

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. B. Visser
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 23 september 2021
KENMERK CGM/210923-01
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met gg-Ceratopteris richardii

Geachte mevrouw Visser,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 21-138_2.8-000 met de titel '*Ceratopteris richardii* genetische modificatie' ingediend door Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van ggo-werkzaamheden betreffende de varensoort *Ceratopteris richardii*. De aanvrager is voornemens de varen genetisch te modificeren en op te kweken.

C. richardii is een tropische varensoort die zowel op het land als onder water kan groeien. De plant komt voor in het zuidoosten van de Verenigde Staten, van Guatemala tot Honduras en van het Caribisch gebied tot Guyana. Voortplanting vindt plaats door middel van sporen. Deze sporen kunnen zich via de wind of het water verspreiden. Uit een enkele spore kan onder gunstige omstandigheden een hele nieuwe populatie van *C. richardii* ontstaan. Gezien de (sub)tropische verspreiding van *C. richardii*, is het onwaarschijnlijk dat de soort in Nederland overleeft, maar niet geheel uit te sluiten.

De aanvrager is voornemens de genetische modificatie van *C. richardii* uit te voeren op inperkingsniveau ML-I. Tevens is de aanvrager voornemens om werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *C. richardii* uit te voeren op inperkingsniveaus PC-I en PKa-I. De COGEM is van oordeel, dat bij werkzaamheden met en omstandigheden bij *C. richardii* waarbij sporen gevormd worden, aanvullende maatregelen vereist zijn om verspreiding van sporen te voorkomen.

De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de voorgenoemde werkzaamheden op de genoemde inperkingsniveaus, en met inachtneming van de vermelde aanvullende voorschriften, worden uitgevoerd.

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

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is COGEM lid dr. ir. A.B. Bonnema niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde varen, *Ceratopteris richardii*

COGEM advies CGM/210923-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een 2.8 verzoek ingediend door Wageningen Universiteit (IG 21-138), is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van ggo-werkzaamheden met de varensort *Ceratopteris richardii*. De aanvrager is voornemens *C. richardii* genetisch te modificeren met behulp van genetisch gemodificeerde (gg-) *Agrobacterium tumefaciens*.

2. *Ceratopteris richardii*

Ceratopteris richardii is een varen uit de klasse *Polypodiopsida* (ook wel leptosporangiate varens genoemd) die behoort tot de lintvarenfamilie (*Pteridaceae*). De varens uit het genus *Ceratopteris* zijn (semi-)aquatisch en komen voor in de (sub)tropische gebieden van Noord- en Zuid-Amerika, Afrika, Azië, Indonesië en Australië.^{1,2} In Nederland worden verschillende *Ceratopteris*-soorten als aquariumplant verkocht. Oorspronkelijk werden vier soorten onderscheiden in het genus *Ceratopteris*; *Ceratopteris thalictroides*, *Ceratopteris pteridoides*, *Ceratopteris cornuta*, en *C. richardii*. De soort *C. thalictroides* wordt echter verondersteld een mogelijk cryptisch complex te vormen. Thans zijn drie cryptische soorten en twee variëteiten onderscheiden binnen de soort *C. thalictroides*, en mogelijk dat er in de toekomst meer cryptische soorten onderscheiden worden.² De soorten uit het genus *Ceratopteris* zijn lastig van elkaar te onderscheiden op basis van morfologie. Daarnaast is er bewijs dat alle soorten van dit genus (zowel diploïd als tetraploïd) in enige mate met elkaar kunnen hybridiseren.^{2,3,4}

C. richardii is diploïde plant ($n=39$) en kan terrestrisch groeien in waterige gebieden, zoals aan randen van sloten of moerasgebieden, maar de plant kan ook onder water groeien.^{2,4,5} Het natuurlijke verspreidingsgebied van *C. richardii* betreft het zuidoosten van de Verenigde Staten, van Guatemala tot Honduras en van het Caribisch gebied tot Guyana.⁶ *C. richardii* komt niet in Nederland voor. Van alle soorten uit het genus is alleen van de verwante soort *C. thalictroides* een enkele waarneming in Nederland gerapporteerd vóór 1985.⁷ De genoomsequentie van de plant is bepaald⁸ en de plant wordt al meer dan 30 jaar als modelorganisme in onderzoek gebruikt vanwege de snelle levenscyclus en het gemak waarmee ze gekweekt kan worden.^{2,4}

Voor voortplanting en verspreiding produceert *C. richardii* haploïde sporen van 0,12 mm. *C. richardii* is een homospore varen, dat wil zeggen dat er maar één type sporen wordt geproduceerd. Deze sporen kunnen zich ontwikkelen tot mannelijke of hermafrodiete (ook wel biseksuele) gametofyten. In eerste instantie worden alleen hermafrodiete gametofyten gevormd, maar door de productie van het feromoon antheridiogeen wordt de ontwikkeling van mannelijke gametofyten gestimuleerd.⁹ De mannelijke gametofyten ontwikkelen antheridia, een structuur waarin via mitose spermacellen geproduceerd worden. De hermafrodiete gametofyten ontwikkelen zowel antheridia als archegonia; structuren waarin eicellen gevormd worden. Elk archegonium produceert één eicel. Het vrijkomen van spermacellen en bevruchting vindt plaats in de aanwezigheid van water.⁴ De hermafrodiete gametofyten zijn tot

zelfbevruchting in staat. Na de bevruchting ontwikkelt zich een diploïde zygote, het eerste stadium van de ontwikkeling als sporofyt.^a De sporofyt zit in het beginstadium nog vast aan de gametofyt, maar de gametofyt sterft af wanneer de eerste bladeren van de sporofyt worden gevormd. De sporofyt kan tevens vegetatief vermeerderd worden door broedknoppen ('leaf buds' of gemmae) die kunnen ontstaan te verwijderen en opnieuw te planten.⁵ Tijdens de verdere ontwikkeling in de reproductieve fase van de sporofyt worden sporofyllen gevormd; bladeren die sporendoosjes (sporangia) bij zich dragen waarin de sporen worden gevormd. In deze sporangia treedt meiose op, waarbij nieuwe haploïde sporen gevormd worden.⁴ Het wortelstelsel van de varen is beperkt. *C. richardii* heeft een korte levenscyclus; de ontwikkeling van spore tot sporenvormende sporofyt kan onder gunstige condities in ongeveer vier maanden voltooid zijn.^{2,4}

De sporen bevatten geen pluis of uitsteeksels en kunnen onder optimale omstandigheden tot meer dan 50 jaar kiemkrachtig blijven.⁹ De ontkieming en ontwikkeling van gametofyten, alsook de groei en ontwikkeling van sporofyten vindt het beste plaats onder hoge luchtvochtigheid (80-85%) en een temperatuur van 26-30°C, met een optimum van 28°C. Bij lagere temperaturen, zoals bij 17°C,¹⁰ zal de ontwikkeling van de gametofyten en sporofyten sterk vertraagd zijn,³ en bij temperaturen onder de 12°C zullen Ceratopteris-sporen niet ontkiemen.¹⁰

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens genetisch gemodificeerde (gg-) *C. richardii* te genereren voor onderzoeksdoeleinden. De werkzaamheden die in de onderhavige vergunningaanvraag worden beschreven kunnen verdeeld worden in vier handelingen die in verschillende categorieën van fysische inperking uitgevoerd worden:

- A. Opkweken en genetisch modificeren van *C. richardii* met behulp van gg-*A. tumefaciens* – ML-I;
- B. Selectie getransformeerde planten en verwijdering van resterende gg-*A. tumefaciens* – PC-1;
- C. Werkzaamheden met jonge gg-sporofyten in potjes met grond – Pka-1;
- D. Oogsten van sporen uit verzameld bladmateriaal – ML-I.

Hieronder worden de werkzaamheden nader toegelicht.

A. Opkweken en genetisch modificeren van *C. richardii* met behulp van gg-*A. tumefaciens* – ML-I

Gedurende de weefselkweek worden sporen van *C. richardii* gedurende 7 tot 10 dagen in vloeibaar medium in een afgesloten erlenmeyer opgekweekt, in co-cultuur met gg-*A. tumefaciens*. Na de co-cultivatatie worden de ontstane gametofyten verzameld op een gaasje en met water gespoeld om de gg-*A. tumefaciens* te verwijderen. Het spoelwater wordt opgevangen en behandeld als ggo-afval.

^a Ceratopteris-varens kunnen ook zonder dat er bevruchting optreedt sporofyten vormen, een proces dat ook wel apogamie genoemd wordt. Deze sporofyten zijn dan haploïd. Daarnaast kunnen sporofyten ook direct diploïde gametofyten produceren zonder dat hiervoor eerst sporen gevormd worden (aposporie).^{5,9}

B. Selectie getransformeerde planten en verwijdering van gg-*A. tumefaciens* – PC-1

Vervolgens worden de gametofyten op vast medium gezet waaraan een selectiemarker is toegevoegd (deze is afhankelijk van de gebruikte donorsequentie) om transformanten te selecteren, en wordt tevens antibiotica (cephalotaxine) toegevoegd om overgebleven gg-*A. tumefaciens* te doden. Dit vindt plaats in afgesloten petrischalen.

C. Werkzaamheden met jonge gg-sporofyten in potten met grond – Pka-1

Wanneer onder de weefselkweekcondities bevruchting optreedt en jonge sporofyten ontstaan, worden deze planten overgebracht naar de plantenkas, waar zij in potten met grond verder worden opgekweekt. De kas beschikt over een afgesloten compartiment, bestaande uit een dubbele deur met sluis, en het gebruikte water wordt nabehandeld. De planten zullen een aantal weken gehouden worden, en kunnen in het reproductieve stadium sporofyllen met sporen gaan produceren. Om verspreiding van de sporen te voorkomen is de aanvrager voornemens papieren zakken om de sporofyllen te binden zodra deze ontwikkelen. Vervolgens worden deze bladeren geplukt en minstens 14 dagen gedroogd op het ML-I laboratorium.

D. Oogsten van sporen uit verzameld bladmateriaal – ML-I

Wanneer de bladeren uitdrogen, kunnen de sporen verzameld worden in de papieren zak. De sporen zullen overgebracht worden in buisjes. Het drogen van de bladeren en verzamelen van de sporen zal in een aparte ruimte van het laboratorium plaatsvinden, waarbij de aanvrager voornemens is enkele voorzorgsmaatregelen te treffen, o.a.:

- Er zijn speciale plak-strips op de grond aanwezig om verspreiding van sporen via onder andere schoenen te voorkomen;
- Na elk gebruik worden de vloer en tafels schoongemaakt.

Van deze verzamelde sporen kunnen opnieuw gg-varens opgekweekt worden. De aanvrager geeft aan dat het opkweken alleen sporadisch plaats zal vinden voor propagatiedoeleinden. Het voornaamste doel van de werkzaamheden is het onderzoek aan de jonge planten, die in de meeste gevallen vernietigd zullen worden voordat zij sporen produceren.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over de varen *C. richardii* of werkzaamheden hiermee. Wel heeft zij in 2020 geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met (gg-) *Azolla filiculoides* (Grote kroosvaren, een invasieve exoot) in associatie met een gg-cyanobacterie (*Anabaena azollae*). Zij adviseerde de werkzaamheden op inperkingsniveau I (ML-I dan wel PCM-I) uit te voeren, met inachtneming van twee aanvullende maatregelen en werkvoorschriften: (1) de (gg-) *A. filiculoides* waterplanten in associatie met de (gg-)cyanobacterie bevinden zich in gesloten containers, die in een plastic bak geplaatst worden, en (2) het genetisch modificeren en wassen van de waterplanten dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse II. Daarnaast heeft zij erop gewezen dat conform standaardwerkvoorschriften die gelden voor inperkingsniveau I, al het biologische afval (waaronder het kweekmedium waarin mogelijke vegetatieve en generatieve structuren van *A. filiculoides* aanwezig

kunnen zijn, en mogelijk ook (gg-) *A. azollae*) geïnactiveerd dient te worden voordat het de inrichting verlaat.¹¹

5. Overweging en advies

Bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onder 'Ingeperkt Gebruik' dienen maatregelen genomen te worden om ontsnapping naar het milieu te voorkomen. De benodigde maatregelen worden bepaald door de aard van de gebruikte organismen en de inrichtings- en werkvoorschriften behorende bij het inperkingsniveau van de werkruimte.

C. richardii is een tropische varensoort die terrestrisch en aquatisch kan groeien en zich voortplant door middel van sporen. Deze sporen kunnen vrijkomen onder droge condities en zich via wind verspreiden, maar sporen kunnen ook drijvend via het water verspreiden. Een enkele spore kan onder gunstige omstandigheden een hele nieuwe populatie van *C. richardii* opleveren. Wegens de (sub)tropische verspreiding van *C. richardii* is het onwaarschijnlijk, maar niet volledig uit te sluiten, dat de soort in Nederland kan overleven. De kans op kruisen van *C. richardii* met verwante varens acht de COGEM verwaarloosbaar klein, aangezien de andere *Ceratopteris*-soorten niet in Nederland voorkomen. Ook intergenetische hybridisatie acht zij uitgesloten. Er zijn geen intergenetische hybriden van *Ceratopteris* bekend, en het meest nauw verwante genus *Acrostichum* betreft eveneens tropische soorten die niet in Nederland voorkomen.

De aanvrager is voornemens *C. richardii* genetisch te modificeren en op te kweken. De COGEM stemt in met het voorstel van de aanvrager om de genetische modificatie en selectie van getransformeerde *C. richardii* op inperkingsniveaus ML-I laboratorium, dan wel PC-1 kweekcel, uit te voeren. Conform de standaardwerkvoorschriften die gelden voor inperkingsniveau I in de Regeling ggo, dient bij alle werkzaamheden al het biologische afval (waaronder het kweekmedium en reproductieve plantendelen) geïnactiveerd te worden voordat het de inrichting verlaat of wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd.¹² Bij activiteiten met gg-*C. richardii* in de PKa-I kas stelt de aanvrager dat de kans op verspreiding van sporen bij de vorming van sporofyllen klein is, omdat sporen alleen zouden vrijkomen onder droge condities, en in de kas een hoge luchtvochtigheid gehanteerd wordt.

De COGEM stemt in met het voorgestelde inperkingsniveau PKa-I en de aanvullende maatregel om verspreiding van sporen te voorkomen, het afdekken van sporofyllen met papieren zakken, maar zij wijst er op dat deze zakken bijtijds geplaatst dienen te worden om te voorkomen dat er vroegtijdige verspreiding van sporen optreedt. De COGEM merkt op dat eventuele sporen van deze semi-aquatische plantensoort via water verspreid kunnen worden. In de aanvraag is aangegeven dat al het water in de kas wordt nabehandeld.

Bij de handelingen onder activiteit D is de COGEM van oordeel dat de plakstrips en het schoonvegen van de vloer en tafel niet afdoende zal zijn om verspreiding van sporen te voorkomen. De COGEM acht het niet uitgesloten dat bij het oogsten van de sporen verspreiding via de lucht plaats zou kunnen vinden. Omdat niet volledig uitgesloten kan worden dat *C. richardii* zich onder gunstige omstandigheden in Nederland kan vestigen, adviseert de COGEM aanvullende maatregelen om verspreiding van sporen te voorkomen, zoals het oogsten van de sporen in een veiligheidskabinet.

Tabel 1. inperkingsmaatregelen voor sporenplanten

Sporenplanten		Kenmerken	Gegevens m.b.t. fysische inperking
Familie	Soort	Voorkomen in Nederland ¹	
<i>Pteridaceae</i>	<i>Ceratopteris richardii</i>	- (vestiging niet geheel uitgesloten)	Maatregelen om verspreiding van sporen te voorkomen.

ad 1) W = opgenomen in de Nationale Databank Flora en Fauna.^{13,14}

De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de voorgenoemde werkzaamheden op de hierboven genoemde inperkingsniveaus en met inachtneming van de vermelde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd.

Referenties

1. Royal Botanical Gardens. Kew, Plants of the World Online. *Ceratopteris* Brongn.
<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:17064130-1> (bezoekt: 14 sept 2021)
2. Kinoshita SP *et al.* (2020). Cryptic diversity in the model fern genus *Ceratopteris* (Pteridaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 152: 106938
3. C-Fern. Frequently asked questions. <https://c-fern.org/what-is-c-fern/>
4. Conway SJ & Di Stilio VD (2020). An ontogenetic framework for functional studies in the model fern *Ceratopteris richardii*. *Dev. Biol.* 457: 20-29
5. Chasan R (1992). *Ceratopteris*: A model plant for the 90s. *Plant Cell* 4: 113-115
6. Royal Botanical Gardens. Kew, Plants of the World Online. *Ceratopteris richardii* Brongn.
<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:17064180-1> (bezoekt: 14 sept 2021)
7. FLORON Verspreidingsatlas Vaatplanten. *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.
<https://www.verspreidingsatlas.nl/9063> (bezoekt: 14 september 2021)
8. Marchant DB *et al.* (2019). The C-Fern (*Ceratopteris richardii*) genome: insights into plant genome evolution with the first partial homosporous fern genome assembly. *Sci. Rep.* 9: 18181
9. Atallah NM & Banks JA (2015). Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Front Plant Sci.* 6: 100
10. Warne TR & Lloyd RM (1980). The role of spore germination and gametophyte development in habitat selection: temperature responses in certain temperate and tropical ferns. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107: 57-64

11. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie *Anabaena azollae* en inschaling van werkzaamheden met (gg-) *Azolla filiculoides* in associatie met (gg-) *A. azollae*. COGEM advies CGM/200520-02
12. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2021-04-01#Bijlage9> (bezocht: 15 september 2021)
13. Nationale Databank Flora en Fauna. www.ndff.nl (bezocht: 01 september 2021)
14. Nationale Databank Flora en Fauna – Verspreidingsatlas. www.verspreidingsatlas.nl (bezocht: januari t/m september 2021)