

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 30 oktober 2020
KENMERK CGM/201030-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van *Neurospora intermedia* en *Neurospora tetrasperma*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een verzoek van Wageningen Universiteit (IG 20-230_2.8-000) is de COGEM gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Neurospora intermedia* en *Neurospora tetrasperma* en over de plaatsing van deze twee schimmelsoorten op Lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo. De COGEM deelt u hierover het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de schimmelsoorten *Neurospora intermedia* en *Neurospora tetrasperma* en de plaatsing van deze twee soorten op Bijlage 2, Lijst A1 van de Regeling ggo.

Neurospora intermedia en *Neurospora tetrasperma* zijn filamenteuze schimmels en behoren samen met *Neurospora crassa*, *Neurospora sitophila* en *Neurospora discreta* tot de neurosporasoorten die overvloedig poederachtige en opvallende oranjekleurige conidiën (i.e. asexuele sporen) vormen. Deze neurosporasoorten worden vaak aangetroffen op verbrande vegetatie.

De COGEM heeft geen aanwijzingen gevonden voor pathogeniteit van *N. intermedia* of *N. tetrasperma*. *N. intermedia* wordt bovendien gebruikt als voedsel en om voedsel te produceren.

Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om deze twee schimmelsoorten in pathogeniteitsklasse 1 in te delen en hen op Bijlage 2, Lijst A1 van de Regeling ggo te plaatsen.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie van de schimmelsoorten *Neurospora intermedia* en *Neurospora tetrasperma*

COGEM advies CGM/201030-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Wageningen Universiteit (IG 20-230) is de COGEM gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Neurospora intermedia* en *Neurospora tetrasperma*, en over de plaatsing van deze twee schimmelsoorten op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratorium-condities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, en inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw 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.

3. Opportunisten

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet-pathogeen beschouwd en kunnen, als aan één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo geplaatst worden.

4. Taxonomie en naamgeving

De taxonomie van schimmels is complex. Mede door de toenemende informatie over genomesequenties is de taxonomie aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort.

Veel schimmels hebben zowel een geslachtelijk (teleomorf) als een ongeslachtelijk (anamorf) stadium. Omdat zij er in deze stadia verschillend uitzien, hebben verscheidene schimmels in het verleden meerdere soortnamen gekregen. In 2011 is door het 'International Botanical Congress' besloten dat het tot dan toe gebruikelijke duale nomenclatuursysteem van schimmels komt te vervallen en dat vanaf januari 2013 één schimmel slechts één naam mag hebben.² Op dit moment bevindt het nomenclatuursysteem van schimmels zich nog steeds in een overgangssituatie waarbij de nieuwe naamgeving nog niet altijd consistent is doorgevoerd.

5. Beschrijving van de organismen

Neurospora intermedia en *Neurospora tetrasperma* zijn filamenteuze schimmels, die behoren tot het genus *Neurospora* binnen de familie van de Sordariaceae (Ascomycota). Dit genus bestaat uit ten minste 26 soorten die voornamelijk worden aangetroffen in vochtige (sub)tropische gebieden.^{3,4} Er zijn echter soorten, zoals *N. tetrasperma*, die ook in West-Europa voorkomen.⁴

N. intermedia en *N. tetrasperma* behoren samen met *Neurospora crassa*, *Neurospora sitophila* en *Neurospora discreta* tot de neurosporasoorten die overvloedig poederachtige en opvallende oranjeleukige conidiën (i.e. asexuele sporen) vormen.⁵ Deze neurosporasoorten zijn obligaat aerobe organismen⁵ en zijn met uitzondering van *N. tetrasperma* heterothallisch. Dit betekent dat alleen stammen die tot verschillende mating-typen (a of A) behoren met elkaar kunnen kruisen.³ *N. tetrasperma* is pseudohomothallisch. In tegenstelling tot echte homothallische soorten die geen mating-typen hebben, heeft *N. tetrasperma* (net als de andere neurosporasoorten) deze mating-typen wel. Doordat *N. tetrasperma* stammen meestal meerdere kernen (heterokaryotisch) van tegenovergestelde mating-typen bevatten en daardoor in één *N. tetrasperma* stam zowel het a als het A mating-

type aanwezig zijn, kunnen *N. tetrasperma* stammen zichzelf - net als de echte homothallische soorten - bevruchten.³

Na kruising of zelfbevruchting worden ascosporen (i.e. sexuele sporen) gevormd. Deze sporen zijn resistent tegen hitte en worden geactiveerd door de stoffen die vrijkomen uit verbrand plantmateriaal.⁶ Neurosporasoorten worden vaak aangetroffen op verbrande vegetatie.⁵ Ook worden zij aangetroffen op restmateriaal afkomstig van suikerfabrieken, gestoomd hout, gestoomde grond en in bakkerijen.³

N. intermedia wordt gebruikt als voedsel en om voedsel (zoals oncom, dit zijn gefermenteerde pinda's) te produceren.^{5,7} *N. intermedia* werd in 1927 voor het eerst geïsoleerd van een maïskolf uit Jiangsu (China).⁸ *N. intermedia* is ook aangetroffen op suikerrietvelden die regelmatig platgebrand worden en geïsoleerd uit gestoomde grond en gestoomd zaagsel. Daarnaast is deze schimmelsoort in bakkerijen aangetroffen.³

Het eerste isolaat van *N. tetrasperma* was afkomstig uit Suriname en werd in 1927 voor het eerst beschreven.^{9,10} Het asexuele (anamorfe) stadium is bekend onder de naam *Chrysonilia tetrasperma* (syn. *Monilia tetrasperma*).¹¹

In enkele publicaties wordt melding gemaakt van allergene reacties bij mensen die beroepsmatig aan *Neurospora* worden blootgesteld. Deze allergische reacties worden toegeschreven aan het anamorfe stadium van *N. sitophila*, dat *Chrysonilia sitophila* en eerder ook wel *Monilia sitophila* werd genoemd.^{5,12,13,14} Het asexuele stadium van deze soort bleek ook de veroorzaker van een intraoculaire ontsteking (endoftalmitis) die optrad na vervanging van de ooglenzen en is daarnaast geïsoleerd uit ontstoken hoornvlies (keratitis). Ook is deze soort aangetroffen in dialyse vloeistof, waardoor is gesuggereerd dat *C. sitophila* mogelijk opportunistische infecties zou kunnen veroorzaken, zoals buikvliesontsteking bij personen waarbij het immuunsysteem onderdrukt is.^{12,15,16,17}

6. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft *Neurospora crassa* en *Neurospora sitophila* (anamorf *Chrysonilia sitophila*) in pathogeniteitsklasse 1 ingedeeld.^{18,19}

7. Classificaties door andere beoordelende instanties

N. intermedia en *N. tetrasperma* komen niet voor op de lijsten van humaan-, dier- en plantpathogenen van de Belgische Service Biosafety and Biotechnology (SBB)²⁰ en de Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN).²¹ Zij worden ook niet vermeld in de lijst met humaan- en dierpathogenen van de 'Health and Safety Executive' (HSE) van het Verenigd Koninkrijk.²²

Door de American Type Culture Collection (ATCC) worden beide soorten, gebaseerd op pathogeniteit voor de mens ingedeeld in biosafety level 1.²³ In de 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' (DSMZ) zijn *N. intermedia* en *N. tetrasperma* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.²⁴

De inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de pathogeniteitsclassificatie die door de COGEM wordt uitgevoerd.

8. Overweging en advies

N. tetrasperma en *N. intermedia* worden vaak gevonden op verbrande vegetatie. *N. intermedia* wordt daarnaast gebruikt als voedsel en om voedsel te produceren.^{5,25} De genomsequentie van verschillende *N. tetrasperma* stammen is bepaald.^{26,27} Daarin zijn geen sequenties aangetroffen die coderen voor bekende schadelijke genproducten, zoals mycotoxines.^{28,29}

Er zijn geen aanwijzingen dat *N. intermedia* of *N. tetrasperma* pathogeen zijn voor mens, dier of plant. *N. intermedia* en *N. tetrasperma* zijn niet opgenomen in de ‘Atlas of Clinical Fungi’, het naslagwerk met klinisch relevante schimmels.¹⁵ Ook wordt zij niet als plantpathogeen genoemd in verschillende ‘online databases’ met informatie over schimmelsoorten die ziekten bij planten veroorzaken.^{30,31,32}

Gezien het bovenstaande, is de COGEM van oordeel dat *N. tetrasperma* en *N. intermedia* apathogeen zijn en adviseert zij om beide schimmelsoorten in pathogeniteitsklasse 1 in te delen. Tevens is de COGEM van oordeel dat *N. tetrasperma* en *N. intermedia* in aanmerking komen voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2020-07-01> (bezocht: 27 oktober 2020)
2. Hawksworth DL (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2: 155-162
3. Turner BC *et al.* (2001). *Neurospora* from natural populations: a global study. *Fungal Gen. Biol.* 32: 67-92
4. Gladieux P *et al.* (2020). *Neurospora* from natural populations: population genomics insights into the life history of a model microbial eukaryote. In: Dutheil J. (eds) *Statistical population genomics. Methods Mol. Biol.*, vol 2090. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0199-0_13
5. Perkins DD & Davis RH (2000). Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5107-5109
6. Pandit A & Maheshwari (1996). Life-history of *Neurospora intermedia* in a sugar cane field. *J. Biosci.* 21: 57-59
7. Ho CC (1986). Identity and characteristics of *Neurospora intermedia* responsible for oncom fermentation in Indonesia. *Food Microbiol.* 3: 115-132
www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002086800351?via%3Dihub
8. Index Fungorum – *Neurospora intermedia*
www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=268033 (bezocht: 18 oktober 2020)
9. Index Fungorum – *Neurospora tetrasperma*
www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=255089 (bezocht: 18 oktober 2020)

10. Shear CL (1927) Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. J. Agric. Res. 34: 1019-1042
11. Species Fungorum – *Neurospora tetrasperma*
www.speciesfungorum.org/GSD/GSDspecies.asp?RecordID=255089 (bezocht: 18 oktober 2020)
12. Răpuncean S *et al.* (2018). *Chrysonilia sitophila*: Growth on different culture media and sensitivity to antifungals. Bulletin UASVM Vet. Med. 75: 207-213
13. Winck JC *et al.* (2004). Antigen characterization of major cork moulds in Suberosis (cork worker's pneumonitis) by immunoblotting. Allergy 59: 739–745
14. Tarlo SM *et al.* (1996). Occupational asthma induced by *Chrysonilia sitophila* in the logging industry. J. Allergy Clin. Immunol. 97: 1409-1413
15. De Hoog GS *et al.* (2019). Atlas of Clinical Fungi, 3rd e-edition. Utrecht / Reus.
16. Febré N *et al.* (1999). Contamination of peritoneal dialysis fluid by filamentous fungi. Rev. Iberoam. Micol. 16: 238-239
17. Theodore FH *et al.* (1962). Endophthalmitis following cataract extraction. J. Ophthalmol. 53: 35-39
18. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene schimmels. CGM/180430-01
19. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. CGM/111024-02
20. Belgian Biosafety Server. Revised lists of pathogens and their corresponding class of biological risk. <https://www.bioveiligheid.be/node/286#lists> (bezocht: 18 oktober 2020)
21. Schweizerische Eidgenossenschaft – Federal office for the environment (2013) Classification of organisms. <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht: 23 oktober 2020)
22. Health and Safety Executive. The approved list of biological agents. <https://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf> (bezocht: 23 oktober 2020)
23. American Type Culture Collection. <https://www.lgcstandards-atcc.org/> (bezocht: 18 oktober 2020)
24. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen <https://www.dsmz.de/> (bezocht: 18 oktober 2020)
25. Ho CC (1986). Identity and characteristics of *Neurospora intermedia* responsible for oncom fermentation in Indonesia. Food Microbiol. 3: 115-132
www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002086800351?via%3Dihub
26. Ellison CE *et al.* (2011). Massive changes in genome architecture accompany the transition to self-fertility in the filamentous fungus *Neurospora tetrasperma*. Genetics 189: 55-69
27. Sun Y *et al.* (2017). Large-scale suppression of recombination predates genomic rearrangements in *Neurospora tetrasperma*. Nat. Commun. 8: 1140 doi: 10.1038/s41467-017-01317-6
28. National Center for Biotechnology Information. Protein table for *Neurospora tetrasperma* FGSC 2509 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/proteins/3646/34611%7CNeurospora%20tetrasperma%20FGSC%202509/> (bezocht: 26 oktober 2020)
29. Joint Genome Institute. MycoCosm. The fungal genomics resource. *Neurospora tetrasperma* FGSC 2508 mat A v2.0 https://mycocosm.jgi.doe.gov/Neute_matA2/Neute_matA2.home.html (bezocht: 26 oktober 2020)
30. USDA ARS Fungal database. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (bezocht: 23 oktober 2020)

31. Animal and Plant health Inspection Service (APHIS). www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome (bezoekt: 23 oktober 2020)
32. Q-Bank. Comprehensive databases on quarantine plant pests and diseases. <https://qbank.eppo.int/fungi/organisms> (bezoekt: 23 oktober 2020)