

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

**DATUM** 25 april 2022  
**KENMERK** CGM/220425-01  
**ONDERWERP** Advies inperkingsmaatregelen bij werkzaamheden met gg-*Drosophila suzukii*  
met een zogenaamde 'split gene drive'

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag (IG 22-046\_2.8-000) met de titel 'CRISPR/Cas9 split gene drive in *Drosophila suzukii*', ingediend door de Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)Suzuki-fruitvliegen (*Drosophila suzukii*). In deze gg-fruitvliegen wordt een zogenaamde 'split gene drive' aangebracht, waarbij door kruising van twee gg-*D. suzukii* lijnen nakomelingen geproduceerd worden waarvan de vrouwtjes onvruchtbaar zijn. De uitvoerder wil de werkzaamheden uitvoeren op inperkingsniveau D-I, met inachtneming van de aanvullende voorschriften die gelden voor gg-*Drosophila melanogaster* volgens de Regeling ggo. De COGEM is gevraagd of deze aanvullende voorschriften ook toegepast kunnen worden voor werkzaamheden met gg-*D. suzukii*.

De Suzuki-fruitvlieg is een plaaginsect dat schade aan fruitgewassen veroorzaakt, voornamelijk bij vruchten met een dunne schil. Deze fruitvlieg wordt sinds 2012 ook in Nederland waargenomen. De soort kan zich goed aanpassen aan verschillende omstandigheden en is beter bestand tegen kou dan *D. melanogaster*.

De COGEM heeft eerder de inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-*D. melanogaster* herzien en naast de in de Regeling ggo beschreven maatregelen een aantal aanvullende maatregelen geadviseerd. Het merendeel van de door de COGEM voor gg-*D. melanogaster* geadviseerde maatregelen is ook geschikt voor het inperken van gg-*D. suzukii*, maar op enkele punten is aanpassing nodig om de inperking van gg-*D. suzukii* te waarborgen. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de kans op uitsleep van gg-*D. suzukii* verwaarloosbaar klein is indien de voorgenomen werkzaamheden plaatsvinden op D-I inperkingsniveau met inachtneming van de door de COGEM geadviseerde aanvullende voorschriften voor werkzaamheden met gg-*D. suzukii*.



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

*Dit advies is mede tot stand gekomen met de inbreng van T. Bukovinszki PhD werkzaam bij de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit en prof. dr. B. Wertheim werkzaam bij het Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences van de Rijksuniversiteit Groningen.*

# Inschaling van werkzaamheden met gg-*Drosophila suzukii* fruitvliegen waarin een zogenaamde split gene drive is aangebracht

## COGEM advies CGM/220425-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) Suzuki-fruitvliegen (*Drosophila suzukii*) onder Ingeperkt Gebruik (IG 22-046). De aanvraag is afkomstig van de Wageningen Universiteit en omvat werkzaamheden met gg-*D. suzukii* waarin een zogenaamde ‘split gene drive’ is aangebracht. Hiervoor zijn twee gg-*D. suzukii* lijnen vervaardigd, een lijn waarin het *Cas9*-gen is geïntegreerd en een lijn waarin de ‘guide RNAs’ (gRNAs) zijn geïnsereerd. Nakomelingen van kruisingen van deze lijnen zullen zowel *Cas9* als de gRNAs bij zich dragen wat resulteert in een actieve gene drive. De gene drive is gericht op het verstoren van het ‘*yellow-g*’-gen, waardoor vrouwelijke nakomelingen steriel zijn. De mannelijke nakomelingen zijn wel fertiel. Doordat het *Cas9*-gen en de gRNAs zich op verschillende chromosomen bevinden, zullen zij onafhankelijk overerven. Als een gg-*D. suzukii* en een wild-type *D. suzukii* fruitvlieg zouden kruisen, zijn in de nakomelingen *Cas9* en de gRNAs niet meer tegelijkertijd aanwezig. De gene drive is dan niet meer actief.

De uitvoerder is voornemens de werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau D-I, met inachtneming van de aanvullende voorschriften die gelden voor gg-*Drosophila melanogaster* volgens de Regeling ggo (Bijlage 9, onder 9.1.4.1.2.3.2).<sup>1</sup> De COGEM is gevraagd of de aanvullende inperkingsmaatregelen die gelden voor werkzaamheden met gg-*D. melanogaster* ook toegepast kunnen worden voor werkzaamheden met gg-*D. suzukii*.

### 2. Biologie van *Drosophila suzukii*

*Drosophila suzukii*, die ook wel de Suzuki-fruitvlieg wordt genoemd, is een fruitvlieg die behoort tot de familie *Drosophilidae*, orde *Diptera*. De soort is ook bekend onder de Engelse naam ‘spotted wing drosophila’, die verwijst naar een zwarte vlek die de mannetjes op beide vleugels hebben. Oorspronkelijk komt de soort uit Zuidoost Azië, maar tegenwoordig wordt de Suzuki-fruitvlieg wereldwijd aangetroffen. In Nederland is *D. suzukii* voor het eerst in 2012 gevonden.<sup>2,3</sup> De soort wordt beschouwd als een exoot die zich in het Nederlandse klimaat kan handhaven.<sup>4</sup>

*D. suzukii* is nauw verwant aan *Drosophila subpulchrella/pulchrella* en kan hiermee kruisen.<sup>5,6</sup> *Drosophila subpulchrella/pulchrella* en andere *Drosophila*-soorten die tot dezelfde taxonomische groep als *D. suzukii* behoren (i.e. *Drosophila biarmipes* en *Drosophila takahashii*) komen niet in Nederland voor.<sup>7,8</sup> *D. melanogaster* en *D. simulans* zijn de soorten die in Nederland het meest verwant zijn aan *D. suzukii*.<sup>7,8</sup> Er zijn voor zover bij de COGEM bekend geen publicaties over de kruisbaarheid van *D. suzukii* met deze soorten. Er wordt geschat dat de laatste gezamenlijke voorouder van deze soorten en *D. suzukii* circa 10 miljoen jaar geleden leefde. Experts achten het zeer onwaarschijnlijk dat *D. suzukii* met *D. melanogaster* of *D. simulans* kan kruisen.

Een volwassen Suzuki-fruitvlieg heeft rode ogen en is ongeveer 2 tot 3 mm lang. De vleugels hebben een spanwijdte van 6-8 mm.<sup>17</sup> De mannetjes zijn iets kleiner dan de vrouwtjes. Kenmerkend voor *D. suzukii* zijn de vleugelvlekken bij mannetjes en de grote gezaagde legboor bij vrouwtjes. *D. suzukii* kan onder verschillende klimaatomstandigheden overleven, en de vlieg kan in het volwassen stadium gedurende enkele maanden overwinteren. Er worden twee seizoensgebonden morfotypen onderscheiden, het zomer- en wintermorfotype die verschillen in fysiologie en gedrag.<sup>9,10</sup> Het zomer-morfotype ontwikkelt zich bij temperaturen vanaf 20°C en is vaak kleiner en lichter van kleur dan het wintermorfotype, dat zich onder koelere temperaturen (10-15°C) ontwikkelt.<sup>9,11</sup> *D. suzukii* kan zich acclimatiseren aan koude temperaturen.<sup>11,12</sup> Het wintermorfotype is beter bestand tegen koude temperaturen dan het zomer-morfotype; volwassen vliegen van het zomer-morfotype kunnen bij 10°C niet langer dan 3 maanden overleven, terwijl het winter-morfotype gedurende enkele maanden bij 1°C kan overleven.<sup>13</sup> In een studie is gerapporteerd dat de lethale temperatuur waarbij 50% van *D. suzukii* overlijdt (LT<sub>50</sub>) na ~1 seconde blootstelling bij een afnemende temperatuur (1°C per minuut) voor het zomertype -10°C betreft, en voor het wintertype -15,3°C. De LT<sub>90</sub> bedraagt respectievelijk -15,6°C en -19,5°C.<sup>13</sup> Wanneer de fruitvliegen eerst geacclimatiseerd worden aan koude of fluctuerende temperaturen, neemt de overlevingskans toe.<sup>12</sup>

*D. suzukii* bevat 4 paar chromosomen, waarvan één paar heteromorfe seks-chromosomen (XX/XY).<sup>14</sup> Vrouwtjes leggen meestal enkele eieren per vrucht, die na 2 tot 72 uur uitkomen. De eieren zijn wit en ongeveer 0,6 mm lang en 0,2 mm breed. De larvale ontwikkeling duurt 3 tot 13 dagen, vindt plaats in de vrucht en bestaat uit drie stadia. In het laatste larvale stadium zijn de larven ongeveer 3,9 mm groot. De poppen zijn goudkleurig en ontwikkelen zich in 3 tot 15 dagen. De gemiddelde generatieduur is bij temperaturen tussen de 25 en 30°C ongeveer twee weken<sup>2,17</sup> en bij temperaturen tussen de 12 en 15°C ongeveer zes weken (pers. comm. expert). In totaal zal een vrouwtje gedurende haar leven ongeveer 400 eieren leggen.

De Suzuki-fruitvlieg heeft een zeer grote waardplantenreeks en kan van bijna 200 plantensoorten uit 73 genera gebruik maken.<sup>15</sup> De Suzuki-fruitvlieg is een plaaginsect dat schade aan fruitgewassen veroorzaakt, voornamelijk bij vruchten met een dunne schil. Waar andere fruitvliegsoorten hun eieren in beschadigd overrijp fruit leggen, kunnen Suzuki-fruitvlieg vrouwtjes dankzij een gezaagde legboor hun eieren in onbeschadigd rijpend fruit leggen. De eieren worden net onder de schil van de vrucht gelegd, en zijn te herkennen aan twee kleine luchtpijpjes die door de schil naar buiten steken en met een loep of microscoop waarneembaar zijn.<sup>16</sup> De larven beschadigen de vruchten door vraat aan het vruchtvlees. Tevens kunnen hierdoor secundaire ziekteverwekkers (schimmels, bacteriën) de vrucht binnendringen waardoor de vrucht sneller zal rotten. De gewassen die het meest gevoelig zijn voor aantasting door *D. suzukii*, zijn kleinfruit (zoals frambozen, aardbeien, bramen en bessen) en steenvruchten (bijvoorbeeld kersen en pruimen).<sup>2,17</sup>

De economische impact van deze fruitvliegsoort is groot, niet alleen door verliezen vanwege een slechtere kwaliteit en kwantiteit van de oogst, maar ook door de preventieve en bestrijdingsmaatregelen die getroffen moeten worden.<sup>18</sup> Omdat de Suzuki-fruitvlieg zich snel in verschillende Europese landen

heeft gevestigd en het praktisch en economisch onuitvoerbaar is fytosanitaire maatregelen op te leggen, heeft de Suzuki-fruitvlieg geen EU-quarantaine status.<sup>2</sup>

### 3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil onderzoek doen naar een zogenaamde split gene drive in *Drosophila suzukii* en zal verschillende kruisingen maken en populatie-experimenten uitvoeren.

#### 3.1 Split gene drive in gg-*D. suzukii*

Om de split gene drive toe te passen, worden twee genetisch gemodificeerde *D. suzukii* lijnen gebruikt: één lijn die het 'CRISPR associated protein 9' (Cas9) tot expressie brengt en één lijn die de gRNAs bevat. In de Cas9 lijn zijn op chromosoom 2R de volgende sequenties geïnsereerd:

- Een gen dat codeert voor Cas9 onder controle van de nanos-promoter. De nanos-promoter zorgt ervoor dat Cas9 in de kiembaan en nauwelijks in somatische cellen tot expressie komt;
- Een gen dat codeert voor 'green fluorescent protein' (GFP) onder controle van de 3xP3-promoter.

De gRNA lijn bevat een insertie in het op chromosoom 3 gelegen *Rpl35A*-gen, dat geconserveerd is en codeert voor een subunit van het ribosomale complex 60S. De insertie bestaat uit:

- Een hergecodeerd deel van een exon van het *Rpl35A*-gen, dat resulteert in hetzelfde eiwit met dezelfde expressie;
- Twee gRNA's die gericht zijn tegen het endogene *Rpl35A*-gen en onder controle van de U6:3-promoter staan;
- Een gen dat codeert voor het fluorescentie eiwit dsRed onder controle van de PUb-promoter;
- Vier gRNA's onder controle van de U6:3-promoter die tegen het *yellow-g*-gen gericht zijn. Het *yellow-g*-gen codeert voor een eiwit dat noodzakelijk is voor het vormen van de eierschaal. Zonder dit eiwit verliezen de eieren hun stevigheid en zakken ze in elkaar. Hierdoor zijn vrouwelijke fruitvliegen die dit eiwit niet vormen steriel.<sup>19</sup>

Na kruising van de twee gg-*D. suzukii* lijnen worden nakomelingen verkregen die zowel het Cas9 als de gRNA's bevatten en wordt de gene drive actief. De vier gRNA's die tegen het *yellow-g*-gen gericht zijn, zorgen ervoor dat dit gen geknipt wordt. Dit verstoort de werking van het gen en resulteert in vrouwtjes die steriel zijn. De gRNA's die tegen het *Rpl35A*-gen gericht zijn, zorgen ervoor dat het *Rpl35A*-gen van *D. suzukii* geknipt wordt. Door homologe recombinatie insereert het *Rpl35A*-gen met het hergecodeerde exon vervolgens op dezelfde plaats als het endogene *Rpl35A*-gen. Het *Rpl35A*-gen is een haplolethaal gen. Dit betekent dat alleen organismen met twee functionele kopieën van dit gen overleven. Indien de insertie van het hergecodeerde *Rpl35A*-gen niet goed verloopt, heeft dit een lethaal effect op de fruitvlieg. Hierdoor ontstaat er minder gemakkelijk resistentie tegen de split gene drive.

Omdat de gRNA's en het *Cas9*-gen zich op verschillende chromosomen bevinden, zullen zij onafhankelijk overerven. Als een gg-*D. suzukii* en een wild-type *D. suzukii* fruitvlieg zouden kruisen, zijn in de nakomelingen Cas9 en de gRNAs niet meer tegelijkertijd aanwezig. De gene drive is dan niet meer actief.

### 3.2 Werkzaamheden met *gg-D. suzukii*

De aanvrager wil de Cas9 en de gRNA lijnen met elkaar kruisen en de nakomelingen hiervan kruisen met wildtype Suzuki-fruitvliegen. Ook wil de aanvrager Cas9 en gRNA lijnen verkrijgen met een andere genetische achtergrond door de Cas9 en gRNA lijnen met wildtype Suzuki-fruitvliegen te kruisen. Vervolgens zullen er kruisingen worden gemaakt tussen Suzuki-fruitvliegen met de Cas9 en de gRNA inserties. De aanvrager zal de nakomelingen van de kruisingen analyseren op fluorescentie en genotype. Ook wil de aanvrager de nakomelingen van de kruisingen tussen de Cas9 en de gRNA lijnen in een populatie van Cas9 Suzuki-fruitvliegen introduceren. De aanvrager zal de populatiegrootte monitoren en de fluorescentie en het genotype van de Suzuki-fruitvliegen in deze populatie analyseren.

De *gg-D. suzukii* worden in glazen flessen met een foam-stop gekweekt. De kruisingen tussen verschillende *gg*-Suzuki-fruitvliegen zullen plaatsvinden in plastic buizen of in glazen flessen met een foam-stop. De populatie-experimenten wil de aanvrager uitvoeren in Bugdorm gaaskooien. De vliegen zullen onder CO<sub>2</sub> verdoving worden verplaatst en geselecteerd of geanalyseerd. De aanvrager wil de werkzaamheden uitvoeren volgens de standaard voorschriften die gelden voor inperkingsniveau D-I met inachtneming van de aanvullende voorschriften voor activiteiten met *gg-D. melanogaster* (9.1.4.1.2.3.2 van de Regeling ggo<sup>1</sup>).

## 4. Eerder COGEM advies

### 4.1 Adviezen over *gg-Drosophila*

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met *gg-Drosophila suzukii*. Wel heeft zij in het verleden adviezen uitgebracht over werkzaamheden met *gg-Drosophila melanogaster* onder ingeperkt gebruik en over het afdoden van *gg-D. melanogaster*.<sup>20,21</sup>

In 2013 heeft de COGEM onderzoek laten uitvoeren naar inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met *gg*-geleedpotigen en heeft zij een generiek advies hierover uitgebracht.<sup>22,23</sup> Het daarop volgende jaar heeft de COGEM de inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met *gg-D. melanogaster* herzien en naast de in de Regeling ggo in paragraaf 9.1.4.1.2.3.2 beschreven maatregelen een aantal aanvullende maatregelen geadviseerd.<sup>24</sup> De combinatie van de in de Regeling ggo opgenomen voorschriften voor werkzaamheden met *gg-Drosophila melanogaster* en de door de COGEM geadviseerde aanvullende maatregelen wordt hieronder samengevat:

- Het verblijf heeft een sluis met twee deuren, die niet tegelijkertijd geopend mogen 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 *D. melanogaster* gevalideerd gaas;
- De ramen van het verblijf zijn afgekit;
- Alle kieren zijn afgekit;
- Alle ventilatieopeningen zijn voorzien van gaas dat gevalideerd is voor *D. melanogaster*;
- Kapstokken voor dagelijkse kleding zijn buiten het verblijf aangebracht;
- Kapstokken voor de werkkleding zijn in de sluis aangebracht;

- Een diepvriezer (-20°C) is in het verblijf aanwezig indien de diepvriezer onderdeel uitmaakt van de gevalideerde methode voor het ontsmetten van besmet materiaal, het afdoden van afval of het afdoden van *D. melanogaster*;
- Een autoclaaf is in de ruimte aanwezig indien de autoclaaf onderdeel uitmaakt van de gevalideerde methode voor het ontsmetten van besmet materiaal, het afdoden van afval of het afdoden van *D. melanogaster*.
- Een wastafel en een dispenser voorzien van zeep of een andere voorziening voor het gevalideerd ontsmetten van de handen is aanwezig in de werkruimte;
- Werkkleding wordt gedragen. Een haarkapje is onderdeel van de werkkleding.<sup>a</sup> Alvorens werkkleding het verblijf verlaat wordt deze op een zodanige manier behandeld, dat eventuele aanwezige *D. melanogaster* wordt gedood, bijvoorbeeld door deze gedurende 10 uur te plaatsen in een in het verblijf aanwezige diepvriezer (-20 °C);
- In het verblijf mogen uitsluitend niet-genetisch gemodificeerde insecten aanwezig zijn indien zij deel uitmaken van het experiment;
- Voorafgaand aan het openen van de insectenkooien worden de insecten geïmmobiliseerd met een gevalideerde methode. Tijdens de werkzaamheden worden de insecten met een gevalideerde methode immobiel gehouden. Na afloop van de handelingen worden de insecten overgezet in een container die gesloten is, voordat de insecten mobiel worden;
- Besmet materiaal dient te worden ontsmet en afval moet worden afgedood met een voor *D. melanogaster* gevalideerde methode, bijvoorbeeld door deze minimaal 10 uur te bevriezen bij -20°C. Hetzelfde gebeurt aan het eind van het experiment met de *D. melanogaster*;
- In de werkruimte en de sluis zijn voor *D. melanogaster* geschikte vallen, zoals een elektrische val, vangplaten, een voedselval of feromoonval, aangebracht.
- Werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;
- Bij het verlaten van het verblijf worden de handen gewassen met zeep of ontsmet met desinfectans;
- Medewerkers zijn getraind in het werken met gg-*D. melanogaster* en hebben kennis over *D. melanogaster* m.n. over de eigenschappen die voor de inperking van belang zijn (zoals gedrag).

## 5. Overweging

De aanvrager wil onderzoek doen naar een zogenaamde split gene drive in *Drosophila suzukii* en zal hiervoor verschillende gg-*D. suzukii* lijnen met elkaar kruisen en tevens populatie-experimenten uitvoeren. De COGEM is gevraagd of de voorschriften zoals deze gelden voor werkzaamheden met gg-*D. melanogaster* ook voldoende zijn voor het inperken van gg-*D. suzukii*.

De COGEM merkt op dat de aanvullende voorschriften voor werkzaamheden met gg-*D. melanogaster* zoals in de Regeling ggo vermeld, afwijken van de maatregelen die de COGEM nodig acht om ontsnapping van gg-*D. melanogaster* te voorkomen. Zo heeft de COGEM eerder geadviseerd dat de sluis in plaats van een deur en gordijn met insectengaas, twee deuren dient te hebben. Ook is opgemerkt dat het insectengaas gevalideerd dient te worden voor *D. melanogaster* en dat een haarkapje onderdeel

---

<sup>a</sup> Hierbij dient opgemerkt te worden dat met een haarkapje tevens bescherming voor een baard of snor wordt bedoeld.

uit dient te maken van de werkkleding. Daarnaast heeft de COGEM gesteld dat werkkoppervlakken gedesinfecteerd moeten worden en handen moeten worden ontsmet. De argumentatie voor de aanvullende voorschriften is in een eerder advies uiteengezet.<sup>24</sup> In de hierop volgende paragrafen zal de COGEM enkel beargumenteren wanneer om de inperking van *gg-D. suzukii* te waarborgen, afgeweken dient te worden van de eerder door haar geadviseerde aanvullende maatregelen voor werkzaamheden met *gg-D. melanogaster*.

#### ***D. suzukii* verschilt van *D. melanogaster* in temperatuurtolerantie**

Beide fruitvliegsoorten lijken qua uiterlijk veel op elkaar en zijn vrijwel even groot. Vanwege deze overeenkomsten is de COGEM van oordeel dat veel van de voor *gg-D. melanogaster* geadviseerde maatregelen ook voor werkzaamheden met *gg-D. suzukii* gehanteerd kunnen worden. *D. suzukii* is echter beter bestand tegen koude temperaturen dan *D. melanogaster*. Dit geldt zowel voor het zomer- als voor het winter-morfotype. Volgens de aanvullende voorschriften voor werkzaamheden met *gg-D. melanogaster*, zoals vermeld in de Regeling ggo (9.1.4.1.2.3.2), dienen *gg*-fruitvliegen, werkkleding, besmet materiaal en afval minimaal 10 uur in een -20°C vriezer geplaatst te worden om de (eventueel aanwezige) *gg*-fruitvliegen te doden. Omdat *D. suzukii* zowel in het poppen, larvale als adulte stadium tolerant is voor koude temperaturen is de COGEM van oordeel dat 10 uur bij -20°C niet voldoende zal zijn om de *gg-D. suzukii* fruitvliegen af te doden. Derhalve adviseert de COGEM om de *gg*-fruitvliegen, de werkkleding, het besmette materiaal en het afval tenminste 48 uur in de -20°C vriezer te plaatsen of deze te autoclavieren.

#### ***Aanvullende inrichtingsvoorschriften***

De COGEM heeft in haar advies uit 2014 geadviseerd dat een D-I verblijf waarin met *gg-D. melanogaster* wordt gewerkt, voorzien moet zijn van twee deuren die niet tegelijkertijd geopend mogen worden. De deuren dienen aan de onderzijde voorzien te zijn van veegborstels en aan de zij- en bovenkant dienen tochtstrips in de sponning aangebracht te zijn. Tevens is aangegeven dat de binnendeur een gaasdeur mag zijn met voor *D. melanogaster* gevalideerd gaas.

De sluis in het D-I dierversluis waarin de *gg-D. suzukii* fruitvliegen worden gehouden, heeft - conform de Regeling ggo - een deur en een gordijn van insectengaas. De COGEM wijst erop dat een deur en een gordijn van insectengaas op zichzelf niet voldoende zijn om ontsnapping van de *gg-D. suzukii* fruitvliegen te voorkomen. Door het ontstaan van kieren rond het gordijn en luchtbewegingen die veroorzaakt worden door beweging van het gordijn, bestaat er een kans dat *gg-D. suzukii* fruitvliegen ontsnappen. Tevens merkt de COGEM op dat het insectengaas in het gordijn of de gaasdeur kapot kan gaan. De COGEM is gelet op het bovenstaande van oordeel dat de sluis van het D-I verblijf twee dichte deuren moet bevatten, die niet tegelijkertijd geopend mogen worden en waarin aan de onderzijde veegborstels zijn aangebracht en aan de zij- en bovenkant tochtstrips in de sponning zijn aangebracht.

In de aanvraag wordt echter aangegeven dat er drie barrières tussen de *gg*-fruitvliegen en hun omgeving zijn. Hierbij wordt als voorbeeld genoemd dat de *gg-D. suzukii* fruitvliegen in een fles in een ‘GMO-tent’ in het D-I verblijf (met sluis) worden gehouden. De COGEM merkt op dat de beschrijving van de proefopzet in de aanvraag zeer summier is en dat in de aanvraag geen verdere gegevens worden verstrekt over deze ‘GMO-tent’. Ook is het onduidelijk of de bugdorm gaaskooien en plastic buizen ook in de



GMO-tent geplaatst zullen worden en of de handelingen met de (verdoofde) fruitvliegen in deze tent uitgevoerd zullen worden. De COGEM is van oordeel dat wanneer alle handelingen met *gg-D. suzukii* fruitvliegen (o.a. het overzetten en analyseren van de fruitvliegen, de kruisingen, de populatie-experimenten en de kweek van de *gg*-lijnen) in de ‘GMO-tent’ worden uitgevoerd en deze tent voorzien is van voor *D. suzukii* of *D. melanogaster* gevalideerd insectengaas, een sluis met een deur en een gordijn van gevalideerd insectengaas voldoende zijn om ontsnapping van de *gg-D. suzukii* fruitvliegen uit het D-I verblijf te voorkomen. Hierbij dient ook de afvalverwerking (dat wil zeggen het ontsmetten van besmet materiaal, het afdoden van het afval en het afdoden van de *gg-D. suzukii* fruitvliegen) plaats te vinden in de ‘GMO-tent’ en dient het afval uit de ‘GMO tent’ en het D-I verblijf dagelijks verzameld en afgedood te worden.

### ***Training van medewerkers***

De aanvrager is voornemens verschillende *gg-D. suzukii* lijnen met elkaar te kruisen en populatie-experimenten uit te voeren. Daarbij zal de aanvrager de populatiegrootte, de fluorescentie en genotypes van de *gg-D. suzukii* fruitvliegen monitoren. Kruisingen kunnen tientallen nakomelingen opleveren en een populatie kan duizenden fruitvliegen bevatten.<sup>25</sup> Bij het maken van de kruisingen, het analyseren van de fruitvliegen en eventuele andere ‘handelingen’ zullen de *gg-D. suzukii* fruitvliegen worden verdoofd met CO<sub>2</sub>. Gezien de geringe afmetingen van de fruitvliegen (2-3 mm) is er een kans dat bij het uitvoeren van de handelingen enkele fruitvliegen kunnen ‘wegwaaien’. Om te voorkomen dat de *gg-D. suzukii* fruitvliegen uit de verdoving ontwaken en wegvliegen moeten zij snel verzameld worden. Ervaring met het uitvoeren van handelingen met *D. suzukii* is hiervoor vereist. Daarom adviseert de COGEM, eender aan haar eerdere advies over werkzaamheden met *gg-D. melanogaster*, om medewerkers te trainen voordat met *gg-D. suzukii* gewerkt mag worden. Hierbij wordt gedacht aan vaardigheidstrainingen o.a. in het verdoven van *D. suzukii* en kennis over het gedrag van *D. suzukii*.

## **6. Conclusie en advies**

Samengevat, adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften voor werkzaamheden met *gg-D. suzukii*:

- Het verblijf heeft een sluis met twee deuren, die niet tegelijkertijd geopend mogen worden. De deuren zijn aan de onderzijde voorzien van veegborstels en aan de zij- en bovenkant zijn tochtstrips in de sponning aangebracht\*;
- De ramen van het verblijf zijn afgekit;
- Alle kieren zijn afgekit;
- Alle ventilatieopeningen zijn voorzien van gaas dat gevalideerd is voor *D. suzukii* of *D. melanogaster*;
- Kapstokken voor dagelijkse kleding zijn buiten het verblijf aangebracht;
- Kapstokken voor de werkkleding zijn in de sluis aangebracht;
- Een diepvriezer (-20°C) is in het verblijf aanwezig indien de diepvriezer onderdeel uitmaakt van de gevalideerde methode voor het ontsmetten van besmet materiaal, het afdoden van afval of het afdoden van *D. suzukii*;

- Een autoclaaf is in de ruimte aanwezig indien de autoclaaf onderdeel uitmaakt van de gevalideerde methode voor het ontsmetten van besmet materiaal, het afdoden van afval of het afdoden van *D. suzukii*.
- Een wastafel en een dispenser voorzien van zeep of een andere voorziening voor het gevalideerd ontsmetten van de handen is aanwezig in de werkruimte;
- Werkkleding wordt gedragen. Een haarkapje is onderdeel van de werkkleding.<sup>a</sup> Alvorens werkkleding het verblijf verlaat wordt deze op een zodanige manier behandeld, dat eventuele aanwezige *D. suzukii* wordt gedood, bijvoorbeeld door deze minimaal 48 uur te plaatsen in een in het verblijf aanwezige diepvriezer (-20 °C).
- In het verblijf mogen uitsluitend niet-genetisch gemodificeerde insecten aanwezig zijn indien zij deel uitmaken van het experiment;
- Voorafgaand aan het openen van de insectenkooien worden de insecten geïmmobiliseerd met een gevalideerde methode. Tijdens de werkzaamheden worden de insecten met een gevalideerde methode immobiel gehouden. Na afloop van de handelingen worden de insecten overgezet in een container die gesloten is, voordat de insecten mobiel worden;
- Besmet materiaal dient te worden ontsmet en afval moet dagelijks worden afgedood met een voor *D. suzukii* gevalideerde methode, bijvoorbeeld door deze minimaal 48 uur te bevriezen bij -20°C. Hetzelfde gebeurt aan het eind van het experiment met de *D. suzukii*;
- In de werkruimte en de sluis zijn voor *D. suzukii* geschikte vallen, zoals een elektrische val, vangplaten, een voedselval of feromoonval, aangebracht.
- Werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;
- Bij het verlaten van het verblijf worden de handen gewassen met zeep of ontsmet met desinfectans;
- Medewerkers zijn getraind in het werken met *D. suzukii* en hebben kennis over *D. suzukii* m.n. over de eigenschappen die voor de inperking van belang zijn (zoals gedrag).

*\*Indien gebruik wordt gemaakt van een sluis waarbij de binnenkant is afgesloten met een gordijn van voor *D. suzukii* of *D. melanogaster* gevalideerd insectengaas of een gevalideerde gaasdeur, dienen alle werkzaamheden, en de afvalverwerking (dat wil zeggen het ontsmetten van besmet materiaal, het afdoden van het afval en het afdoden van de gg-*D. suzukii* fruitvliegen) plaats te vinden in een GMO-tent met gevalideerd insectengaas. Tevens dient het afval uit de GMO tent en het D-I verblijf dagelijks te worden afgedood.*

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de kans op uitsleep van gg-*D. suzukii* verwaarloosbaar klein is, indien de voorgenomen werkzaamheden plaatsvinden op D-I inperkingsniveau met inachtneming van de door de COGEM geadviseerde aanvullende voorschriften voor werkzaamheden met gg-*D. suzukii*. Op dit inperkingsniveau en met inachtneming van de aanvullende werkvoorschriften is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

## 7. Additionele opmerking

De COGEM merkt op dat de aanvraag geen informatie bevat over de kruisbaarheid van *Drosophila suzukii* met andere *Drosophila*-soorten. Zij wijst erop dat de aanvrager bij een eventuele toekomstige aanvraag voor een introductie in het milieu nadere informatie aan zal moeten leveren over de eventuele kruisbaarheid van *D. suzukii* en de *Drosophila*-soorten die in Nederland voorkomen.

## Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01> (bezoekt: 13 april 2022)
2. Wageningen University & Research (WUR, 2013). De Suzuki-fruitvlieg *Drosophila suzukii*, een nieuwe plaag op fruit in Nederland. <https://bit.ly/3KJfbZq> (bezoekt: 13 april 2022)
3. Nederlands Soortenregister. Suzuki-fruitvlieg *Drosophila suzukii* - Exotenpaspoort. [https://www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus\\_ng/app/views/species/nsr\\_taxon.php?id=171518](https://www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/species/nsr_taxon.php?id=171518) (bezoekt: 13 april 2022)
4. Nederlands Soortenregister. Suzuki-fruitvlieg *Drosophila suzukii* - Voorkomen. [https://www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus\\_ng/app/views/species/nsr\\_taxon.php?id=171518&cat=CTA\\_B\\_PRESENCE\\_STATUS](https://www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/species/nsr_taxon.php?id=171518&cat=CTA_B_PRESENCE_STATUS) (bezoekt: 13 april 2022)
5. Lalyer CR *et al.* (2021). Ecological vulnerability analysis for suppression of *Drosophila suzukii* by gene drives. *Glob. Ecol. Conserv.* 32: e01883
6. Romeis J *et al.* (2020). The value of existing regulatory frameworks for the environmental risk assessment of agricultural pest control using gene drives. *Environ. Sci. Policy* 108: 19-36
7. Nederlands Soortenregister. *Drosophila*. [https://www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus\\_ng/app/views/search/nsr\\_search.php?search=drosophila&epi=1](https://www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/search/nsr_search.php?search=drosophila&epi=1) (bezoekt: 20 april 2022)
8. Suvorov A *et al.* (2020). Widespread introgression across a phylogeny of 155 *Drosophila* genomes. *bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.14.422758*
9. Tait G *et al.* (2021). *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): A decade of research towards a sustainable integrated pest management program. *J. Econ. Entomol.* 114: 1950-1974
10. Panel A. (2021). Seasonal biology of *Drosophila suzukii*: Genetic and phenotypic variation in the Netherlands. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.183944897>
11. Stockton DG *et al.* (2018). Phenotypic plasticity promotes overwintering survival in a globally invasive crop pest, *Drosophila suzukii*. *Insects* 9:105
12. Jakobs R *et al.* (2015). Adult plasticity of cold tolerance in a continental-temperate population of *Drosophila suzukii*. *J. Insect Physiol.* 79: 1-9
13. Stephens AR *et al.* (2015). Phenotypic plasticity promotes overwintering survival in a globally invasive crop pest, *Drosophila suzukii*. *Environ. Entomol.* 44: 1619-1626
14. Drosopoulou E *et al.* (2019). The chromosomes of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): detailed photographic polytene chromosomal maps and in situ hybridization data. *Mol. Genet. Genomics* 294: 1535-1546
15. Little CM *et al.* (2020). Plasticity is key to success of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) invasion. *J. Insect. Sci.* 20: 5
16. Wageningen University & Research. Suzuki-fruitvlieg - wat kunnen fruittelers ertegen doen? <https://www.wur.nl/nl/artikel/suzuki-fruitvlieg.htm> (bezoekt: 13 april 2022)

17. Koppert. Suzuki fruitvlieg. <https://www.koppert.nl/uitdagingen/muggen-en-vliegen/suzuki-fruitvlieg/?msclkid=717febb3b97711ec9a020ada5a4d5642> (bezocht: 13 april 2022)
18. Knapp L *et al.* (2021). The economic impact of *Drosophila suzukii*: perceived costs and revenue losses of Swiss cherry, plum and grape growers. *Pest Manag. Sci.* 77: 978-1000
19. Oberdorfer G *et al* (2018). Behavior of homing endonuclease gene drives targeting genes required for viability or female fertility with multiplexed guide RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115: E9343-E9352
20. COGEM (2001). Transgene landbouwinsecten. COGEM advies CGM/010424-01
21. COGEM (2005). Afdoding van genetisch gemodificeerde insecten. COGEM advies CGM/050215-04
22. Booij CJH. Options for containment of genetically modified mobile arthropods. COGEM onderzoeksrapport CGM 2013-02
23. COGEM (2013). Inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen onder 'ingeperkt gebruik'. COGEM advies CGM/130416-01
24. COGEM (2014). Inperking van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Drosophila melanogaster* COGEM advies CGM/140528-01
25. Champer J *et al.* (2020). A CRISPR homing gene drive targeting a haplolethal gene removes resistance alleles and successfully spreads through a cage population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117: 24377-24383 (Supplementary Information)