

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

DATUM 3 juli 2014
KENMERK CGM/140703-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden gg-slibmos *Physcomitrella patens*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de wijziging van de vergunningaanvraag IG 03-049/04 met de titel 'Celdeling, celgroei en celwandvorming bij gist en plant' 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-) slibmos *Physcomitrella patens*. *P. patens* zal gebruikt worden als modelorganisme bij cellulair onderzoek aan planten. In Nederland wordt *P. patens* van ongeveer mei tot november/december als pioniergemeenschap op droogvallende oevers rondom de grote rivieren aangetroffen.

Mossen kennen generatiewisseling (twee fasen) waarbij hun dominante fase de gametofytische fase is. Alleen tijdens hun tweede fase, de sporofytische fase, vindt sporenproductie plaats.

De COGEM adviseert open handelingen met gg- *P. patens*, waarbij geen sporen aanwezig zijn (gametofytische fase), onder ML-I inperkingsniveau uit te voeren. Dergelijke handelingen kunnen ook onder PL-inperkingsniveau plaatsvinden, maar alleen indien deze in een veiligheidskabinet worden uitgevoerd, zodanig dat uitsleep van vegetatieve delen wordt voorkomen. Zij adviseert daarbij aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen.

Open handelingen waarbij gg- *P. patens* sporen vrij kunnen komen, adviseert de COGEM (zowel op ML-I als PL inperkingsniveau) in een veiligheidskabinet uit te voeren, zodanig dat uitsleep van de sporen wordt voorkomen. Op PL-inperkingsniveau moeten daarbij aanvullende werkvoorschriften in acht worden genomen.

Indien aan bovenstaande voorwaarden voldaan wordt, acht de COGEM bij de voorgenomen werkzaamheden met gg- *P. patens* de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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. Michael Stech (Naturalis Leiden) en dr. Heinjo During (Universiteit Utrecht), beiden lid van de Bryologische en Lichenologische werkgroep van de KNNV Vereniging voor Veldbiologie.

Inschaling werkzaamheden met het genetisch gemodificeerde slibmos *Physcomitrella patens*

COGEM advies CGM/140703-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijziging van de vergunning met de titel 'Celdeling, celgroei en celwandvorming bij gist en plant' ingediend door de Wageningen Universiteit. De adviesvraag betreft inschaling van werkzaamheden met het genetisch gemodificeerde (gg) slibmos *Physcomitrella patens*. Het slibmos zal als modelorganisme bij cellulair onderzoek aan planten worden gebruikt. De COGEM heeft nog niet eerder advies uitgebracht over werkzaamheden met mossoorten.

2. Mos

Mossen zijn eenvoudige landplanten die, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de bloeiende zaadvormende planten, niet tot de vaatplanten behoren. Onder de mossen worden de phyla van de bladmossen (Bryophyta), de hauwmossen (Anthocerotophyta) en de levermossen (Marchantiophyta) onderscheiden.^{1,2} *P. patens* behoort tot het phylum van de bladmossen.³

2.1 Levenscyclus van bladmossen

De levenscyclus van de bladmossen kenmerkt zich door een generatiewisseling van twee fasen: een sporofytische diploïde en een gametofytische haploïde fase.¹ In tegenstelling tot bijvoorbeeld zaadvormende planten, is bij mossen de haploïde gametofytische fase (de gametofyt) de dominante fase. Ten opzichte van de gehele levenscyclus duurt de diploïde sporofytische fase (sporenproductie) kort.¹

2.1.1 Sporofytische fase

De sporofytische fase begint met de bevruchting. Uit de eencellige diploïde zygote ontstaat door middel van mitose en cytokinese een multicellulair embryo (sporofyt). Deze sporofyt blijft verbonden aan de mosplant (en is daar afhankelijk van), rijpt en vormt een kapsel. Het kapsel (sporangium of sporendoozje) is met het blote oog zichtbaar en wordt ook wel 'mossenvrucht' genoemd. Vervolgens vindt in het kapsel meiose plaats, waarbij eencellige haploïde sporen ontstaan. Bij de meeste mossoorten gaat het kapsel open met een deksel (operculum), bij sommige soorten komen de sporen bij afbraak van het kapsel vrij.

2.1.2 Gametofytische fase

De gametofytische fase begint met de spore waaruit door middel van mitose en cytokinese zich het draadvormige protonema ontwikkelt. Vervolgens worden hierop mosknopjes gevormd die uitgroeien tot bebladerde mosplanten (gametoforen). De groene (haploïde) mosplant in zijn geheel (protonema en gametofoor) heet gametofyt en groeit meestal in groepen, soms solitair. In speciaal ontwikkelde geslachtsorganen - de antheridia en archegonia, gezamenlijk gametangia genaamd -

worden door middel van mitose haploïde gameten geproduceerd (respectievelijk de mannelijke spermatozoïden en vrouwelijke eicellen). Door bevruchting van de eicel met een spermatozoïde ontstaat in het archegonium de zygote en begint de levenscyclus vervolgens opnieuw.¹

2.2 Voortplanting en verspreiding van bladmossen

Bij bladmossen vindt de seksuele voortplanting (bevruchting) door middel van de geflagelleerde spermatozoïden altijd via een waterweg plaats.¹ Bij bepaalde mossoorten (bijvoorbeeld Zilvermos (*Bryum argenteum*) en Purpersteeltje (*Ceratodon purpurens*)) kan de bevruchting door kleine geleedpotigen als springstaarten en mijten gefaciliteerd worden.^{4,5}

De sporen van bladmossen variëren in grootte waarbij veel mossoorten sporen vormen met een diameter kleiner dan 25 µm (onder meer Zilvermos, Purpersteeltje, Krulmos (*Funaria hygrometrica*)). Deze kunnen over grote afstanden via de wind verspreid worden.^{6,7} Tevens bezitten de meeste bladmossen een specifiek orgaan dat een rol speelt bij het vrijkomen van de sporen uit het kapsel, het peristoom (mondbeslag). Bij sommige mossoorten is het kapsel zodanig opgebouwd, dat de sporen weggeschoten kunnen worden (*Sphagnum*).⁷ Vanaf 25 tot 30 µm neemt - naarmate de diameter van de sporen groter wordt - de mogelijkheid tot windverspreiding af.⁸ Sommige sporen zijn plakkerig en worden door dieren (onder meer insecten, spinnen en vogels) verspreid. Ook vindt sporenverspreiding via water plaats.⁷

Naast seksuele voortplanting kennen bladmossen ook vegetatieve vermeerdering. In principe kan elk losgeraakt stukje mosplant een zelfstandig bestaan gaan leiden.⁹ Vooral bij soorten die zelden of nooit kapsels vormen, vindt vermenigvuldiging door middel van protonema of bladfragmenten plaats, of via speciaal gevormde vegetatieve diasporen.⁹

2.3 Physcomitrella patens

Het groene bladmos *P. patens* behoort tot de familie van de Funariaceae en komt op het noordelijk halfrond in gebieden met een gematigd klimaat algemeen voor.¹⁰ De habitat is doorgaans een slijkachtige bodem, onder meer droogvallende oevers van plassen. In Nederland wordt *P. patens* van ongeveer mei tot november/december als pioniergemeenschap op droogvallende oevers rondom de grote rivieren aangetroffen.^{10,11} De planten groeien solitair of in kleine zoden.¹¹

P. patens is eenhuizig. Zowel antheridia als archegonia ontwikkelen zich op één gametofoor.¹² Voor bevruchting is de aanwezigheid van water een vereiste.^{1,12} Slibmos wordt beschouwd als een kortedagplant. Temperatuur en lichthoeveelheid zijn bepalend voor de ontwikkeling van de geslachtsorganen, de bevruchting en de ontwikkeling van het embryo.¹³

Waarnemingen in Japan hebben aangetoond dat een volledige seksuele levenscyclus van spore tot spore ongeveer 3,5 tot 4,5 maanden in beslag neemt. Daarbij duurt het ongeveer 6 weken voordat een spore ontkiemd is en jonge sporofyten vormt. Binnen 2 tot 3 maanden zijn deze vervolgens gerijpt.¹⁴ Vegetatieve verspreiding van *P. patens* lijkt in de natuur een ondergeschikte rol te spelen echter, door het afbreken van protonema of stukjes blad kan slibmos zich via stromend water verspreiden.

De sporofyt bestaat uit een korte seta (steeltje) en een cleistocarp (gesloten) sporenkapsel.^{15,16} Voor sporenverspreiding dient het kapsel eerst doorbroken te worden, bijvoorbeeld door rotting of mechanische beschadiging.^{7,15} Specifieke organen voor de verspreiding van sporen (operculum, peristoom en annulus (dekselring)) ontbreken bij *P. patens*.^{11,15} *P. patens* sporen zijn 25 tot 44 µm groot en aan de buitenkant voorzien van stekelige papillen van ongeveer 1 tot 2,5 µm.^{11,15,17}

Onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden doorloopt *P. patens* de seksuele levenscyclus, afhankelijk van de gebruikte stam, in ongeveer twee tot vier maanden waarbij de periode van volgroeide gametofoor naar rijpe kapsels ongeveer 3 tot 5 weken in beslag neemt.^{16,18} Daarbij zijn een temperatuur van 15° tot 17°C en een dag/ nachtritme van 8 uur licht/ 16 uur donker bepalend voor de ontwikkeling van de geslachtsorganen, het bevruchtingsproces en de ontwikkeling van het embryo.^{12,13,18} Bij een temperatuur van 25°C en continu daglicht vindt geen ontwikkeling van de geslachtsorganen, bevruchting en ontwikkeling van het embryo plaats.¹³ Bij *in vitro* studies wordt voor vermenigvuldiging doorgaans gebruik gemaakt van vegetatieve vermeerdering.^{19,20}

3. Voorgenomen werkzaamheden

(gg-) *P. patens* zal door middel van fragmentatie en kweek vegetatief vermeerderd worden. Tevens zullen van gefragmenteerd gametofytisch weefsel protoplasten gegenereerd worden die door middel van 'PEG gemedieerde transfectie' genetisch zullen worden gemodificeerd. Daarbij zullen aan de hand van homologe recombinatie diverse gekarakteriseerde - niet voor schadelijke genproducten coderende - DNA-fragmenten afkomstig van plant, vis, insect, schimmel en zoogdier, alsmede verschillende selectiemarkers ingebracht worden in een vooraf bepaald chromosomaal gelegen locus.^{12,21} Aan de hand van lichtmicroscopie zullen vervolgens biologische processen in het plantmateriaal gevisualiseerd en geanalyseerd worden. De aanvrager geeft aan dat tijdens de transfecties, vegetatieve vermeerdering en kweek geen micro-organismen aanwezig zullen zijn.

4. Overweging

Bij werkzaamheden met gg-planten in laboratoria, kweekcellen en kassen moet verspreiding van transgenen naar het milieu worden tegengegaan. De COGEM acht het daarom van belang dat de verspreidingsbiologie van de betreffende gg-plant in kaart gebracht wordt, ten einde vast te kunnen stellen welke inperkende maatregelen genomen dienen te worden. Op basis van de biologische eigenschappen van *P. patens* stelt de COGEM dat bij werkzaamheden met gg-*P. patens* uitsleep van zowel sporen als vegetatieve plantendelen vanuit de werkruimte naar het milieu voorkomen dienen worden.

4.1 Inperking bij sporenvorming

De sporen van *P. patens* zijn 25 tot 44 µm groot, verspreiding via de lucht is mogelijk. De buitenkant is voorzien van stekelige papillen die gemakkelijk aan oppervlakken (kleding, schoenzolen) kunnen blijven plakken. De uiterlijke kenmerken van het *P. patens* plantje (gesloten kapsel, kort steeltje, geen specifieke organen voor de verspreiding van sporen) wijzen erop dat

verspreiding van sporen door de lucht in de natuurlijke omgeving niet waarschijnlijk is. De COGEM is echter van mening dat tijdens *in vitro* kweek van gg- *P. patens* bij open handelingen verspreiding van sporen door de lucht via aerosolvorming niet uitgesloten kan worden. Zij adviseert daarom om, indien sporenproductie niet uitgesloten kan worden, altijd open handelingen met gg- *P. patens* uit te voeren in een veiligheidskabinet, waarbij uitsleep van sporen buiten het kabinet wordt voorkomen.

Indien dit kabinet in een PL-ruimte staat, adviseert zij aanvullend om passende beschermende kleding te dragen (een laboratoriumjas) die na de werkzaamheden in de werkruimte achter zal blijven, zodat mogelijke uitsleep van sporen via besmette armen of mouwen wordt voorkomen. Tevens dienen na de werkzaamheden de handen gewassen te worden. Werkoppervlakken, restanten ongebruikt plantmateriaal en met vegetatieve delen gecontamineerd materiaal dienen na afloop van de werkzaamheden volgens een gevalideerde methode te worden gedecontamineerd dan wel vernietigd. Indien de werkzaamheden plaats zullen vinden onder ML-I inperkingsniveau, acht de COGEM de aanvullende maatregelen niet noodzakelijk, aangezien er voor ML-I inperkingsniveau additionele inperkingsmaatregelen gelden ten opzichte van PL inperkingsniveau.

4.2 Inperking indien geen sporenvorming optreedt

De aanvrager geeft aan dat (gg-) *P. patens* bij 25 °C onder continu daglicht in afgesloten containers (petrischalen of erlenmeyers) maximaal 4 weken in steriel voedingsmedium gekweekt zal worden. De COGEM stelt op basis van de door aanvrager aangeleverde literatuurgegevens,^{13,16} dat *P. patens* zich onder de genoemde kweekcondities alleen in de gametofytische fase zal bevinden, en dat er geen inductie van sporenvorming op zal treden. De COGEM concludeert dat, indien onder deze condities gekweekt wordt, de kans verwaarloosbaar klein is dat gg- *P. patens* sporen vormt.

Bij een aantal werkzaamheden (vegetatieve vermeerdering, bereiding van protoplasten, transfecties en bereiding van preparaten ten behoeve van microscopische analyse), zal de aanvrager gebruik gaan maken van gefragmenteerd gametofytisch weefsel. De aanvrager geeft aan een deel van de werkzaamheden uit te willen voeren in een VK- I veiligheidskabinet onder PL of ML-I inperkingsniveau.

De COGEM stelt dat ten gevolge van aerosolvorming tijdens open handelingen gg-gefragmenteerd gametofytisch weefsel in de lucht terecht kan komen. Zij acht het daarom van belang dat alle open handelingen met gefragmenteerd gametofytisch weefsel, indien zij plaatsvinden onder PL-inperkingsniveau, in een veiligheidskabinet uitgevoerd worden, zodanig dat uitsleep van gg- *P. patens* fragmenten via kleding, handen of schoeisel wordt voorkomen. Zij adviseert daarbij tevens passende beschermende kleding te dragen (een laboratoriumjas), die na de werkzaamheden in de werkruimte achter zal blijven. Werkoppervlakken, restanten ongebruikt plantmateriaal en met vegetatieve fragmenten gecontamineerd materiaal dienen na afloop van de werkzaamheden volgens een gevalideerde methode te worden gedecontamineerd dan wel vernietigd, en handen dienen te worden gewassen.

Indien de werkzaamheden met gefragmenteerd gametofytisch weefsel onder ML-I inperkingsniveau plaats zullen vinden, acht de COGEM de aanvullende maatregelen niet

noodzakelijk, aangezien er voor ML-I inperkingsniveau additionele inperkingsmaatregelen gelden ten opzichte van PL inperkingsniveau.

5. Conclusie

Samenvattend adviseert de COGEM om open handelingen met vegetatieve gg- *P. patens* fragmenten, waarbij géén sporen aanwezig zijn, onder ML-I inperkingsniveau uit te voeren. Dergelijke handelingen kunnen alleen onder PL-inperkingsniveau plaatsvinden, indien deze in een veiligheidskabinet worden uitgevoerd, zodanig dat uitsleep van vegetatieve fragmenten wordt voorkomen. Zij adviseert daarbij aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen.

Open handelingen waarbij gg- *P. patens* sporen vrij kunnen komen, adviseert de COGEM altijd in een veiligheidskabinet uit te voeren, zodanig dat uitsleep van de sporen wordt voorkomen. Dergelijke handelingen kunnen alleen onder PL-inperkingsniveau plaatsvinden als daarbij aanvullende werkvoorschriften in acht worden genomen.

Indien aan bovenstaande voorwaarden voldaan wordt, acht de COGEM bij voorgenomen werkzaamheden met gg-*P. patens* de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

6. Aanvullende opmerkingen

In de Regeling GGO zijn voor werkzaamheden met gg-planten verschillende voorschriften opgenomen.²² Aan de hand van een lijst met plantensoorten wordt aangegeven of er specifieke inperkingsmaatregelen nodig zijn die verder gaan dan de algemene in de Regeling vastgelegde voorschriften. Het gaat daarbij om maatregelen om insectenbestuiving en windbestuiving tegen te gaan, en om verspreiding van zaad en reproductieve plantendelen naar het milieu te voorkomen.

De COGEM wijst erop dat de biologische eigenschappen van mossen verschillen van die van zaadvormende planten. Ook zijn de biologische eigenschappen van mossen onderling verschillend (zoals sporengrootte en -oppervlak, wijze van sporenverspreiding). Zij is daarom van mening dat werkzaamheden met gg-mossen casusgewijs beoordeeld moeten worden. Zij is van mening dat mossen niet in de huidige 'lijst met inperkingsmaatregelen van gg-planten' (voorheen onderdeel I van Appendix C van de Regeling GGO uit 1998) opgenomen kunnen worden.

De COGEM merkt op dat er in de praktijk verwarring bestaat over de aard van een VK-I veiligheidskabinet en de zogenaamde 'entkast'. Volgens de internationaal geldende voorschriften biedt een VK-I veiligheidskabinet bescherming voor de betrokken medewerker en het milieu, maar geen bescherming van het te onderzoeken materiaal.^{23,24} Daarom zijn VK-I kabinetten in de praktijk in onbruik geraakt. Een 'entkast' is erop gericht onderzoeksmaterialen bescherming te bieden, maar wordt in de praktijk, ten onrechte, nog wel eens als veiligheidskabinet aangeduid.

De aanvrager wil een deel van de werkzaamheden uitvoeren in een VK-I veiligheidskabinet. De COGEM merkt op dat, indien een experiment met (gg-) *P. patens* wordt uitgevoerd, een dergelijk veiligheidskabinet het onderzoeksmateriaal geen bescherming biedt tegen besmetting met micro-organismen.

Referenties

1. Glime J M (2013). Introduction. In: Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists (juni 2014). www.bryoecol.mtu.edu
2. Part Seven. The evolution of diversity, Ch. 28 Plants without seeds: From water to land. In: Life. The science of Biology (10th edition) (2014). Eds Sasdava *et al.* Sinauer Associates, Sunderland (MA), USA
3. Universal Protein Resource. UniProt consortium (juni 2014). <http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=physcomitrella&sort=score>
4. Cronberg N *et al.* (2006). Microarthropods mediate sperm transfer in mosses. *Science* 313: 1255
5. Rosenstiel TN *et al.* (2012). Sex-specific volatile compounds influence microarthropod-mediated fertilization of moss. *Nature* 489: 431–433
6. Frey W *et al.* (2010). Geomolecular divergence patterns of Gondwanan and Palaeoaustral bryophytes – an overview. *Studies in austral temperate rain forest bryophytes* 34. *Nova Hedwigia* 91: 317–348
7. Glime J M (2013). Adaptive strategies: spore dispersal. In: Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists (juni 2014). www.bryoecol.mtu.edu
8. During HJ *et al.* (1979). Life strategies of bryophytes: a preliminary review. *Lindbergia* 5: 2–18
9. Stech M & Kruijjer JD (2013). Grijs Kronkelsteeltje (Cactusmos) *Campylopus introflexus* (Hedw.) Brid. In: *Veldgids Exoten*. Eds Leewis R *et al.* KNNV Uitgeverij, Zeist
10. BLWG (2014). *Physcomitrella patens*. Verspreidingsatlas mossen (juni 2014). <http://www.verspreidingsatlas.nl/2869>
11. Touw A & Rubers WV (1989). De Nederlandse Bladmossen. In: *Flora en verspreidingsatlas van de Nederlandse Musci (Sphagnum uitgezonderd)*. Uitgeverij KNNV, Utrecht
12. Cove D (2005). The moss *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Genet* 39: 339–358
13. Hohe A *et al.* (2002). Day length and temperature strongly influence sexual reproduction and expression of a novel MADS-Box gene in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biology* 4: 595–602
14. Une K & Tateishi Y (1996). Life cycle of *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. subsp. *californica* (Crum & Anderson) Tan in Japan. *Hikobia* 12: 151–156
15. Fife AJ & Seppelt RD (2012). *Funariaceae: Physcomitrella*. *Australian Mosses Online* 67 (juni 2014) http://www.anbg.gov.au/abrs/Mosses_online/Funariaceae_Physcomitrella.pdf
16. Engel P (1968). The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *American Journal of Botany* 55: 438–446
17. Boros A *et al.* (1993). *An Atlas of Recent European Bryophyte Spores*. 2nd ed. Scientia Publishing, Budapest
18. Nakosteen PC & Hughes KW (1978). Sexual life cycle of three species of *Funariaceae* in culture. *The Bryologist* 81: 307–314
19. Prigge MJ & Bezanilla M (2010). Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* 137: 3535–3543

20. Cove D (1996). *In vitro* culture, mutant selection, genetic analysis and transformation of *Physcomitrella patens*. Plant Tissue Culture Manual Supplement 6: 93–135
21. Schaefer D G (2001). Gene targeting in *Physcomitrella patens*. Current Opinion in Plant Biology 4: 143–150
22. VROM (1998). Regeling genetisch gemodificeerde organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling
23. World Health Organization (2004). Laboratory Biosafety Manual. 3rd edition (juni 2014). <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>
24. U. S. Department of Health and Human Services (2009). 5th Edition. HHS Publication no. (CDC) 21-1112 (juni 2014). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/bmbl.pdf>