

Aan de staatssecretaris
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 26 januari 2022
KENMERK CGM/220126-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden schimmelprotoplasten en mycovirussen

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 20-230_2.8-001 met de titel 'Vaststellen PG klasse Neurospora intermedia en N. tetrasperma en bijbehorende activiteit', deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden waarbij protoplasten van verschillende schimmelsoorten gefuseerd worden. In deze schimmels zijn zogenaamde mycovirussen van nature aanwezig. Door het fuseren van schimmelcellen kunnen mycovirussen worden overgedragen. Mycovirussen kunnen ervoor zorgen dat de schimmel slechter groeit en minder goed sporen vormt. Ook kunnen mycovirussen van invloed zijn op het ziekteverwekkend vermogen van een schimmel. De COGEM is van oordeel dat het niet aannemelijk is dat protoplastfusie en overdracht van mycovirussen ervoor zorgt dat voorheen niet-ziekteverwekkende schimmels, ziekteverwekkend worden. Bij fusie tussen soorten die behoren tot hetzelfde genus als een ziekteverwekkende schimmel, of soorten die ziekte kunnen veroorzaken bij patiënten met een onderliggend ziektebeeld, kan er in combinatie met mycovirus-overdracht, niet volledig worden uitgesloten dat een schimmel een verhoogd ziekteverwekkend vermogen verkrijgt.

De COGEM is van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn indien de werkzaamheden met protoplasten van niet-ziekteverwekkende schimmelsoorten plaatsvinden op inperkingsniveau 1. Werkzaamheden met protoplasten van schimmelsoorten die verwant zijn aan ziekteverwekkende schimmels (behorend tot hetzelfde genus), ziekteverwekkende schimmels en combinaties van ziekteverwekkende en niet-ziekteverwekkende schimmelsoorten, dienen plaats te vinden op inperkingsniveau 2.



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

Inschaling werkzaamheden met protoplasten van verschillende schimmels en endogene mycovirussen

COGEM advies CGM/220126-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met protoplasten van verschillende wildtype schimmelsoorten en endogene mycovirussen (IG 20-230). De aanvraag voor de werkzaamheden is afkomstig van de Wageningen Universiteit. De aanvrager is voornemens protoplasten van wildtype schimmelsoorten te fuseren, waarin mycovirussen aanwezig kunnen zijn. Protoplastfusie, waarbij nieuwe combinaties van genetisch materiaal ontstaan, is een techniek die leidt tot een genetisch gemodificeerd organisme volgens het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.¹ Werkzaamheden met protoplastfusie van apathogene schimmelsoorten zijn reeds vergund, de huidige aanvraag betreft protoplastfusie met pathogene schimmelsoorten en soorten die mycovirussen bevatten.

2. Protoplastfusie tussen schimmels

2.1 Protoplastfusie

Protoplastfusie van schimmelsoorten leidt tot een cel met verschillende kernen, een heterokaryon.² Bij protoplastfusie van septa-vormende schimmelsoorten zal de heterokaryotische cel een septum vormen, waarbij de kernen zullen segregeren en de cellen uitgroeien tot twee cellijnen (schimmeldraden) met elk hun eigen kern. Bij protoplastfusie met schimmelsoorten die geen septa vormen zullen de kernen naar verwachting eigen entiteiten blijven, al is niet duidelijk of de heterokaryon na protoplastfusie zonder septa kan groeien. In zeldzame gevallen kunnen de kernen na protoplastfusie versmelten (karyogamie), waarbij de regeneratie van gefuseerde protoplasten kan leiden tot cellen met gerecombineerd genetisch materiaal en een mix aan eigenschappen.^{3,37} Een voorbeeld hiervan is een hybride van twee *Blumeria graminis* 'subspecies', die een plantsoort kon infecteren die beide oudersoorten niet konden infecteren.⁴ Daarnaast bleek een humaanpathogeen schimmelisolaat een natuurlijk ontstane hybride tussen twee pathogene *Aspergillus*-soorten en had deze hybride andere infectie-gerelateerde eigenschappen dan de oudersoorten.⁵

2.2 De schimmelsoorten

De werkzaamheden van de aanvraag zullen worden uitgevoerd met negen verschillende wildtype schimmelsoorten. Drie van deze schimmelsoorten behoren tot het genus *Neurospora*, binnen de familie van de Sordariaceae (Ascomycota): *Neurospora tetrasperma*, *Neurospora crassa* en *Neurospora intermedia*. Dit zijn filamenteuze en apathogene schimmels.^{6,7} Deze schimmels vormen poederachtige en opvallende oranjekleurige aseksuele sporen (conidiën).⁸ Neurosporasoorten worden vaak aangetroffen op verbrand vegetatiemateriaal.⁸ De vierde schimmelsoort is *Podospora pauciseta* (voorheen bekend als *Podospora anserina*). Deze filamenteuze schimmel heeft de naam Menhirzwammetje, behoort tot de Ascomycota en is een apathogene schimmelsoort.⁹ *P. pauciseta* leeft

als saprotroof op uitwerpselen van herbivoren en kan lignine afbreken.¹⁰ De vijfde schimmelsoort is *Saccharomyces cerevisiae*, ook bekend als bakkerstgist. Deze schimmelsoort behoort eveneens tot de Ascomyceta en is apathogeen.⁷ *S. cerevisiae* wordt al duizenden jaren door de mens gebruikt voor de productie van brood, bier en wijn.

De overige vier schimmelsoorten behoren tot het genus *Aspergillus* en zijn filamenteuze ascomyceten. *Aspergillus nidulans* en *Aspergillus niger* zijn apathogene schimmelsoorten.^{7,11} Deze soorten zijn ook beschreven als opportunisten, omdat zij potentieel pathogeen kunnen zijn bij immuungecompromitteerde patiënten.^{12,13} Zowel *A. niger* als *A. nidulans* worden ingezet als modelorganisme in het onderzoek en voor de industriële productie van enzymen.^{14,15} De soorten *Aspergillus fumigatus* en *Aspergillus flavus* zijn pathogene schimmelsoorten.¹⁶ *A. fumigatus* kan ernstige infecties veroorzaken bij mensen met een verzwakt immuunsysteem.¹⁷ De schimmelsoort *A. flavus* kan eveneens ernstige infecties veroorzaken in vatbare mensen en produceert aflatoxines.¹⁸

3. Mycovirussen

3.1 Biologie van de mycovirussen

Mycovirussen zijn virussen die met name voorkomen in het cytoplasma en in de mitochondriën van schimmels. Mycovirussen veroorzaken voornamelijk symptoomloze en persistente infecties, wat vermoedelijk het resultaat is van co-evolutie.¹⁹ Omdat mycovirus een verzamelnaam is voor virussen die worden aangetroffen in schimmels betreft het een zeer diverse groep virussen die tot meerdere families behoren, waaronder de *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Totiviridae* en *Narnaviridae*.²⁰ Mycovirussen zijn voornamelijk dubbelstrengs RNA (dsRNA) virussen, maar daarnaast zijn er ook virussen met een enkelstrengs RNA- (ssRNA) of enkelstrengs DNA-genoom (ssDNA).²⁰ Nog regelmatig worden nieuwe soorten mycovirussen geïsoleerd en gekarakteriseerd.²¹

Verspreiding van mycovirussen kan plaatsvinden via anastomose, waarbij verschillende hyfen van de gastheer met elkaar versmelten en er cellen met meerdere nuclei ontstaan (heterokaryosis). Naast deze horizontale transmissie kan er tevens verticale transmissie plaatsvinden via vegetatieve vermeerdering en de vorming van aseksuele sporen (anamorf), zoals conidiosporen en seksuele sporen (teleomorf), zoals ascosporen. Virusverspreiding via de ascosporen is minder effectief dan via conidiosporen, omdat bij seksuele reproductie nageslacht kan ontstaan dat 'somatisch incompatibel' is en minder vatbaar voor mycovirus-infectie.^{22,23} Zo zijn mycovirussen veelvoorkomend in de anamorfe vorm van *Aspergillus*-soorten, terwijl mycovirussen zelden voorkomen in de teleomorfe vorm.^{22,23} Infectie met gezuiverde virusdeeltjes is aangetoond voor enkele mycovirussen, waaronder een ssDNA mycovirus uit *Sclerotinia sclerotiorum* en een dsRNA mycovirus uit de humaanpathogene schimmel *A. fumigatus*.^{24,25}

Onder experimentele omstandigheden kunnen mycovirussen meerdere gastheren hebben.²⁶ Een voorbeeld hierin is *Cryphonectria parasitica mitovirus 1* (CpMV1), afkomstig uit de schimmel *C. parasitica*, waarbij met protoplastfusie is aangetoond dat het gastheerbereik van CpMV1 verschillende stammen beslaat, maar ook verschillende soorten zowel binnen als buiten de Cryphonectriaceae-familie.²⁷ Ook is aangetoond dat sommige mycovirussen verschillende soorten uit het genus *Aspergillus* kunnen infecteren.²²

3.2 Hyper- en hypovirulente effecten

Mycovirussen kunnen ook de virulentie van hun gastheer verhogen of verlagen.^{28,29} Zo remt het mycovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) de groei en sporulatie van de schimmel *Cryphonectria parasitica*.³⁰ Ook zijn er mycovirussen gevonden die de virulentie verhogen, zoals bij *A. fumigatus*, waar de aanwezigheid van een mycovirus de pathogeniteit van de schimmel voor larven van de mot *Galleria mellonella* verhoogde.³¹ Een ander voorbeeld is het mycovirus *Talaromyces marneffeii partitivirus 1* (TmPV1) in de humaanpathogene schimmel *Talaromyces marneffeii*. TmPV1-geïnficeerde schimmels waren virulenter voor muizen, in vergelijking met virus-vrije isolaten.³² Hogere virulentie in *T. marneffeii* lijkt veroorzaakt te worden door veranderingen in de expressie van schimmelgenen. Een andere vorm van virulentieverhoging door mycovirussen is de productie van toxines, zoals toxineproducerende dsRNA virussen in *Saccharomyces cerevisiae* 'killer' stammen.^{33,34} De toxinen die de mycovirussen in de killer stammen produceren, zijn lethaal voor vatbare stammen van dezelfde schimmelsoort, de producerende schimmels zelf zijn bestand tegen de toxinen.

4. Werkzaamheden en voorstel inschaling

De werkzaamheden betreffen protoplastfusies tussen apathogene schimmelsoorten (pathogeniteitsklasse 1), tussen apathogene en pathogene schimmelsoorten (pathogeniteitsklasse 1 en 2 respectievelijk), en tussen pathogene schimmelsoorten (pathogeniteitsklasse 2). Protoplasten van de apathogene schimmels die met elkaar gefuseerd worden, zijn de wildtype soorten *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Neurospora intermedia*, *Neurospora tetrasperma*, *Podospora pauciseta* en *Saccharomyces cerevisiae*. Daarnaast zullen protoplasten van de pathogene schimmelsoort *Aspergillus fumigatus* gefuseerd worden met protoplasten van de pathogene soort *Aspergillus flavus*, en met protoplasten van de apathogene soorten *Aspergillus nidulans* en *Aspergillus niger*.

Van de schimmelsoorten die in de werkzaamheden gebruikt zullen worden, is voor *N. crassa*³⁵, *A. fumigatus*^{25,31} en de andere *Aspergillus*-soorten²² het voorkomen van mycovirussen beschreven. De mycovirussen kunnen per isolaat verschillen. De aanvrager gaat ervan uit dat er niet-gekaracteriseerde mycovirussen aanwezig zijn in de schimmelsoorten die worden gebruikt. Aangetroffen mycovirussen zullen voorafgaand aan protoplastfusie worden gequenced.

De inschaling voor deze werkzaamheden is als volgt voorgesteld:

- Protoplastfusie met apathogene schimmelsoorten met endogene mycovirussen op inperkingsniveau ML-I, waarbij open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II worden uitgevoerd en de kweek plaatsvindt in sporendichte containers.
- Protoplastfusie met apathogene en pathogene *Aspergillus*-soorten met endogene mycovirussen op inperkingsniveau ML-II, waarbij open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II worden uitgevoerd, de kweek plaatsvindt in sporendichte containers én tijdens de werkzaamheden handschoenen worden gedragen.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met mycovirussen. De COGEM adviseert regelmatig over de pathogeniteitsclassificaties van schimmelsoorten, en heeft recentelijk een geactualiseerd overzicht van alle pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene

schimmelsoorten uitgebracht.³⁶ De schimmelsoorten die gebruikt zullen worden in de werkzaamheden zijn opgenomen in dit overzicht.

6. Overweging

6.1 Protoplastfusie van diverse wildtype schimmels

Fusie tussen protoplasten van twee verschillende schimmelsoorten zal leiden tot een cel met verschillende kernen, een heterokaryon.³⁷ Wanneer twee schimmelsoorten fuseren zou in theorie het gastheerbereik of de pathogeniteit kunnen veranderen.^{4,5} Voor zover bij de COGEM bekend zijn er in de literatuur geen voorbeelden van apathogene schimmelsoorten die middels fusie pathogeen zijn geworden.

6.2 Combineren van mycovirussen uit verschillende schimmels

Mycovirussen zijn zeer divers, behoren tot een groot aantal families en kunnen zowel een dsRNA, ssRNA als ssDNA genoom bevatten.²⁰ De schimmel-isolaten waarmee de werkzaamheden zullen worden uitgevoerd zullen niet-gekaracteriseerde mycovirussen bevatten. In theorie kan recombinatie optreden tussen virussen wanneer zij verwant zijn en sequentieovereenkomsten hebben. Theoretisch is het niet uit te sluiten dat de (deels niet-gekaracteriseerde) mycovirussen in de betreffende schimmelsoorten verwant zijn en in staat zijn tot recombinatie. Het is echter bekend dat mycovirussen onder natuurlijke omstandigheden een gering verspreidingspotentieel hebben, waardoor de kans op verdere verspreiding zeer klein tot verwaarloosbaar klein is.

Gezien het brede gastheerbereik van de mycovirussen zullen de ontvangende schimmelprotoplasten mogelijk ook als gastheer kunnen fungeren voor de overgedragen mycovirussen. Overdracht van virussen kan leiden tot hypo- of hypervirulentie en lijkt vooral effect te hebben op de groei, sporulatie en soms op de mycotoxine productie of genexpressie van de schimmel.^{28,29} In één van de schimmelsoorten die de aanvraag betreft, *A. fumigatus*, is een mycovirus geïdentificeerd die een hypervirulent effect had en de pathogeniteit in mottenlarven verhoogde.³¹ Of de (deels niet-gekaracteriseerde) mycovirussen in de overige betreffende schimmelsoorten een hyper- of hypovirulent effect teweeg kunnen brengen is onbekend.

Bij protoplastfusie tussen schimmelsoorten kunnen mycovirussen worden overgedragen en kan er genetisch materiaal worden uitgewisseld. Bij de COGEM zijn geen voorbeelden bekend van apathogene schimmelsoorten die middels mycovirus-infectie een pathogene schimmelsoort zijn geworden. Bij protoplastfusie tussen schimmelsoorten die apathogeen zijn en niet behoren tot een genus waarvan bekend is dat het pathogene soorten bevat, is het niet waarschijnlijk dat er genetische elementen worden uitgewisseld die leiden tot pathogene eigenschappen.

Voor schimmels die opportunist zijn (potentieel pathogeen in immuungecompromiteerden), of behoren tot een genus met pathogene schimmelsoorten, is niet uit te sluiten dat in het genoom deels sequenties of genen aanwezig zijn gerelateerd aan virulentie of pathogeniteit. Door de uitwisseling en verwerving van nieuwe genetische elementen bij protoplastfusie, in combinatie met mogelijke

mycovirus-geïnduceerde hypervirulentie, is niet volledig uit te sluiten dat pathogene eigenschappen kunnen ontstaan.

7. Advies

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het niet aannemelijk is dat protoplastfusie tussen verschillende wildtype apathogene schimmelsoorten en overdracht van diens mycovirussen resulteert in pathogene schimmels. Bij protoplastfusie tussen wildtype schimmels die opportunistisch pathogeen zijn of behoren tot een genus met pathogene schimmelsoorten, in combinatie met mycovirus-overdracht, is echter niet uit te sluiten dat dat er pathogeniteit ontstaat of wordt verhoogd.

Derhalve is de COGEM van oordeel dat protoplastfusie tussen de apathogene soorten *Neurospora crassa*, *Neurospora intermedia*, *Neurospora tetrasperma*, *Podospora pauciseta* en *Sachharomyces cerevisiae* uitgevoerd kunnen worden op inperkingsniveau I, en dienen alle protoplastfusies met soorten behorend tot het genus *Aspergillus* op inperkingsniveau II te worden uitgevoerd. Bij alle werkzaamheden is van toepassing dat handelingen met sporenvormende schimmels in een veiligheidskabinet van klasse II worden uitgevoerd en de kweek plaatsvindt in sporendichte containers.

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met de protoplasten van verschillende wildtype schimmelsoorten met endogene mycovirussen op de voorgestelde inperkingsniveaus en toepassing van de aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

8. Additionele opmerking

De COGEM signaleert dat vanuit ARBO-overwegingen overwogen kan worden om bij de werkzaamheden handschoenen te dragen, om op deze manier ook het theoretische risico van (verhoogde) mycotoxineproductie als gevolg van mycovirusoverdracht en daarbij blootstelling aan de medewerker te voorkomen.

Referenties

1. Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035090/2020-12-23> (bezoekt op 21-01-2022)
2. Kale SP & Bhatnagar D (2003) Protoplast isolation, regeneration, and fusion in filamentous fungi. Handbook of fungal biotechnology 2: 226-231
3. Strom NB & Bushley KE (2016) Two genomes are better than one: history, genetics, and biotechnological applications of fungal heterokaryons. Fungal. Biol. Biotech. 3: 4
4. Menardo F *et al.* (2016) Hybridization of powdery mildew strains gives rise to pathogens on novel agricultural crop species. Nat. Genet. 48: 201–205
5. Steenwyk JL *et al.* (2020). Pathogenic Allodiploid Hybrids of *Aspergillus* Fungi. Curr. Biol. 30: 2495–2507
6. COGEM (2020) Pathogeniteitsclassificatie van de schimmelsoorten *Neurospora intermedia* en *Neurospora tetrasperma*. COGEM advies CGM/201030-01

7. COGEM (2011) Classificatie apathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-02
8. Perkins DD & Davis RH (2000). Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5107-5109
9. COGEM (2014) Classificatie van bruinrot, witrot en mycorrhiza schimmelsoorten. COGEM advies CGM/140605-02
10. 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
11. COGEM (2017) Pathogeniteitsclassificatie van 13 schimmelsoorten. COGEM advies CGM/170628-02
12. Bastos RW *et al.* (2020) Functional Characterization of Clinical Isolates of the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus nidulans*. *mSphere* 5: e00153-20
13. Schuster E *et al.* (2002) On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 426–435
14. Yu R *et al.* (2021) *Aspergillus niger* as a Secondary Metabolite Factory. *Front. Chem.* 9: 701022
15. Kumar A (2020) *Aspergillus nidulans*: A Potential Resource of the Production of the Native and Heterologous Enzymes for Industrial Applications. *Int. J. Microbiol.* 2020: 8894215
16. COGEM (2011) Classificatie pathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-03
17. Latgé J P & Chamilos, G (2019) *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* 33: e00140-18
18. Hedayati MT *et al.* (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677–1692
19. Rosewich UL & Kistler HC (2000) Role of Horizontal Gene Transfer in the Evolution of Fungi. *Annu. Rev. Phytopatol.* 38: 325–363
20. Ghabrial SA *et al.* (2015) 50-plus years of fungal viruses. *Virology.* 479-480: 356–368
21. Mu F *et al.* (2021) Nine viruses from eight lineages exhibiting new evolutionary modes that co-infect a hypovirulent phytopathogenic fungus. *PLoS Pathog* 17: e1009823
22. Kotta-Loizou I & Coutts R (2017) Mycoviruses in Aspergilli: A Comprehensive Review. *Front. Biol.* 8: 1699
23. Coenen A *et al.* (1997) Factors affecting the spread of double-stranded RNA viruses in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* 69: 1–10
24. Yu X *et al.* (2013) Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 1452–1457
25. Kanhayuwa L *et al.* (2015) A novel mycovirus from *Aspergillus fumigatus* contains four unique dsRNAs as its genome and is infectious as dsRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 9100–9105
26. Ghabrial SA & Suzuki N (2008) Fungal viruses. In *Encyclopedia of virology*. Elsevier Ltd. p.284-291
27. Shahi S *et al.* (2019) Investigation of Host Range of and Host Defense against a Mitochondrially Replicating Mitovirus. *J. Virol.* 93: e01503-18
28. Kotta-Loizou I (2021) Mycoviruses and their role in fungal pathogenesis. *Current Opin. Microbiol.* 63: 10–18
29. van Diepeningen AD (2021) Biocontrol via mycoviruses: a neglected option for bioprotection? In *Microbial bioprotectants for plant disease management*. Burleigh Dodds Science Publishing Limited.

30. Rigling D & Prospero S (2018) *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Mol. Plant Pathol.* 19: 7–20
31. Özkan S & Coutts RH (2015) *Aspergillus fumigatus* mycovirus causes mild hypervirulent effect on pathogenicity when tested on *Galleria mellonella*. *Fungal. Genet. Biol.* 76: 20–26
32. Lau S *et al.* (2018) Novel Partitivirus Enhances Virulence of and Causes Aberrant Gene Expression in *Talaromyces marneffeii*. *mBio* 9: e00947-18
33. Rodríguez-Cousiño N *et al.* (2011) A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded rna virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 1822–1832
34. Becker B & Schmitt MJ (2017) Yeast Killer Toxin K28: Biology and Unique Strategy of Host Cell Intoxication and Killing. *Toxins* 9: 333
35. Honda S *et al.* (2020) Establishment of *Neurospora crassa* as a model organism for fungal virology. *Nat. Commun.* 11: 5627
36. COGEM (2021) Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met apathogene en pathogene schimmelsoorten. COGEM advies CGM/211004-01
37. Kale SP & Bhatnagar D (2003) Protoplast isolation, regeneration, and fusion in filamentous fungi. *Handbook of fungal biotechnology* 2: 226-231