

University of Groningen

## La France disease of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*)

Harmsen, Martin Conrad

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1990

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Harmsen, M. C. (1990). *La France disease of the cultivated mushroom (Agaricus bisporus)*. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## SAMENVATTING

Dit proefschrift bevat de resultaten van toegepast en fundamenteel onderzoek aan de afstervingsziekte van de champignon (*Agaricus bisporus*). Het hoofddoel was de ontwikkeling van een diagnostische test voor de afstervingsziekte in een vroegtijdig stadium van de teeltcyclus. Parallel aan dit toegepaste onderzoek werd, noodzakelijkerwijs, een moleculaire studie gemaakt van de dsRNA moleculen die met het optreden van de afstervingsziekte geassocieerd zijn. Het eerste hoofdstuk is een introductie in de algemene eigenschappen van schimmelvirussen en het virus(complex) dat de afstervingsziekte vermoedelijk veroorzaakt.

### *De ontwikkeling van een diagnostische test*

In Nederland wordt ziekte gediagnostiseerd door het Proefstation voor de Champignoncultuur te Horst. Daartoe werden, tot voor kort, virusdeeltjes uit verdachte champignons geëxtraheerd volgens de methode van Kitano en medewerkers (1961) (geoptimaliseerd voor *A. bisporus* vlg. Dieleman-van Zaayen en Temmink, 1968 en Dieleman-van Zaayen, 1969) waarna de aanwezigheid van virusdeeltjes werd vastgesteld door middel van elektronen microscopie. Champignons met virusdeeltjes, met name met een diameter van 34 nm, werden gediagnostiseerd als ziek. Echter, deze methode is bewerkelijk en van beperkt nut, omdat op het moment dat de diagnose wordt gesteld de afstervingsziekte zich al duidelijk manifesteert en de teeltbedden moeten worden vernietigd waarmee vele teeltweken verloren gaan. Even gevoelig als elektronen microscopie, maar gemakkelijker uitvoerbaar is de diagnose van de afstervingsziekte door het bepalen van de aanwezigheid van specifieke dubbelstrengs RNA moleculen (dsRNA) met behulp van agarose gelelectroforese. In hoofdstuk 2 wordt beschreven dat zieke nederlandse champignons altijd relatief hoge concentraties bevatten van tien dsRNA's met groottes variërend van 0.7 tot 3.6 kb. Symptoomloze champignons afkomstig van bedden met een hoge opbrengst bevatten altijd één van deze dsRNA's (L6, 2.35 kb). Door het dsRNA, geïsoleerd uit verdachte monsters, te vergelijken met het dsRNA merker-patroon dat met de afstervingsziekte is geassocieerd, kan de diagnose tegenwoordig binnen enkele uren worden gesteld (hoofdstuk 2). Deze methode heeft de analyse door middel van elektronen microscopie nu geheel vervangen. Echter met agarose gelelectroforese en fluorescentie-kleuring met ethidium bromide kan hooguit 10 à 30 ng van een dsRNA segment (dit is circa 0.1 à 0.3 µg totaal dsRNA) worden aangetoond. Verder is ook deze

methode is slechts toepasbaar op reeds geoogste champignons en niet op compost; dus op een moment dat de afstervingsziekte al heeft kunnen toeslaan.

De vroegtijdige detectie van de afstervingsziekte wordt van groot belang, omdat tegenwoordig ongeveer één derde van de telers compost gebruikt die reeds in de compostfabriek met mycelium werd doorgeoid. Het gebruik van doorgeoid compost heeft met name een economische reden aangezien de teeltcyclus hierdoor met circa drie weken wordt bekort. In de toekomst zal doorgeoid compost mogelijk de enige bron van mycelium en substraat worden vanwege milieu maatregelen. Ten einde de luchtvervuiling te reduceren die in de vorm van ontwijkende ammoniak optreedt tijdens compostering, worden 'in-door' compostering en nieuwe formuleringen van compost ontwikkeld voor groot-schalige introductie. Omdat dergelijke nieuw-ontwikkelde compostsoorten een lagere selectiviteit hebben, dienen deze doorgeoid met *A. bisporus* mycelium bij de telers te worden afgeleverd. Besmetting met het afstervingsvirus in dit stadium zou de ziekte verspreiden over alle afnemers en zou resulteren in rampzalige oogstverliezen (van Griensven, 1988, 1989). Daarom is de ontwikkeling van een test die gevoelig genoeg is om besmettingen die zich mogelijk in compost ontwikkelen vast te stellen van essentieel belang.

Voor dit doel werd het dsRNA dat is geassocieerd met het optreden van de afstervingsziekte gekloneerd. Er werden drie vrijwel volledige lengte cDNA klonen (pAV260353, pAV250226 en pAV322) geïsoleerd van resp. L3, M1 en M2 dsRNA. Deze werden met succes gebruikt voor het testen van compostmonsters voor de afstervingsziekte ten tijde van de eerste vlucht champignons (hoofdstuk 3). Het vroegste moment van detectie werd bepaald in een experiment waarin compostmycelium moedwillig met de afstervingsziekte werd besmet met virusziek broed. Door middel van hybridisatie met de cDNA klonen van L3, M1 en M2 dsRNA werd bepaald dat extracten van alle compostmonsters, die wekelijks werden genomen vanaf het enten, dsRNA's bevatten die met de afstervingsziekte zijn geassocieerd (hoofdstuk 3). Op deze manier bleek het mogelijk te zijn de afstervingsziekte te diagnostiseren tijdens vroege stadia van de myceliumgroei. Op het Proefstation voor de Champignoncultuur wordt deze methode nu met succes toegepast voor het testen van doorgeoid compost met niet-radioactieve probes.

Desondanks zal in de toekomst de diagnose van compost door middel van hybridisatie met cDNA klonen vermoedelijk worden vervangen door een diagnostische test die is gebaseerd op de polymerase

ketting reactie of PCR (polymerase chain reaction, hoofdstuk 4). Onder meer voor dit doel werd de basevolgorde van de dsRNA's L3, M1 en M2 bepaald (hoofdstuk 5). Er werden twee polymerisatie primers (20 nt) geselecteerd voor het L3 dsRNA; elk complementair met één van beide strengen van het L3 dsRNA en 0.28 kb van elkaar verwijderd. De primers werden aan hitte-gedenatureerde nucleïnezuur extracten, met o.a. L3 dsRNA, gehecht waarna een DNA kopie werd gesynthetiseerd met AMV reverse transcriptase. De DNA kopieën van beide strengen van het L3 dsRNA werden vervolgens vermenigvuldigd door herhaalde cycli van synthese van nieuw DNA op het 0.28 kb gebied startend vanaf de primers met behulp van *Taq* DNA polymerase gevolgd door denaturatie van de producten voorafgaand aan elke synthese. Met PCR konden minder dan 100 moleculen L3 dsRNA worden aangetoond in enkele uren in gezuiverd totaal dsRNA uit zieke champignons. De techniek is echter nog niet bevredigend voor het diagnostiseren van compost, omdat de monsters soms stoffen bevatten die de PCR ernstig verstoren. Desondanks werden sommige compostmonsters met succes gediagnostiseerd. Afhankelijk van een verbeterde extractiemethode zal PCR waarschijnlijk de snelste en beste methode zijn voor de betrouwbare diagnose van compostmonsters voor de afstervingsziekte. De ontwikkeling van primers voor het M2 dsRNA, dat het meest abundante dsRNA is in zieke monsters (tot 20% van de totale dsRNA massa), zou de gevoeligheid van de test nog verder kunnen verhogen.

#### *Moleculaire bestudering van de afstervingsziekte*

De ontwikkeling van een diagnostische test zou niet mogelijk zijn geweest zonder de moleculaire bestudering van de dsRNA's die met de afstervingsziekte zijn geassocieerd. Al deze dsRNA's, uitgezonderd het S3 dsRNA, bleken een unieke basenvolgorde te bevatten aangezien ze niet met elkaar hybridiseerden (hoofdstuk 2). Het kleine (0.4 kb) S3 dsRNA vertoonde grote homologieën met beide uiteinden van het M2 dsRNA (1.35 kb) en het is waarschijnlijk een intern gedeleteerde vorm van M2 (hoofdstuk 6). De aanwezigheid van volledige lengte RNA transcripten van de dsRNA's L3, L6, M1 en M2 in champignons werd aangetoond door middel van Northern hybridisaties met cDNA klonen van deze dsRNA's (hoofdstuk 3). Analyse van de basenvolgorde van de dsRNA's L3, M1 en M2 toonde een enkel open leesraam aan op één van beide strengen van elk van deze dsRNA's (hoofdstuk 5). In elk geval voor het L3 en het M2 dsRNA werd de coderende activiteit bevestigd door het aantonen van *in vitro* translatie-producten met een vergelijkbare grootte als

de voorspelde eiwitten (hoofdstuk 7). Door middel van *in vitro* translatie werd eveneens aangetoond dat de dsRNA's L1, S1 en S2 voor een eiwit coderen. De basenvolgordes en de afgeleide aminozuurvolgordes van de dsRNA's L3, M1 en M2 vertoonden geen homologieën met andere bekende nucleïnezuren of eiwitten. Tot dusver konden nog geen functies worden toegekend aan de gecodeerde eiwitten.

Partiële transcripten van het L6 dsRNA werden aangetroffen zowel in gezonde als in zieke champignons. Dit duidt erop dat L6 behoort tot een aparte klasse virussen die verschilt van de virussen die de afstervingsziekte veroorzaken. Waarschijnlijk bevat een klasse van 25 nm virusdeeltjes het L6 dsRNA (hoofdstuk 8), terwijl in één monster champignons we tot onze verrassing 25 nm deeltjes aantreffen die drie ssRNA's leken te bevatten (hoofdstuk 8). Tot dusver werden deze deeltjes echter slechts in één monster champignons aangetroffen hetgeen een duidelijke relatie met de afstervingsziekte twijfelachtig maakt.

De vraag welke virusdeeltjes mogelijk verantwoordelijk zijn voor de afstervingsziekte blijft vooralsnog onbeantwoord en de isolatie van tot dusver onbeschreven typen deeltjes werkt verwarrend. Toekomstig onderzoek dient zich onder andere te richten op de gedetailleerde bestudering van de virusdeeltjes die voorkomen in zieke (en gezonde) champignons. Gezuiverde viruspreparaten zouden gebruikt moeten worden voor de infectie van protoplasten van een virus-vrije acceptorstam. Aangezien in Nederland symptoomloze champignons steeds één (L6) dsRNA lijken te bevatten, zou een virus-vrije acceptorstam misschien niet bestaan. Vandaar dat, zo lang *in vitro* infecties niet zijn uitgevoerd, het mogelijk is te veronderstellen dat de afstervingsziekte niet wordt veroorzaakt door een virus en dat de hoge concentratie van virusdeeltjes and dsRNA's slechts symptomen van de ziekte zijn. Als we echter aannemen dat een virus met één of meer dsRNA segmenten of het dsRNA zelf de afstervingsziekte veroorzaken, dan zullen toekomstige experimenten gericht moeten worden op de introductie van virusresistentie in *A. bisporus* door middel van transformatie met specifiek veranderde cDNA klonen van sommige van de dsRNA's. Eén van de vele mogelijkheden die succes zou kunnen opleveren is de introductie, in het genoom, van cDNA volgordes, voorzien van een goed expressie signaal, waarvan de transcripten interfereren met de replicatie van het virale dsRNA. Ook zou de ontwikkeling van specifieke 'ribozymen', die alleen inwerken op dsRNA of transcripten hiervan, een interessant alternatief kunnen zijn. Deze experimenten liggen echter nog buiten bereik, omdat er eerst een efficiënt transformatie systeem voor *A. bisporus* dient te worden ontwikkeld.