

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

**DATUM** 03 maart 2015  
**KENMERK** CGM/150303-02  
**ONDERWERP** Advies classificatie van *Schwanniomyces occidentalis*, *Trichoderma aggressivum* en *Verticillium fungicola*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot wijziging van de vergunning 'Het tot expressie brengen of uitschakelen van genen betrokken bij eiwitsecretie en het tot expressie brengen van reportergenen om de eiwitsecretie te onderzoeken,' afkomstig van HAN Biocentre, deelt de COGEM u het volgende mee.

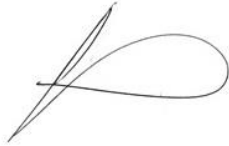
**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de schimmels *Schwanniomyces occidentalis*, *Trichoderma aggressivum* en *Verticillium fungicola*. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *Schw. occidentalis*, *T. aggressivum* en *V. fungicola*. *Schw. occidentalis* is een gist die wereldwijd in de belangstelling staat vanwege zijn capaciteit om zetmeel volledig om te zetten in verschillende suikers. De soort kent een lange historie van veilig gebruik en er zijn geen aanwijzingen dat hij ziekteverwekkend is voor mens, dier of plant. De COGEM adviseert *Schw. occidentalis* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Vanwege het niet-ziekteverwekkende karakter acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de laboratoriumwerkzaamheden met gg-*Schw. occidentalis* op ML-I niveau plaatsvinden. *V. fungicola* en *T. aggressivum* zijn bodemschimmels die ernstige ziekte kunnen veroorzaken bij champignons. Vanwege dit ziekteverwekkende vermogen adviseert de COGEM de twee schimmelsoorten op te nemen in pathogeniteitsklasse 2. Gezien de aard van de voorgenomen werkzaamheden is de COGEM van mening dat deze op ML-I niveau uitgevoerd kunnen worden. Vanwege het sporulerende karakter van beide schimmels dienen open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse-II uitgevoerd te worden. Op ML-I inperkingsniveau en onder navolging van het aanvullende voorschrift acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van voorgenomen werkzaamheden met gg-*V. fungicola* en gg-*T. aggressivum* 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

# Classificatie van *Schwanniomyces occidentalis*, *Trichoderma aggressivum* en *Verticillium fungicola*

## COGEM advies CGM/150303-02

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van de schimmelsoorten *Schwanniomyces occidentalis*, *Trichoderma aggressivum* en *Verticillium fungicola* en over de mogelijke plaatsing van deze soorten op Bijlage 2 lijst A1 van de nieuwe Regeling ggo. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *Schw. occidentalis*, *T. aggressivum* en *V. fungicola*.

### Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in **pathogeniteitsklasse 1**. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

### **Bijlage 2 lijst A1**

Bijlage 2 lijst A1 maakt deel uit van de nieuwe Regeling ggo en bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname in Lijst A1 betekent dat een gebruiker zonder risicobeoordeling ggo's onder laboratoriumcondities (ML-1) mag vervaardigen die zijn samengesteld uit elke combinatie van onderdelen op de A-lijsten (veilige vectoren en inserties).

### **Aspecten van belang voor de pathogeniteitsclassificatie van schimmels**

Schimmels zijn fylogenetisch divers en omvatten een verscheidenheid aan verschijningsvormen waaronder filamenteuze schimmels en ééncellige gisten.<sup>1</sup> Op grond van hun leefwijze in het ecosysteem worden schimmels onder meer verdeeld in saprotrofe (ook wel saprofytische), parasitaire en symbiotische schimmels.<sup>2</sup>

Saprotrofe schimmels leven van dood organisch materiaal terwijl parasitaire schimmels hun voeding uit levend organisch materiaal halen.<sup>2</sup> Parasitaire of pathogene schimmels infecteren levende organismen en kunnen deze beschadigen of zelfs doden. Symbiotische schimmels leven met andere soorten organismen samen, waarbij ten minste één van de soorten voordeel ondervindt.<sup>2</sup> Indien de samenlevende soorten wederzijds voordeel van elkaar ondervinden, spreekt men van mutualisme. De meest bekende symbiose is die tussen schimmels en plantenwortels (ectomycorrhiza's en arbusculaire mycorrhiza's).

De meeste schimmels vermenigvuldigen zich via sporen die gevormd worden tijdens geslachtelijke (generatieve) of ongeslachtelijke (vegetatieve) voortplanting.<sup>2</sup> Geslachtelijke sporen worden onder meer in zakjes, of exogeen op knotsvormige structuren gevormd (respectievelijk bij ascomycete en basidiomycete schimmels).<sup>2</sup> Ongeslachtelijke of asexuele sporen worden onder meer gevormd door de fragmentatie of afsnoering van de filamenteuze schimmeldraad, en worden veelal aangeduid als conidiosporen. Zowel geslachtelijke als ongeslachtelijke sporen kunnen zich via lucht en water verspreiden.<sup>2</sup>

Sommige schimmels komen voor als afzonderlijke cellen (de zogenaamde gisten). Deze cellen kunnen zich ongeslachtelijk voortplanten door knopvorming. Hierbij stulpt het cytoplasma van de moedercel uit en vormt zich een knop die verder uitgroeit en uiteindelijk afsnoert. Dit proces wordt ook wel *budding* genoemd.

Schimmels produceren onder specifieke condities secundaire metabolieten. Sommige secundaire metabolieten hebben toxische eigenschappen.<sup>3</sup> De synthese van deze mycotoxines vindt plaats via verschillende stofwisselingsroutes waarbij complexe reacties en veel enzymen betrokken zijn. De genen die voor deze enzymen coderen zijn in geclusterde vorm op het schimmelgenoom aanwezig. Deze genenclusters zijn enkele tientallen kilobasen groot, en de genen van een cluster worden in onderlinge samenhang gereguleerd.<sup>3</sup> Schimmelregulatorgenen kennen verschillende hiërarchische niveaus. Sommige transcriptiefactoren beïnvloeden alleen de expressie binnen hun eigen genencluster. Andere regulatoren beïnvloeden daarnaast ook fysiologische processen gecodeerd door andere genenclusters.<sup>3</sup> Voor veel

mycotoxines zijn de biochemische stofwisselingsroutes nog niet opgehelderd of is nog niet bekend welke genenclusters erbij betrokken zijn. Soms zijn de stofwisselingsroutes en de betrokken genenclusters wel beschreven, maar is niet bekend onder welke condities mycotoxineproductie tot stand komt. Sommige schimmelsoorten kunnen meerdere mycotoxines produceren, maar binnen een soort kan de productie per isolaat verschillen.<sup>3</sup>

Om in kaart te kunnen brengen of een bepaalde schimmelsoort mycotoxine(s) produceert, is het van belang te weten onder welke naam/namen de betreffende schimmel bekend is. De nomenclatuur van de schimmels is echter complex en mede door de toenemende informatie over de genomsequenties is deze aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort.

### ***Schwanniomyces occidentalis***

De ascomycete *Schw. occidentalis* werd in 1909 voor het eerst geïsoleerd uit de bodem van het eiland St. Thomas in West-Indië. Deze soort is onderdeel van de familie *Saccharomycetaceae* en behoort tot dezelfde subfamilie (*Saccharomycoideae*) als het veel bestudeerde genus *Saccharomyces*.<sup>4</sup> Er worden twee variëteiten onderscheiden: *Schwanniomyces occidentalis* Klöcker var. *occidentalis* en *Schwanniomyces occidentalis* Klöcker var. *persoonii*. De gistsoort reproduceert vegetatief via multilaterale knopvorming en geslachtelijk via de vorming van 1 of 2 ascosporen.<sup>4</sup>

*Schw. occidentalis* wordt wereldwijd bestudeerd vanwege zijn amylolytische capaciteit. De gist produceert de enzymen  $\alpha$ -amylase en glucoamylase en kan door de synergistische werking tussen beide enzymen zetmeel volledig omzetten in verschillende suikers, zoals maltose, maltotriose en glucose. Vanwege zijn efficiënte amylolytische capaciteit is de gist commercieel interessant voor verschillende industriële toepassingen.<sup>4</sup>

In de wetenschappelijke literatuur wordt melding gemaakt van de productie van een zogenoemd killer-toxine door *Schw. occidentalis*. Dit toxine zou lethaal zijn voor bepaalde *S. cerevisiae* stammen.<sup>5</sup>

### ***Verticillium fungicola***

De ascomycete schimmel *V. fungicola* is recent op basis van moleculaire analyses ingedeeld in het genus *Lecanicillium* en herbenoemd tot *Lecanicillium fungicola*.<sup>6,7</sup> Deze parasitaire schimmel veroorzaakt de zogenoemde droge mollenziekte (*dry bubble disease*) in gecultiveerde champignons (*Agaricus bisporus*). Een uitbraak van deze ziekte gaat vaak gepaard met grote opbrengstverliezen.<sup>8</sup>

Infecties door *L. fungicola* blijven beperkt tot het vruchtlichaam. De symptomen zijn afhankelijk van het moment waarop infectie plaatsvindt. Een infectie in champignons die al gevormd zijn, leidt tot het ontstaan van bruine vlekken die wratachtig kunnen uitgroeien. Infecties die in een eerder stadium van ontwikkeling optreden, kunnen sterke vervormingen veroorzaken (bijvoorbeeld stelen die dikker zijn dan de hoed) of tot onherkenbare en vormloze champignons leiden, de zogenaamde droge mol.<sup>8</sup>

De ziekteverwekker wordt voornamelijk verspreid door transmissie van aseksuele conidiosporen via insecten, besmette apparatuur en personeel. De sporen zijn meer dan een jaar levensvatbaar in de bodem. Omdat commercieel gebruikte champignonrassen niet erg resistent zijn tegen de droge mollenziekte, neemt na een eerste infectie de ziektedruk exponentieel toe.<sup>9</sup>

*L. fungicola* is moeilijk te bestrijden, omdat de meeste fungiciden ook schadelijk zijn voor champignons. Daarnaast heeft de schimmel resistentie ontwikkeld tegen fungiciden die in het verleden gebruikt zijn. Op dit moment is er nog één werkzaam fungicide beschikbaar, maar ook bij dit middel zijn er aanwijzingen voor een verminderde gevoeligheid van *L. fungicola*. Om infecties met *L. fungicola* te voorkomen zijn daarom strenge hygiënische maatregelen vereist.<sup>8</sup>

### ***Trichoderma aggressivum***

*T. aggressivum* is een ascomycete bodemschimmel die behoort tot de familie van de *Hypocreaceae*, genus *Trichoderma*. In eerste instantie werd *T. aggressivum* beschouwd als een agressief biotype van de soort *T. harzianum*, een veel gebruikte bio-control agens voor verschillende plantpathogene schimmels.<sup>10</sup> Pas recent is de schimmel op basis van moleculaire analyses als aparte soort beschreven waarbij twee formae worden onderscheiden: forma *aggressivum* en forma *europaeum*.<sup>11</sup> Voortplanting en verspreiding vinden plaats via de productie van aseksuele conidiosporen.<sup>12,13</sup>

*T. aggressivum* werd in de jaren tachtig van de vorige eeuw geïsoleerd tijdens een uitbraak van *green mould disease* bij commerciële champignonteeltbedrijven in Ierland en het Verenigd Koninkrijk. Later werd de ziekte ook geconstateerd bij bedrijven in Noord-Amerika. Inmiddels komt de ziekte wereldwijd voor en veroorzaakt *T. aggressivum* jaarlijks naar schatting voor tientallen miljoenen euro's aan schade in de commerciële champignonteelt.<sup>12</sup>

De schimmel koloniseert de compost waarop de champignons groeien. Hierbij worden groen gekleurde conidiosporen gevormd waaraan de ziekte zijn naam dankt. Deze conidiosporen kunnen zich gemakkelijk via wind, insecten of mensen verspreiden waardoor nabijgelegen champignonteeltbedrijven aangetast kunnen worden.<sup>14</sup> *T. aggressivum* f. *aggressivum* produceert een mycotoxine genaamd 3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarine dat een remmende werking heeft op de groei van *A. bisporus*.<sup>14</sup> In de literatuur wordt ook melding gemaakt van een toxische werking op tomatenstekjes en pekelkreeftjes.<sup>15</sup>

### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager wil de lipidenproductie en -samenstelling van *Schw. occidentalis* veranderen door genen die betrokken zijn bij het lipide- en koolstofmetabolisme/katabolisme tot expressie te brengen of uit te schakelen. Daarnaast wil de aanvrager in *T. aggressivum* en *L. fungicola* genen tot expressie brengen/uitschakelen die betrokken zijn bij de biosynthese of modificatie van de celwand. De aanvrager wil op deze manier een reportersysteem creëren waarmee de invloed van verschillende stoffen op de celwand getest kan worden.

### **Eerdere COGEM adviezen**

De COGEM heeft in 2014 een geactualiseerde lijst met pathogeniteitsclassificaties van (a)pathogene schimmels gepubliceerd.<sup>16</sup> In deze lijst zijn verschillende *Trichoderma* soorten geïdentificeerd als apathogeen, waaronder *T. harzianum*. Verder zijn de soorten *Verticillium albo-atrum* en *Verticillium dahliae* geïdentificeerd als klasse 2 plantpathogenen. Daarnaast is *Lecanicillium muscarium* (= *Verticillium lecanii*) geïdentificeerd als klasse 2 dierpathogeen. De COGEM heeft nog niet eerder over *Schwanniomyces* soorten geadviseerd.

### Classificaties andere beoordelende instanties

De 'American Type Culture Collection' (ATCC) die haar indeling louter baseert op pathogeniteit voor de mens, heeft werkzaamheden met *Lecanicillium fungicola* onder de oude naam *Verticillium fungicola* ingedeeld in het laagste veiligheidsniveau 'biosafety level 1.' Ook heeft de ATCC *Schwanniomyces occidentalis* geclassificeerd als een biosafety level 1 organisme.<sup>17</sup>

### Overweging en advies

*Schw. occidentalis* kent een lange historie van veilig gebruik. De gist staat wereldwijd in de belangstelling vanwege zijn efficiënte amylolytische capaciteit. Hoewel *Schw. occidentalis* een toxine maakt waar bepaalde *S. cerevisiae* stammen gevoelig voor zijn, zijn er geen aanwijzingen dat dit toxine schadelijk is voor mens, dier of plant. De ascosporen die tijdens de geslachtelijke voortplanting ontstaan verstuiven niet.

Op grond van bovenstaande gegevens concludeert de COGEM dat *Schw. occidentalis* niet pathogeen is. Zij adviseert *Schw. Occidentalis* daarom in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo. Vanwege het apathogene karakter van *Schw. occidentalis* acht zij de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden met gg-*Schw. occidentalis* verwaarloosbaar klein. De COGEM adviseert daarom deze werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

*L. fungicola* en *T. aggressivum* zijn bodemschimmels die ernstige ziekte kunnen veroorzaken bij champignons. *T. aggressivum* f. *aggressivum* produceert tevens een mycotoxine die, naast een remmende werking op de groei van champignons, mogelijk ook schadelijk is voor tomatenstekjes en pekelkreeftjes. De COGEM merkt op dat niet is vastgesteld tot welke forma de stam behoort waarmee de aanvrager wil experimenteren. Op basis van het ziekteverwekkende vermogen bij champignons is de COGEM van mening dat *L. fungicola* en *T. aggressivum* schimmelpathogenen zijn. De COGEM adviseert de twee schimmelsoorten daarom op te nemen in pathogeniteitsklasse 2.

Gezien de aard van de voorgenomen werkzaamheden is de COGEM van mening dat deze op ML-I niveau uitgevoerd kunnen worden. Vanwege het sporulerende karakter van *L. fungicola* en *T. aggressivum* dienen open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse-II uitgevoerd te worden ten einde verspreiding van sporen naar het milieu te voorkomen.

Op voornoemd inperkingsniveau en met inachtneming van bovenstaand aanvullend voorschrift acht de COGEM het risico van de beschreven werkzaamheden met (gg-) *L. fungicola* en (gg-) *T. aggressivum* verwaarloosbaar klein.

### Referenties

1. Boekhout T (2011). Classificatie humaan- en dierpathogene fungi. COGEM onderzoeksrapport CGM 2011-08
2. James TY *et al.* (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature 443: 818-822
3. COGEM (2014). Pathogeniteitsclassificatie van mycotoxineproducerende schimmels. COGEM advies CGM/140121-01

4. Dohmen RJ & Hollenberg CP (1996). *Schwanniomyces occidentalis*. In Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook. Edited by Wolf K. Springer, New York
5. Chen WB *et al.* (2000). Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol* 66: 5348-5352
6. Zare R & Gams W (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycol Res* 112: 811-824
7. Centraal Bureau Schimmelcultures (CBS). *Verticillium fungicola*. <http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=58315&Fields=All> (bezocht 24 februari 2015)
8. Berendsen RL *et al.* (2010). *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Mol Plant Pathol* 11: 585-595
9. Berendsen R (2011). Dry bubble disease of the white button mushroom. Ecology and control of *Lecanicillium fungicola*. Uitgeverij BOXPress, Oosterwijk
10. Harman GE *et al.* (2004). Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2: 43-56
11. Samuels GJ *et al.* (2002). Trichoderma species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170
12. O'Brien M *et al.* (2014). Proteomic response of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* to *Agaricus bisporus* tissue and mushroom compost. *Fungal Biol* 118: 785-791
13. Schuster A & Schmoll M (2010). Biology and biotechnology of Trichoderma. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 787-799
14. Krupke OA *et al.* (2003). The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycol Res* 107: 1467-1475
15. Cabras A *et al.* (2006). Occurrence, isolation and biological activity of phytotoxic metabolites produced in vitro by *Sphaeropsis sapinea*, pathogenic fungus of *Pinus radiata*. *Eur J Plant Pathol* 115: 187-193
16. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene schimmels. COGEM advies CGM/141218-03
17. American Type Culture Collection (ATCC): Fungi and yeast. [http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Fungi\\_and\\_Yeast.aspx?geo\\_country=nl](http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Fungi_and_Yeast.aspx?geo_country=nl) (bezocht: 26 februari 2015)