

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

DATUM 5 juni 2014
KENMERK CGM/140605-02
ONDERWERP Advies bruinrot, witrot en mycorrhiza schimmelsoorten

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de wijziging van de vergunningaanvraag IG 05-015/11 met de titel 'Moleculair genetisch onderzoek aan schimmels en gisten om de biodiversiteit binnen deze groepen beter te begrijpen, alsmede de aan deze diversiteit gerelateerde virulentie en gevoeligheid voor antimycotica' ingediend door het Centraalbureau voor Schimmelcultures deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de indeling in pathogeniteitsklassen van de basidiomycete schimmelsoorten *Dichomitus squalens*, *Fomitopsis pinicola* en *Physisporinus rivulosus*, en de ascomycete schimmelsoorten *Podospora pauciseta* (voorheen *Podospora anserina*) en *Oidiodendron maius*. Tevens is zij verzocht te adviseren over het inperkingsniveau waarop de vervaardiging van genetisch gemodificeerde schimmels van deze soorten ingeschaald dienen te worden.

De COGEM adviseert *D. squalens*, *P. rivulosus*, *P. pauciseta* en *O. maius* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Zij is van mening dat voorgenomen werkzaamheden met deze schimmels op ML-I niveau uitgevoerd kunnen worden met een aanvullend voorschrift voor sporenvormende schimmelcultures. De soort *F. pinicola* leeft parasitair op diverse boomsoorten. De COGEM adviseert deze schimmelsoort in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en werkzaamheden met deze soort uit te voeren op ML-II inperkingsniveau.

Onder de geadviseerde inperkingsniveaus en met inachtneming van het aanvullende voorschrift voor sporenvormende schimmels acht de COGEM het risico van de beschreven werkzaamheden met deze schimmelsoorten 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. Peter-Jan Keizer (Commissie Paddenstoelen en Natuurbehoud van de Nederlandse Mycologische Vereniging).

Classificatie van bruinrot, witrot en mycorrhiza schimmelsoorten

COGEM advies CGM/140605-02

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de wijziging van een vergunning met de titel 'Moleculair genetisch onderzoek aan schimmels en gisten om de biodiversiteit binnen deze groepen beter te begrijpen, alsmede de aan deze diversiteit gerelateerde virulentie en gevoeligheid voor antimycotica' ingediend door het Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

De adviesvraag betreft de pathogeniteitsclassificatie van vijf schimmelsoorten (*Dichomitus squalens*, *Fomitopsis pinicola*, *Physisporinus rivulosus*, *Podospora pauciseta* (voorheen *P. anserina*) en *Oidiodendron maius*), en handelingen met genetisch gemodificeerde (gg) varianten van deze schimmels ten behoeve van onderzoek aan 'DNA sequenties en mutante sequenties van genen en hun flankerende gebieden betrokken bij de omzetting van plantenbiomassa'. De betreffende schimmels zijn onder meer relevant voor de industrie omdat zij met behulp van specifieke enzymen plantenbiomassa en kleurstoffen kunnen afbreken. De schimmels zijn nog niet eerder door de COGEM geclassificeerd.^{1,2}

Pathogeniteitsclassificatie 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'

De inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) is mede afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van het organisme. Volgens de 'Integrale versie van de Regeling ggo' en het 'Besluit ggo' worden micro-organismen (virussen, bacteriën, schimmels, parasieten) ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.³ 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. De criteria voor indeling in pathogeniteitsklassen 1 en 2 zijn als volgt gedefinieerd.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 1 is van toepassing als het micro-organisme minimaal aan één van de volgende criteria voldoet:

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

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt,

terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen of organismen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel eveneens als niet pathogeen beschouwd.

Aspecten van belang voor de pathogeniteitsclassificatie van schimmels

Schimmels vormen taxonomisch gezien een zeer heterogene groep en zijn onderverdeeld over verschillende fyta waaronder de ascomyceten en basidiomyceten. Op grond van hun leefwijze in het ecosysteem worden schimmels onder meer onderverdeeld in saprotrofe (ook wel saprofytische), parasitaire en symbiotische schimmels.⁴

Een saprotrofe schimmel leeft van dood organisch materiaal, in tegenstelling tot een parasitaire schimmel die zijn voeding haalt uit levend organisch materiaal.⁵ Parasitaire schimmels infecteren levende planten en kunnen deze beschadigen of zelfs doden. Zwakteparasieten infecteren planten die al beschadigd of verzwakt zijn.

Parasitaire schimmels worden onderverdeeld in biotrofe en necrotrofe schimmels.⁵ Biotrofe schimmels leven uitsluitend op en ten koste van het levende weefsel van organismen. Necrotrofe schimmels leven op dood weefsel van levende organismen. Tijdens infectie worden op de plaats van binnendringing de gastheercellen gedood en leven de schimmels vervolgens voort, gebruik makend van het beschikbaar gekomen dode organische materiaal.

Symbiotische schimmels leven met andere organismen samen. Als beide organismen wederzijds voordeel van elkaar hebben, spreekt men van mutualisme. Voorbeelden van mutualismen zijn korstmossen (schimmels samenlevend met algen of cyanobacteriën) en mycorrhizae (schimmels samenlevend met plantenwortels).^{4,5}

Sommige schimmels veroorzaken houtrot, zoals witrot of bruinrot.⁵ Witrotschimmels produceren verschillende soorten enzymen die in staat zijn de donker gekleurde ligninecomponent van hout af te breken. Bruinrotschimmels produceren verschillende soorten enzymen die in staat zijn de bleekgekleurde (hemi)cellulose component van hout af te breken.⁵

Schimmels verspreiden zich via sporen die gevormd worden tijdens geslachtelijke (teleomorfe) of ongeslachtelijke (anamorfe) voortplanting. Geslachtelijke sporen worden onder meer in zakjes, of exogeen op knotsvormige structuren gevormd (respectievelijk ascosporen bij ascomycete schimmels (zakjeszwammen) en basidiosporen bij basidiomycete schimmels (steeltjeszwammen)).^{4,5} Ongeslachtelijke of asexuele sporen worden onder meer gevormd door de fragmentatie of afsnoering van de filamenteuze schimmeldraad, en worden veelal aangeduid als conidiosporen (arthrosporen specifiek voor basidiomyceten) of chlamydosporen. Chlamydosporen (dikwandige rustsporen) zijn in staat onder ongunstige omstandigheden te overleven. Zowel geslachtelijke als ongeslachtelijke sporen kunnen zich via lucht en water verspreiden.⁴

D. squalens

D. squalens is een basidiomyceet en Houtzwam.^{6,7,8} De soort is voor het eerst in 1886 onder de naam *Trametes squalens* beschreven en kent 13 synoniemen.⁶ *D. squalens* wordt aangetroffen in het hout van zowel levende als dode dennen (*Pinus*).⁹ In levende bomen veroorzaakt de schimmelsoort 'heartrot': het kernhout wordt door witrot aangetast. *D. squalens* komt voor op het noordelijke halfrond waaronder Centraal en Zuid-Europa (zeldzaam), maar wordt in Nederland niet aangetroffen.⁷ In Noord-Amerika komt de schimmelsoort algemeen voor en is deze een belangrijke veroorzaker van 'heartrot' in *Pinus ponderosa*. Het betreft geen ernstige of massale aantastingen.^{9,10}

In cultuur vormt *D. squalens* arthro-, chlamydo- en basidiosporen.¹¹ De schimmel is in staat kleurstoffen en lignine af te breken, en is mogelijk relevant voor toepassingen in de biodegradatie van plantenbiomassa.^{12,13,14,15,16}

F. pinicola

F. pinicola, de Roodgerande Houtzwam, is een basidiomyceet.^{6,7,8} De soort is voor het eerst in 1810 onder de naam *Boletus pinicola* beschreven en kent meer dan 50 synoniemen.⁶ *F. pinicola* wordt het meest aangetroffen op levende stammen van *Picea abies* (Fijnspar), en daarnaast op loofbomen als Beuk, Haagbeuk, Berk en Esdoorn (individuele, doorgaans oudere bomen). De schimmelsoort is parasitair (necrotroof) maar wordt ook als saprotroof op dood hout waargenomen en veroorzaakt bruinrot.^{7,17} Door verrotting van het kernhout breken bomen af. Dicht op elkaar staande Fijnspar aanplantingen kunnen daarbij zwaar aangetast worden waarbij de gehele opstand verloren gaat. Aantastingen van gelijkjarige monoculturen op niet optimale bodemomstandigheden zijn in de Belgische Ardennen waargenomen. *F. pinicola* wordt over het gehele noordelijk halfrond aangetroffen.^{7,9} In Nederland komt de schimmelsoort algemeen voor.

In cultuur vormt *F. pinicola* chlamydosporen en soms basidiosporen.¹¹ Enzymen van *F. pinicola* zijn mogelijk inzetbaar bij het afbreken van bestrijdingsmiddelen als DDT en organische bodemverontreinigingen.^{18,19} Daarnaast zijn de cellulose-afbrekende enzymen mogelijk relevant voor toepassingen in de biodegradatie van plantenbiomassa.²⁰

P. rivulosus

P. rivulosus is een basidiomyceet en Buisjeszwam.^{6,7,8} De soort is voor het eerst in 1868 onder de naam *P. rivulosus* beschreven en kent zeven synoniemen.⁶ *P. rivulosus* is een saprotrofe schimmel, wordt aangetroffen in het hout van dennen (*Pinus*) en veroorzaakt witrot. *P. rivulosus* komt in Nederland niet voor en is zeer zeldzaam in Zuid-Europa.⁷ Wel komt de schimmel voor in Noord-Amerika, maar veroorzaakt daar nauwelijks schade.

In cultuur vormt *P. rivulosus* chlamydosporen en soms arthrosporen.¹¹ Aangezien *P. rivulosus* in staat is lignine af te breken en sommige bij de afbraak betrokken enzymen stabiel zijn onder extreme omstandigheden zoals lage pH en relatief hoge temperaturen, is de schimmel mogelijk relevant voor toepassingen in de biotechnologie.^{21,22}

P. pauciseta

P. pauciseta is een Menhirzwammetje en ascomycet.⁶ *P. pauciseta* is voor het eerst in 1857 onder de naam *Malinvernia anserina* beschreven en kent vijf synoniemen.^{6,7,8} De naam *P. anserina* wordt nog veel gebruikt.

P. pauciseta leeft als saprotroof op de mest van herbivoren zoals paard, konijn, hert en ree, en wordt over de gehele wereld aangetroffen.²³ In Nederland is de soort recent waargenomen. Van *P. pauciseta* zijn geen aseksuele voortplantingsstructuren bekend. De soort plant zich seksueel door middel van ascosporen voort. Aangezien *P. pauciseta* in staat is lignine af te breken, is de schimmel mogelijk relevant voor toepassingen in de biodegradatie van plantenbiomassa.²⁴

O. maius

O. maius (anamorf; teleomorfe naam is *Byssosascus striatiosporus*) behoort tot de ascomyceten en is voor het eerst in 1962 beschreven.⁶ De soort is ook bekend onder de naam *O. citrinum*.⁶ *O. maius* leeft als een mycorrhizae vormende schimmel op de wortels van *Ericaceae* (Heideachtigen), maar kan ook saprotroof groeien, bijvoorbeeld op turf en veenmos.^{25,26,27} In cultuur vormt *O. maius* conidiosporen.¹¹ *O. maius* is tolerant voor hoge concentraties metalen in de bodem.^{27,28}

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil van voornoemde vijf schimmelsoorten genen en enzymen karakteriseren betrokken bij de afbraak van plantenbiomassa. Daarnaast wil de aanvrager onderzoeken welke genetische elementen interessant zijn voor het verbeteren van enzymmengsels voor industriële toepassingen. Tevens wil de aanvrager mutanten van deze schimmelsoorten maken.

De voorgenomen werkzaamheden bestaan uit het transformeren van de vijf schimmelsoorten met DNA constructen, al dan niet met behulp van *Rhizobium radiobacter* (voorheen bekend als *Agrobacterium tumefaciens*).²⁹ De donorsequenties betreffen cDNA, DNA en gemuteerde sequenties van genen en flankerende gebieden betrokken bij de omzetting van plantenbiomassa.

Eerdere COGEM adviezen en andere classificaties

Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene schimmels.^{1,2} Geen van de schimmels uit de huidige aanvraag werden in dit eerdere advies geclassificeerd. Recent heeft de COGEM een negental basidiomycete witrot schimmels geclassificeerd waarbij twee schimmelsoorten in pathogeniteitsklasse 2 zijn ingedeeld. De overige 10 schimmelsoorten zijn geclassificeerd als niet pathogeen.³⁰

Op de lijst met plantpathogenen van het Belgische Wetenschappelijke Instituut voor Volksgezondheid wordt *F. pinicola* aangeduid als pathogeniteitsklasse 2.³¹ Op de lijst met humaan- en dierpathogenen van het Instituut komt geen van de vijf te classificeren schimmels voor. Door de American Type Culture Collection (ATCC) worden, gebaseerd op pathogeniteit voor de mens, de vijf schimmelsoorten aangeduid als biosafety level 1.³²

Overweging en advies

De in dit advies beschreven basidiomycete schimmelsoorten *D. squalens*, *F. pinicola*, en *P. rivulosus* komen voor op bomen of boomstronken. De beschreven ascomycete schimmelsoorten komen voor in de mest van sommige herbivoren (*P. pauciseta*), dan wel als mycorrhizapartner of als saprotroof van veenmos en turf (*O. maius*). De COGEM is niet bekend met publicaties die de vijf schimmelsoorten relateren aan pathogeniteit voor mens of dier. Gezien hun leefwijze in de natuur, acht de COGEM het niet aannemelijk dat voornoemde schimmelsoorten pathogeen zijn voor mens of dier. *D. squalens*, *P. rivulosus*, *P. pauciseta* en *O. maius* zijn saprotroof. Hoewel *D. squalens* 'heartrot' kan veroorzaken, is de schade op locaties waar de schimmel veelvuldig wordt waargenomen (Noord-Amerika), beperkt. De COGEM adviseert deze vier schimmelsoorten op te nemen in pathogeniteitsklasse 1. *F. pinicola* is necrotroof en kan grootschalige aanplant van de Fijnspar aantasten. De COGEM beschouwt deze schimmelsoort als pathogeen voor planten en adviseert deze in pathogeniteitsklasse 2 in te delen.

Gezien de aard van de voorgenomen werkzaamheden is de COGEM van mening dat deze, voor zover het *D. squalens*, *P. rivulosus*, *P. pauciseta* en *O. maius* betreft, op ML-I niveau uitgevoerd kunnen worden. De werkzaamheden met (gg-) *F. pinicola* adviseert zij uit te voeren op ML-II inperkingsniveau.

Voornoemde schimmelsoorten kunnen sporen vormen in cultuur. De COGEM adviseert daarom om het aanvullende voorschrift in acht te nemen dat de (gg-)schimmelcultures alleen in een veiligheidskabinet van klasse-II geopend en gehanteerd worden. Op voornoemde inperkingsniveau's en met inachtneming van bovenstaand aanvullend voorschrift acht de COGEM het risico van de beschreven werkzaamheden met (gg-) *D. squalens*, *F. pinicola*, *P. rivulosus*, *P. pauciseta* en *O. maius* verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-02
2. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-03
3. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
4. Gould AB (2010). Fungi: Plant pathogenic. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Eds Schaechter M *et al.* Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
5. Ozinga WA *et al.* (2013). Paddenstoelen in het natuurbeheer. OBN preadvies paddenstoelen – Deel 1: Ecologie, knelpunten en kennislacunes. Directie Agrokennis, Ministerie van Economische Zaken Rapport nr. 2013/OBN181-DZ
6. Index fungorum (mei 2014). <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>
7. Arnolds E & van den Berg A (2013). Beknopte standaardlijst van Nederlandse paddenstoelen. Eds Nederlandse Mycologische vereniging
8. Nederlands soortenregister (mei 2014). <http://www.nederlandsesoorten.nl/>
9. Ryvarden L & Gilbertsen RL (1993). European polypores. Fungiflora. Oslo
10. Synclair WA *et al.* (1987). Diseases of trees and shrubs. Cornell University

11. Stalpers, J.A. (1978). Identification of Wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. Studies in Mycology Nr. 16. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn
12. Chander *et al.* (2004). Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. J Ind Microbiol Biotechnol 31: 94-97
13. Aggelis G *et al.* (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. Appl Microbiol Biotechnol 59: 353-360
14. Bak JS *et al.* (2010). Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens*. New Biotechnology 27(4): 424-434
15. Dong YC *et al.* (2013). Biodegradation of chestnut shell and lignin-modifying enzymes production by the white-rot fungi *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata*. Bioprocess Biosyst Eng 37: 755-764
16. Knezevic A *et al.* (2013). Lignin degradation by selected fungal species. Biosource Technology 138: 117-123
17. SoortenBank.nl (mei 2014). <http://www.soortenbank.nl/>
18. Purnomo AS *et al.* (2008). Degradation of 1,1,1-Trichloro-2,2-Bis (4-Chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi. J of Bioscience and Bioengineering 105(6): 614-621
19. Tsujiyama S & Okada A (2013). Biodegradation of polyvinyl alcohol by a brown-rot fungus, *Fomitopsis pinicola*. Biotechnol Lett 35: 1907-1911
20. Yoon JJ *et al.* (2008). Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola*. Biotechnol Lett 30: 1373-1378
21. Hilden K *et al.* (2007). Novel thermotolerant laccases produced by the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. Appl Microbiol Biotechnol 77: 301-309
22. Jarvinen J *et al.* (2012). Screening of white-rot fungi manganese peroxidases: a comparison between the specific activities of the enzyme from different native producers. AMB Express 2: 62-71
23. Doveri, F., (2004). Fungi fomicoli Italiani. Assoc. Micol. Bresadola, Trento
24. Xie N *et al.* (2014). Systematic gene deletions evidences that laccases are involved in several stages of wood degradation in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Environ Microbiol 16(1): 141-161
25. Piercey MM *et al.* (2002). Saprobic characteristics of three fungal taxa from ericacean roots and their association with the roots of *Rhododendron Groenlandicum* and *Picea mariana* in culture. Mycorrhiza 12: 175-180
26. Rice AV & Currah RS (2006). *Oidiodendron maius*: saprobe in *Sphagnum* peat, mutualist in Ericaceous Roots? In Microbial Root Endophytes Soil Biology, 9: 227-246. Eds Schulz BJE *et al.* Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg
27. Joint Genome Institute (mei 2014). <http://genome.jgi.doe.gov/Oidma1/Oidma1.home.html>
28. Vallino M *et al.* 2009. Cu, Zn superoxide dismutase and zinc stress in the metal-tolerant ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius* Zn. FEMS Microbiol Lett 293: 48-57
29. Young JM *et al.* (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Con1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 89-103
30. COGEM (2014). Classificatie basidiomycete witrot schimmels. COGEM advies CGM/140227-03

31. ISP- WIV. Wetenschappelijk instituut voor de volksgezondheid (mei 2014).
http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/fyto_fungi.pdf
32. American Type Culture Collection: Fungi and yeast (mei 2014).
http://www.lgcstandardsatcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Fungi_and_Yeast.aspx