

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

DATUM 30 september 2019
KENMERK CGM/190930-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van *Flammulina velutipes*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een verzoek van Wageningen Universiteit om de eetbare paddenstoel *Flammulina velutipes* op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene organismen) te plaatsen (IG 19-245_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de basidiomycete schimmelsoort *Flammulina velutipes*. Ook is de COGEM gevraagd of deze schimmel op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo geplaatst kan worden.

F. velutipes is een witrotschimmel die voorkomt op dood hout. De paddenstoel wordt ook wel het 'Gewoon fluweelpootje' genoemd. De paddenstoel wordt veelvuldig aangetroffen in Nederland als winterpaddenstoel. De paddenstoel is eetbaar, wordt al lange tijd op grote schaal gecultiveerd, met name in Japan, en is vooral populair in de Oost-Aziatische keuken. Uit *F. velutipes* zijn verschillende bioactieve componenten geïsoleerd die in verband zijn gebracht met medicinale eigenschappen. Ook produceert de schimmel het zogenaamde flammutoxine, een eiwit met hemolytische eigenschappen. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen aanwijzingen dat *F. velutipes* pathogeen is voor mensen, dieren of planten.

De COGEM is van oordeel dat *F. velutipes* niet pathogeen is voor mens, dier en plant. Zij adviseert daarom deze schimmel in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.



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

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Vorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

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

Pathogeniteitsclassificatie van de schimmel *Flammulina velutipes*

COGEM advies CGM/190930-01

Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Wageningen Universiteit (IG 19-245) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de schimmelsoort *Flammulina velutipes*, en over de plaatsing van deze soort 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, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).

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.

Aspecten van belang voor de pathogeniteitsclassificatie van schimmels

Schimmels omvatten verschillende fyta waaronder de ascomyceten en basidiomyceten.² De taxonomie van schimmels is complex. Mede door de toenemende informatie over genomsequenties is de taxonomie aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort.

Op grond van hun leefwijze in het ecosysteem worden schimmels onder meer verdeeld in saprotrofe (ook wel saprofytische), parasitaire en symbiotische schimmels.^{2,3} Symbiotische schimmels leven met andere organismen samen, waarbij tenminste één van de soorten daar voordeel van ondervindt. Indien de samenlevende soorten wederzijds voordeel van elkaar ondervinden, spreekt men van mutualisme. Saprotrofe schimmels leven van dood organisch materiaal. Parasitaire schimmels infecteren levende organismen en kunnen deze beschadigen of zelfs doden. Zwakteparasieten infecteren planten die al beschadigd of verzwakt zijn.

Sommige schimmels veroorzaken houtrot, zoals witrot of bruinrot.⁴ 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

Flammulina velutipes

Flammulina velutipes, ook wel het Gewoon fluweelpootje genoemd, is een schimmel die behoort tot de basidiomyceten en valt onder de plaatjeszwammen (orde *Agaricales*). *F. velutipes* is saprotroof en staat bekend als witrotschimmel. De paddenstoel is in Nederland vaak te vinden van november tot maart en staat daarom bekend als winterpaddenstoel. Bij temperaturen net boven het vriespunt worden de vruchtlichamen gevormd, die geelbruin van kleur zijn en fluwelig behaarde stelen hebben. De hoed van de paddenstoel is 2 tot 10 cm breed en de steel kan 3 tot 8 cm lang worden. De lamellen zijn wit tot bleekgeel en de sporen zijn wit.⁶ De soort kan verschillende suikers (sucrose, maltose, cellobiose, cellotriose, en cellotetraose) omzetten naar ethanol.⁷

De paddenstoel is eetbaar en komt voor in Europa, Noordelijk Azië en Noord-Amerika. De paddenstoel wordt ook in Nederland veelvuldig aangetroffen.⁸ *F. velutipes* komt voor op onbewerkte dode houtige planten of houtige plantdelen in loofbossen (zoals Eik, Els, Es, Kastanje en Iep) op (matig) vochtige, voedselrijke klei.⁹ Bekend is dat de schimmel aangetroffen kan worden op kastanjabomen die aangetast zijn door de kastanjabloedingsziekte.^{10,11} Hierbij zijn de bomen sterk verzwakt door infectie met een *Pseudomonas*bacterie die de sapstromen in de bast blokkeert. In één publicatie wordt aangegeven dat *F. velutipes* ook op levende bomen (Iep) werd aangetroffen.¹²

Uit *F. velutipes* zijn verschillende bioactieve componenten geïsoleerd die in verband zijn gebracht met medicinale eigenschappen. Zo worden onder meer anticarcinogeen en cholesterolverlagende eigenschappen toegeschreven aan deze paddenstoel.¹³ Ook is gerapporteerd dat *F. velutipes in vitro* antagonistische activiteit vertoont tegen andere (pathogene) schimmelsoorten.¹² Daarnaast wordt onderzoek gedaan naar het gebruik van een genetisch gemodificeerde *F. velutipes* als oraal vaccin tegen hepatitis B.¹⁴

Van de soort is bekend dat deze flammutoxine bevat. Dit eiwit kan door porie-vorming lysis veroorzaken bij (bloed)cellen, en electrocardiale veranderingen in dieren wanneer het parentaal (via inspuiting) is toegediend.¹⁵ Het eiwit wordt echter niet toxisch geacht als het oraal wordt toegediend,¹⁶ en ook is er *in vitro* geen cytotoxisch effect waargenomen van dit eiwit op humane darmcellen (Caco-2 cellen).¹⁷ Een onderzoek bij muizen toonde aan dat het eten van gedroogde *F. velutipes* (5 dagen achtereenvolgend) een verhoogd plasma creatine kinase veroorzaakte, dat een indicatie kan zijn voor schadelijke effecten aan skelet- en hartspieren (rhabdomyolyse).¹⁶ Er werden echter geen visuele signalen van toxiciteit waargenomen, zoals diarree, lethargie of aanwezigheid van myoglobine in de urine. Ook werd op basis van histologisch onderzoek geen necrose of ontsteking van skeletspieren, hart, of andere organen waargenomen. De hoeveelheden die aan de muizen gevoerd werden, zouden bij mensen overeenkomen met een opname van 190-280 gram *F. velutipes* per dag. Deze hoeveelheden zijn in theorie mogelijk, maar niet gebruikelijk.

De paddenstoel wordt sinds 800 AD gecultiveerd.¹² *F. velutipes* wordt met name in Japan op grote schaal geteeld en behoort tot de zes meest gecultiveerde paddenstoelsoorten ter wereld.⁷ De gecultiveerde variant wordt ook wel enoki of enokitake genoemd en verschilt morfologisch gezien van de wilde variant, omdat de gecultiveerde variant in het donker geteeld wordt. De paddenstoel wordt zowel rauw als gekookt gegeten en is vooral populair in de Oost-Aziatische keuken. In de literatuur is weinig tot geen informatie te vinden over mogelijke schadelijke effecten bij mensen na eten van *F. velutipes*. In één (Japanse) publicatie is anafylaxie gerapporteerd na consumptie van een gerecht waarin *F. velutipes* verwerkt was, hoewel bij een eerdere consumptie van dezelfde maaltijd geen nadelige effecten werden ervaren.

Eerder COGEM advies

F. velutipes is nog niet eerder door de COGEM geïnclassificeerd. Wel heeft de COGEM verscheidene keren basidiomycete schimmelsoorten geïnclassificeerd, waaronder saprotrofe witrotschimmelsoorten.^{e.g.,18,19,20} Enkele basidiomycete schimmelsoorten waren plantpathogeen en zijn in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld. De overige schimmelsoorten zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.

Classificaties andere beoordelende instanties

Op de lijsten van humaan-, dier- en plantpathogenen van de Belgische Service Biosafety and Biotechnology (SBB)²¹ en de Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN)²², komt *F. velutipes* niet voor. Door de American Type Culture Collection (ATCC)²³ wordt, gebaseerd op pathogeniteit voor de mens, *F. velutipes* ingedeeld in biosafety level 1. In de 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' (DSMZ)²⁴ is *F. velutipes* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.

Overweging en advies

De in dit advies beschreven saprotrofe witrotschimmel *F. velutipes* komt voor op dood hout van loofbomen. De paddenstoel wordt veelvuldig in Nederland aangetroffen en is daarnaast geschikt voor consumptie. Er worden positieve gezondheidseffecten toegeschreven aan consumptie van deze paddenstoel. Naast verschillende bioactieve componenten bevat de schimmel ook flammutoxine, een eiwit dat hemolytische eigenschappen heeft.

F. velutipes (enokitake) wordt al lange tijd op grote schaal geteeld. De paddenstoel wordt ook rauw gegeten en is met name populair in de Oost-Aziatische keuken. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat *F. velutipes* pathogeen is voor mensen, dieren of planten. In één geval is er na orale consumptie een allergische reactie opgetreden en een onderzoek bij muizen liet bij meerdaagse orale consumptie slechts milde effecten zien (verhoogde bloedwaarden). De schimmel staat niet vermeld in de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels.²⁵ Ook is de soort opgenomen in de lijst met niet-giftige paddenstoelen van het Nationaal Vergiftigingen Informatie Centrum van UMC Utrecht.²⁶

De schimmel kan aangetroffen worden op dood hout en verzwakte kastanjabomen. Ook is beschreven dat *F. velutipes* op levende iepen is waargenomen, zonder vermelding van schade door de schimmel. *F. velutipes* staat niet vermeld als plantpathogeen in 'online databases' met informatie over schimmelsoorten die ziekten bij planten veroorzaken.^{27,28,29,30,31}

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *Flammulina velutipes* apathogeen is en adviseert zij de schimmel in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is de COGEM van oordeel dat *F. velutipes* in aanmerking komt 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/BWBR0035072/2019-07-01> (bezoekt: 17 september 2019)
2. James TY et al. (2006). Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822
3. Gould AB (2010). Fungi: Plant pathogenic. In: *Encyclopedia of Microbiology*. Third edition. Eds Schaechter M et al. Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
4. Nederlandse Mycologische Vereniging. Houtrot: over schimmels die hout afbreken. <https://www.allesoverpaddenstoelen.nl/> (bezoekt: 17 september 2019)
5. Ozinga WA et al. (2013). Paddenstoelen in het natuurbeheer. OBN preadvies paddenstoelen – Deel 1: Ecologie, knelpunten en kennislacunes. Directie Agro-kennis, Ministerie van Economische Zaken Rapport nr. 2013/OBN181-DZ
6. Permacultuur Nederland. Fluweelpootje (*Flammulina velutipes*). <https://www.permacultuurnederland.org/planten.php?zoek=&laag=&functieSER=YjowOw==&pid=110&page=0&sort=> (bezoekt: 18 september 2019)

7. Park Y *et al.* (2014). Whole genome and global gene expression analyses of the model mushroom *Flammulina velutipes* reveal a high capacity for lignocellulose degradation. PLoS ONE 9: e93560
8. NVM Verspreidingsatlas Paddenstoelen. *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer (Gewoon fluweelpootje). <https://www.verspreidingsatlas.nl/0045010> (bezoekt: 18 september 2019)
9. Arnolds E & van den Berg A (2013). Beknopte standaardlijst van Nederlandse paddenstoelen. Eds Nederlandse Mycologische vereniging
10. Bomenbieb.nl. Gewoon fluweelpootje (*Flammulina velutipes*). <https://www.bomenbieb.nl/boomziekte/gewoon-fluweelpootje/> (bezoekt: 19 september 2019)
11. Müller-Navarra A *et al.* (2014). New disease on red flowering horse chestnut (*Aesculus x carnea* Hayne) and the molecular identification of the involved pathogens. Journal für Kulturpflanzen, 66: 417–423
12. Borhani A *et al.* (2011). *Flammulina Velutipes* (Curt.: Fr.) Singer: An edible mushroom in northern forest of Iran and its antagonistic activity against selected plant pathogenic fungi. International Journal of Biology 3:162-167
13. Tang C *et al.* (2016). Golden Needle Mushroom: A Culinary Medicine with Evidenced-Based Biological Activities and Health Promoting Properties. Front. Pharmacol. 7: 474
14. Huang LH *et al.* (2019). Development of a Transgenic *Flammulina velutipes* Oral Vaccine for Hepatitis B. Food Technol. Biotechnol. 57: 105-112
15. Tung CH *et al.* (2018). Combination of on-line desalting and HPLC-UVESI-MS for simultaneous detection and identification of FIP-fve and flammutoxin in *Flammulina velutipes*. J. Food Drug Anal. 26: 1045-1053
16. Mustonen AM *et al.* (2018). Myo- and cardiotoxic effects of the wild winter mushroom (*Flammulina velutipes*) on mice. Exp. Biol. Med. 243: 639-644
17. Narai A *et al.* (2004). Effect of a pore-forming protein derived from *Flammulina velutipes* on the Caco-2 intestinal epithelial cell monolayer. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 2230-2238
18. COGEM (2014). Classificatie van Basidiomycete witrotschimmels. COGEM advies CGM/140227-03
19. COGEM (2014). Advies bruinrot, witrot en mycorrhiza schimmelsoorten. COGEM advies CGM/140605-02
20. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van een viertal schimmelsoorten. COGEM advies CGM/170316-01
21. Belgian Biosafety Server. <https://www.biosafety.be/content/about-service-biosafety-and-biotechnology-sbb> (bezoekt: 17 september 2019)
22. 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> (bezoekt: 17 september 2019)
23. American Type Culture Collection. Products. Fungi and yeasts. <https://www.lgcstandards-atcc.org/> (bezoekt: 17 september 2019)
24. DSMZ. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. <https://www.dsmz.de/> (bezoekt: 17 september 2019)
25. Atlas of Clinical Fungi. <http://www.clinicalfungi.org/> (bezoekt: 19 september 2019)

26. Nationaal Vergiftigingen Informatie Centrum UMC Utrecht.
<https://www.vergiftigingen.info/f?p=300:HOME:8096757338450> (bezocht: 18 september 2019)
27. USDA ARS Fungal database. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (bezocht: 19 september 2019)
28. Animal and Plant health Inspection Service (APHIS).
<https://usdasearch.usda.gov/search?utf8=%E2%9C%93&affiliate=usda&query=flammulina+velutipes&commit=Search> (bezocht: 19 september 2019)
29. Plant-Host Interactions, www.phi-base.org/searchFacet.htm?queryTerm (bezocht: 19 september 2019)
30. Mycobank. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. www.mycobank.org (bezocht: 19 september 2019)
31. Q-Bank. Comprehensive databases on quarantine plant pests and diseases. www.q-bank.eu/Fungi/ (bezocht: 19 september 2019)