

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

DATUM 30 september 2015
KENMERK CGM/150930-01
ONDERWERP Advies: inschaling van werkzaamheden met *Marchantia polymorpha*
(Paraplutjesmos)

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag getiteld 'Moleculair genetisch onderzoek in mossen' van Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) levermos *Marchantia polymorpha* (Paraplutjesmos). De aanvrager wil de rol van de genen betrokken bij de functie van auxine onderzoeken. Paraplutjesmos is een kosmopolitische soort die in vrijwel heel Nederland voorkomt.


Paraplutjesmos is tweehuizig met afzonderlijke mannelijke en vrouwelijke planten. Onder de juiste omstandigheden vormen de mannelijke planten zaadcellen die via water de eicellen op de vrouwelijke planten kunnen bereiken. Bevruchting van de eicel leidt tot de vorming van sporen die via de wind verspreid worden. Paraplutjesmos vormt ook kleine celklompjes (gemmae) die voor vegetatieve vermeerdering kunnen zorgen.

De COGEM adviseert om open handelingen met gg-Paraplutjesmos waarbij géén sporen aanwezig zijn en waarbij geen gemmae vrij kunnen komen, onder PC-I (kweek) respectievelijk ML-I (transformatie) inperkingsniveau uit te voeren. Open handelingen waarbij sporen of gemmae vrij kunnen komen, adviseert de COGEM altijd in een veiligheidskabinet uit te voeren, zodanig dat uitsleep van de sporen of gemmae wordt voorkomen.

Indien aan bovenstaande voorwaarden voldaan wordt, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-Paraplutjesmos 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
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. Heinjo During (Universiteit Utrecht), lid van de Bryologische en Lichenologische werkgroep van de KNNV Vereniging voor Veldbiologie

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Marchantia polymorpha* (Parapluitjesmos)

COGEM advies CGM/150930-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningsaanvraag met de titel 'Moleculair genetisch onderzoek in mossen' ingediend door Wageningen Universiteit. De adviesvraag betreft de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Marchantia polymorpha*. De aanvrager wil de rol van genen betrokken bij de functie van auxine onderzoeken.

Mos

Mossen (bryophytes) is een verzamelnaam die gebruikt wordt voor drie phyla: de bladmossen (Bryophyta), de hauwmossen (Anthocerotophyta) en de levermossen (Marchantiophyta).^{1,2} *M. polymorpha* behoort tot het phylum van de levermossen en wordt in Nederland Parapluitjesmos genoemd.^{3,4}

Levenscyclus van Parapluitjesmos

De levenscyclus van de levermossen 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 waarin sporen worden gevormd kort.¹

Gametofytische fase

De gametofytische fase begint met een haploïde spore waaruit een draadvormige voorkiem (protonema) groeit. Via mitose ontwikkelt de voorkiem zich tot het groene plantenlichaam (thallus), bestaande uit vertakkende lobben die doen denken aan de lobben van een lever. Parapluitjesmos is tweehuizig met afzonderlijke mannelijke en vrouwelijke planten.⁵

Op de mannelijke en vrouwelijke planten groeien in het voorjaar en in de zomer steelvormige structuren die respectievelijk antheridioforen en archeonioforen worden genoemd. Parapluitjesmos dankt zijn naam aan de paraplu-vormige archeonioforen. Aan de onderkant van de archeonioforen bevinden zich de archeonia die elk een eicel produceren. Op de antheridioforen bevinden zich de antheridia die geflagelleerde zaadcellen (antherozoiden) produceren. Deze zaadcellen verspreiden zich via water. Na bevruchting van de eicel met een zaadcel ontstaat in het archeonium een zygote en begint de sporofytische fase.^{5,6}

Sporofytische fase

Uit de eencellige diploïde zygote ontstaat door middel van mitose en cytokinese een multicellulair embryo die zich ontwikkelt tot de sporofyt. Deze sporofyt groeit als een parasitair orgaan aan de plant (gametofyt), rijpt en vormt een kapsel (sporangium of sporenkapsel). In het kapsel vindt

meiose plaats, waarbij eencellige haploïde sporen ontstaan. Na enkele maanden breekt het kapsel open en begint de gametofytische fase opnieuw.

Geslachtelijke voortplanting

Bij levermossen vindt de seksuele voortplanting door middel van de geflagelleerde spermacellen altijd via water plaats.¹ Omdat Parapluitjesmos tweehuizig is, moeten de zaadcellen van de ene plant naar de andere plant getransporteerd worden. In de aanwezigheid van water kunnen de bewegelijke zaadcellen zich zwemmend over een afstand van enkele centimeters verplaatsen. Dit waterlaagje kan erg dun zijn en een vochtige omgeving levert vaak al voldoende vocht op voor verspreiding van de zaadcellen. Er zijn ook aanwijzingen dat transport via spetters plaatsvindt. Hierbij kunnen zaadcellen via regendruppels die op de antheridia vallen tot enkele decimeters verspreid worden.⁷

Verspreiding van sporen

De sporen van Parapluitjesmos hebben een korrelig oppervlakte en zijn ongeveer 10 tot 15 µm groot. Na het openbreken van het sporenkapsel worden de sporen met behulp van spiraalvormige structuren (elateren) weggeschoten en via de wind verspreid.

Ongeslachtelijke voortplanting

Naast seksuele voortplanting kan Parapluitjesmos zich ook ongeslachtelijk voortplanten via zogenoemde gemmae. Deze bolvormige celklompjes worden gevormd in speciale broedbekers (gemma-bekers) op het thallus. Tijdens een regenbui kunnen de gemmae door binnenvallende regendruppels wegspatten en ergens anders weer uitgroeien tot een volledige plant.⁵

Voorkomen in Nederland

Parapluitjesmos is een kosmopolitische soort die vrijwel in heel Nederland voorkomt. De soort wordt vooral aangetroffen in permanent vochtige, voedselrijke bodems, maar gedijt op alle grondsoorten goed, vooral op plekken waar de grond bewerkt wordt. De soort is in dorpen en steden veel te vinden. Omdat Parapluitjesmos goed bestand is tegen chemische bestrijdingsmiddelen, komt het ook veel in tuincentra voor. In bossen en op natuurlijke standplaatsen komt de soort minder voor. Parapluitjesmos wordt soms verward met Halvemaantjesmos.⁴

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2014 geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde mossoort *Physcomitrella patens* die tot het phylum Bryophyta behoort. De COGEM adviseerde om open handelingen met vegetatieve gg-*P. patens* fragmenten, waarbij géén sporen aanwezig zijn, 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. De COGEM adviseerde daarbij aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen.

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

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil genetisch gemodificeerde Parapluitjesmos vervaardigen om de rol van genen betrokken bij de functie van auxine te onderzoeken. De aanvrager zal het mos kweken en transformeren met behulp van *Agrobacterium tumefaciens* om auxine-gerelateerde genen uit te schakelen en auxine-gerelateerde genen uit andere planten in Parapluitjesmos tot expressie te brengen. Ook zal de aanvrager op deze wijze een *green fluorescent protein* (GFP) gen inbrengen om de genactiviteit zichtbaar te maken en eiwitten te lokaliseren of te isoleren. De aanvrager wil de werkzaamheden op PC-1 (kweek) en ML-1 (transformatie) niveau uitvoeren. Omdat Parapluitjesmos in Nederland voorkomt, wil de aanvrager de planten gedurende de gehele levenscyclus *in vitro* cultiveren in gesloten petrischalen, dan wel in polypropyleen containers die een ‘microscopisch’ filter hebben. Alle handelingen waarbij sporen vrij kunnen komen, zullen volgens de aanvrager in een laminaire flowkast worden uitgevoerd.

Overweging

Bij werkzaamheden met gg-planten in laboratoria, kweekcellen en kassen moet verspreiding van de geïntroduceerde sequenties naar het milieu worden tegengegaan. Op basis van de biologische eigenschappen van Parapluitjesmos stelt de COGEM dat bij werkzaamheden met gg-Parapluitjesmos uitsleep van zowel sporen als vegetatieve plantendelen vanuit de werkruimte naar het milieu voorkomen dient te worden.

Inperking bij sporenvorming

Voor de transitie naar seksuele reproductie (de aanmaak van antheridia (voor spermacellen) en archegonia (voor de eicellen)) is licht met lange dag karakteristiek nodig⁸ (relatief hoog intensiteit verrood licht). De sporen die na bevruchting worden gevormd zijn 10 tot 15 µm groot en worden door de wind verspreid. Op basis van deze gegevens adviseert de COGEM om de kweekomstandigheden zodanig te kiezen (korte dagomstandigheden) dat de ontwikkeling van seksuele organen achterwege blijft en er geen inductie van sporenvorming zal optreden. Ook kunnen de mannelijke planten van de vrouwelijke planten mogelijk worden gescheiden om bevruchting te voorkomen. Indien sporenproductie niet uitgesloten kan worden, adviseert de COGEM om open handelingen met gg-Parapluitjesmos altijd uit te voeren in een veiligheidskabinet, waarbij uitsleep van sporen buiten het kabinet wordt voorkomen.

Inperking indien geen sporenvorming optreedt

Parapluitjesmos vormt celklompjes (gemmae) die voor vegetatieve verspreiding kunnen zorgen. Deze gemmae zijn vrij klein en kunnen gemakkelijk verspreiden en uitgroeien tot een nieuwe plant. Indien er bij de voorgenomen werkzaamheden gemmae kunnen vrijkomen, adviseert de COGEM

open handelingen met gg-Paraplutjesmos in een veiligheidskabinet uit te voeren, zodanig dat uitsleep van gemmae buiten het kabinet wordt voorkomen.

Advies

De COGEM adviseert om de handelingen met gg- Paraplutjesmos waarbij géén sporen aanwezig zijn en waarbij geen gemmae vrij kunnen komen, onder PC-I (kweek) respectievelijk ML-I (transformatie) inperkingsniveau uit te voeren. Omdat zowel sporen als gemmae in grote aantallen door de plant kunnen worden aangemaakt en deze door de geringe grootte gemakkelijk over grote afstanden kunnen worden verspreid, adviseert de COGEM open handelingen waarbij sporen of gemmae vrij kunnen komen altijd in een veiligheidskabinet uit te voeren, zodanig dat uitsleep van de sporen of gemmae wordt voorkomen.

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

Aanvullende opmerking

De aanvrager geeft aan dat alle handelingen waarbij sporen vrij kunnen komen in een laminaire flowkast worden uitgevoerd. De COGEM wijst erop dat een laminaire flowkast wel bescherming biedt aan het te onderzoeken materiaal, maar niet aan het milieu. De COGEM is daarom van mening dat alle open handelingen waarbij sporen of gemmae vrij kunnen komen in een veiligheidskabinet uitgevoerd moeten worden.

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 www.bryoecol.mtu.edu (bezoekt: 22 september 2015)
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. www.uniprot.org/taxonomy/3197 (bezoekt: 22 september 2015)
4. BLWG Verspreidingsatlas mossen. *Marchantia polymorpha* L. www.verspreidingsatlas.nl/3403# (bezoekt: 22 september 2015)
5. Radboud Universiteit Nijmegen. Hepatophyta (Marchantia) www.vcbio.science.ru.nl/virtuallessons/hepatophyta/ (bezoekt: 22 september 2015)
6. Glime J M (2013). Marchantiophyta. In: Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists www.bryoecol.mtu.edu (bezoekt: 22 september 2015)
7. Duckett JG & Pressel S (2009). Extraordinary features of the reproductive biology of *Marchantia* at Tursley Common. FieldBryology No97
8. Benson-Evans K (1964). Physiology of the reproduction of bryophytes. The Bryologist 67: 431-445