res. 43: 111-117
16. Milieu en natuurcompendium (2014). website:
<http://www.compendiumvoordeleefomgeving.nl/indicatoren/nl0004-Meteorologische-gegevens-in--Nederland.html?i=9-54> (laatst bezocht: 28-08-2014)