

De ontwikkeling van gevoelige testen voor Virus X componenten

Anton S.M. Sonnenberg & Brian Lavrijssen

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Paddestoelen
December 2005

PPO nr. 2005-23

© 2005 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Productschap Tuinbouw,
Louis Pasteurlaan 6, 2719 EE Zoetermeer. Tel. 079 - 3470707



Projectnummer: 620203
PT nr. 12059

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Paddestoelen

Adres : Peelheideweg 1, 5966 PJ America
: Postbus 6042, 5960 AA Horst
Tel. : 077 – 464 75 75
Fax : 077 - 464 15 67
E-mail : infopaddestoelen@ppo.wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

1	SAMENVATTING.....	5
2	ACHTERGRONDINFORMATIE SCHIMMELVIRUSSEN	6
2.1	Virus X (MVX).....	7
3	DOEL VAN HET PROJECT	8
4	ANALYSE VAN SYMPTOMATISCHE DSRNAS.....	8
4.1	VXL1	8
4.2	VXL2	9
4.3	VX3	10
4.4	VX4	10
4.5	VX5	10
4.6	VX6	11
4.7	VX7 en VX8	11
5	RT-PCR TESTEN	11
6	REFERENTIES.....	15
7	APPENDIX	15
7.1	Helicase VXL1	15
7.2	RNA dependent RNA Polymerase VXL1	16
7.3	Glycosyl Transferase VXL1	17
7.4	RNA dependent RNA Polymerase VX5.....	17

1 Samenvatting

Bruinverkleurde paddestoelen (geassocieerd met Virus X) bevatten 10 tot 15 verschillende dubbelstrengs RNAs (dsRNAs: erfelijk materiaal van schimmelvirusen). De 5 kleinste dsRNAs komen alleen voor in bruinverkleurde champignons en worden daarom symptomatische banden genoemd. De andere banden vertonen geen goede correlatie met symptomen.

In dit project is van deze 5 symptomatische dsRNAs en een aantal andere dsRNAs die in Virus X monsters voorkomen de volgorde van de bouwstenen bepaald. Met deze informatie kunnen we achterhalen met welk type virussen we te maken hebben en gevoelige testen maken waarmee lage concentraties van dsRNAs kunnen aantonen.

De nu bepaalde sequenties en het aantal dsRNAs tonen aan dat we te maken hebben met minimaal 4 verschillende virussen.

Alles wijst er op dat de 5 kortste dsRNAs die alleen in bruine champignons gevonden worden afkomstig zijn van één virus dat de verkleuring veroorzaakt. Hoe meer virus, des te bruiner de champignons. De andere dsRNAs geven geen duidelijke correlatie met symptomen in Nederlandse en Belgische teelten.

Met een test opgesteld voor de symptomatische dsRNAs is de eerste screening uitgevoerd. Hiervoor zijn ingevroren monsters genomen uit de periode dat we hier bruinverkleuring hadden. Daarnaast zijn monsters verzameld uit 20 teelten in september dit jaar op (allen zonder symptomen of met een geschiedenis van symptomen):

- De 5 symptomatische dsRNAs komen altijd samen voor in bruinverkleurde champignons en in witte champignons van teelten met symptomen. De 5 dsRNAs lijken dus afkomstig van één virus.
- In teelten zonder symptomen (ook teelten met een geschiedenis van Virus X) komen de symptomatische banden niet voor.

De conclusie luidt dan ook dat hier te maken hebben met een infectie!

Één van de andere dsRNAs (VXL1) komt vaker voor in teelten met symptomen dan in teelten zonder symptomen. In Engeland wordt dit dsRNA geassocieerd met trage teelten, een symptoom dat we in Nederland niet zien.

Schimmelvirusen kunnen worden overgedragen via besmet mycelium of via sporen.

Infectiestudies gedaan door HRI-Warwick in Engeland hebben laten zien dat bruinverkleuring met erg weinig materiaal (besmette compost) laat in de teelt kan worden overgedragen.

In Nederland komen op dit moment nog steeds teelten voor met bruinverkleuring. Champignons (en compost) worden vervoerd binnen de Europese landen. Een goede hygiëne is dus van groot belang om een nieuwe uitbraak van de ziekte te voorkomen.

Er is geen resistent ras en Virus X is dan ook in alle rassen wel eens waargenomen. Om tot een definitieve oplossing te komen moet dus voorkomen worden dat besmetting optreedt in bedrijven maar ook moet worden voorkomen dat besmetting in de hele keten wordt overgedragen.

Er is een EU project geschreven getiteld "Hygiene Management System for European mushroom crops suffering from Mushroom Virus X and Dry Bubbles" om dit probleem en het droge mollen probleem Europees aan te pakken. Het project is in november ingediend en in het voorjaar zal bekend zijn of het project is goedgekeurd. Voor dit project is een consortium gevormd van partners die in dit project willen meewerken. Deze partners vertegenwoordigen 9 landen en alle partners in de hele keten zijn vertegenwoordigd. De bedoeling is om gevoelige testen te ontwikkelen voor zowel Virus X als Verticillium en deze te gebruiken in bedrijven in de hele keten. Hieruit moet duidelijk worden waar de "critical control points" zitten waar infectie de keten binnenkomt en waar infectie wordt overgedragen. Gebaseerd op deze kennis zal een "Hygiene Management System" worden ontwikkeld waarin beschreven staat hoe de bedrijfsinrichting en bedrijfsvoering te optimaliseren om te voorkomen dat infecties het bedrijf opkomen en hoe overdracht van infecties kan worden tegengegaan. Hierop gebaseerd zal een trainingsprogramma worden ontworpen en gegeven aan voorlichters en begeleiders van telers (train the trainers). Dit om een goede implementatie in de hele keten te realiseren.

2 Achtergrondinformatie schimmelvirusen

Schimmelvirusen (of mycovirusen) komen in vrijwel alle schimmelsoorten voor. Er zijn aanwijzingen dat ze erg vroeg bij het ontstaan van schimmels in de evolutie al voorkwamen en zich hebben aangepast aan hun gastheer. Hierbij maken ze optimaal gebruik van allerlei functies van hun gastheer om zichzelf in stand te houden. Schimmelvirusen kennen geen extracellulaire fase (kunnen niet buiten de schimmelcellen overleven) en worden van stam naar stam overgedragen door myceliumcontact of verspreid via sporen. Contact tussen verschillende hyfen resulteert in het oplossen van een gedeelte van de celwand en het vermengen van de celinhoud (cytoplasma). Op deze manier komt een kruising tussen twee stammen tot stand en kunnen ook virusen worden overgedragen. Omdat dit alleen gebeurt tussen schimmels van dezelfde soort is tot nu toe nog niet waargenomen dat virusen van de ene naar de andere soort kunnen overspringen.

Als schimmelvirusen een effect op hun gastheer hebben dan is dat een uitzondering. Het voorkomen van deze virusen gaat namelijk zelden gepaard met symptomen. Dat is ook de reden dat deze virusen zo wijd verspreid zijn en zich overal kunnen handhaven. Het sterk verzwakken of doden van hun gastheer komt hun eigen verspreiding uiteraard niet ten goede.

Schimmelvirusen die deeltjes maken kunnen worden aangetoond met behulp van een electronenmicroscop. De deeltjes kunnen ook worden aangetoond met antilichamen tegen de eiwitten die de wand van de deeltjes vormen (ELISA test). Nogal wat schimmelvirusen maken echter geen deeltje. De beste manier om dan de aanwezigheid van virusen aan te tonen is het zichtbaar maken van het erfelijk materiaal van deze virusen. Dit bestaat meestal uit dubbelstrengs RNA (ds-RNAs). De dsRNAs kunnen naar grootte gescheiden worden op een gel en zichtbaar worden gemaakt met ethidiumbromide (dat oranje oplicht onder UV-licht).

Schimmelvirusen kunnen in een aantal families worden onderverdeeld. De belangrijkste zijn de Totiviridae en de Partitiviridae (Ghabrial, 1998). Virusen van de Totiviridae familie hebben erfelijk materiaal dat uit één dubbelstrengs RNA bestaat (ds-RNA). De lengte varieert van 4.6 tot 7.0 kb (4600 tot 7000 baseparen) en het dsRNA is verpakt in een deeltje met een doorsnee van 30 tot 40 nanometer (nm: 10^{-9} meter). Virusen van de Partitiviridae hebben erfelijk materiaal dat uit 2 verschillende dsRNAs bestaat met een lengte variërend van 1.4 tot 2.2 kb verpakt in deeltjes met een diameter van 30-35 nm. De dsRNAs van zowel de Totiviridae als de Partitiviridae coderen voor een capsid-eiwit (waaruit het virusdeeltje bestaat) en een RdRp (RNA-dependent RNA-polymerase), een eiwit dat nodig is om het ds-RNA te vermenigvuldigen. Alle andere functies die ze nodig hebben om zich te handhaven betrekken ze van hun gastheer. Naast de genoemde virusfamilies zijn nog een aantal andere virus families gevonden die slechts sporadisch in schimmels zijn aangetroffen (Buck, 1998). In een bepaald isolaat van *Cryphonectria parasitica* (pathogeen voor kastanjebomen) zijn 11 dsRNA banden aangetroffen variërend van 1 tot 5 kb. Deze komen altijd samen voor en zijn waarschijnlijk allemaal in één deeltje verpakt. In andere stammen van dezelfde *C. parasitica* zijn virusen aangetroffen van een heel ander type. De belangrijkste is een lang ds-RNA (10-13 kb) dat geassocieerd is met membraanblaasjes en dus niet in eiwitdeeltjes is verpakt (Nuss, 2005). Dit virus verzwakt de schimmel zodanig dat deze een kastanjeboom niet meer om zeep kan helpen. Het virus staat dan ook sterk in de belangstelling om als biologische bestrijder gebruikt te worden. Het lange dsRNA codeert voor verschillende eiwitten waaronder het RdRp (nodig voor de vermenigvuldiging van het ds-RNA), een helicase (ontvouwt het dsRNA voordat het vermenigvuldigd wordt) en enkele eiwitsplitsende enzymen. Deze laatste zijn nodig om de verschillende functionele onderdelen los te maken uit het grote eiwit dat in één keer uit het hele RNA gemaakt wordt. Dit type virus is nog niet eerder beschreven en dus ondergebracht in een nieuwe familie: *Hypoviridae*. Er zijn nog enkele andere schimmels waarin ook virusen zijn aangetroffen die de gastheer verzwakken. In *Rhizoctonia solani*, een schimmel die aardappelen infecteert, zijn verschillende dsRNAs aangetroffen (Jian et al., 1997). Door stammen te maken die elk een bepaalde combinatie dsRNAs bevatten is er een aanwijzing verkregen dat één van de dsRNAs de schimmel verzwakt waardoor deze de aardappel niet meer makkelijk kan infecteren. De aanwezigheid van een ander dsRNA versterkt juist het vermogen van de schimmel om aardappelen te infecteren.

Naast bovengenoemde schimmelvirusen zijn de bekendste natuurlijk die in de champignon zijn aangetroffen. La France of afstervingsziekte is zelfs het eerste virus dat ooit in een schimmel is aangetoond (Sinden & Hauser, 1950). Er zijn 9 verschillende dsRNAs gevonden en het is niet zeker dat deze één virus representeren (Harmsen et al., 1991; van der Lende et al., 1996). Één van de dsRNAs codeert voor een RdRp en een ander voor een eiwit

waaruit het virusdeeltje is opgebouwd. Naast het afstervingsvirus is er in de champignon nog een ander virus aangetroffen, het bacillusvormige virus (Revill et al, 1994). Dit virus heeft enkel-strengs RNA (4 kb lang) verpakt in een staafvormig deeltje (19 x 50 nm). Het RNA codeert voor een helicase, een RdRp en een eiwit voor het virusdeeltje. Het is niet duidelijk of dit virus een symptoom veroorzaakt. Een aantal van de genoemde virussen hebben dus een effect op hun gastheer maar dit zijn de uitzonderingen die de regel bevestigen.

Door de volgorde van de bouwstenen in de dsRNAs te bepalen kan vaak worden afgeleid of het inderdaad om een virus gaat en tot welke familie het virus behoort. Daarvoor kun je niet alle bouwstenen gebruiken maar gedeelten in de stukken die coderen voor het RdRp, de helicase en soms ook de eiwitten waaruit de deeltje zijn opgebouwd. De rest van de sequenties varieert zoveel tussen de verschillende virussen dat deze niet te gebruiken zijn voor een identificatie.

Vaak worden dsRNAs waargenomen die onvolledige stukken voorstellen van het erfelijk materiaal van een virus. Deze defecte dsRNAs zijn bij veel type virussen aangetroffen. Daarnaast komen ook satelliet RNAs voor. Deze RNAs zijn voor hun vermenigvuldiging afhankelijk van andere virussen. Meestal coderen ze nergens voor maar er zijn satelliet RNAs bekend die coderen voor een eiwit dat toxisch is voor de gastheer.

Er zijn ook schimmels bekend waarin méér dan één type virus voorkomt. Het is dan ook niet verwonderlijk dat dsRNA extracten uit schimmels na scheiding en kleuring op gel soms een complex patroon vertonen waarbij niet duidelijk is om welke en hoeveel virussen het gaat.

2.1 Virus X (MVX)

Een complex patroon van dsRNAs is ook te zien in extracten van champignons die symptomen hebben van Virus X (MVX). HRI-Warwick heeft in totaal 26 verschillende dsRNA banden gezien in monsters genomen gedurende de periode met veel symptomen in Engeland en Ierland (Grogan et al, 200). De symptomen zijn erg divers: kale plekken op de bedden, vertraagde knopvorming, vroeg open gaan van champignons, afwijkingen in de vorm van champignons en bruinverkleuring van de hoed. In Nederland, België en Duitsland hebben de symptomen zich beperkt tot bruinverkleuring. De dsRNAs die in Engelse en Ierse monsters met symptomen zijn gevonden komen in verschillende combinaties voor. Een drietal banden is al erg lang bekend en nooit geassocieerd met symptomen. Dit stelt dus waarschijnlijk een goedaardig virus voor, een situatie die als regel geldt bij schimmelvirusen. De banden die bij het afstervingsvirus te zien zijn komen niet in Virus X monsters voor. Virus X is dus duidelijk een nieuw type virus.

In monsters uit Nederland, België en Duitsland zijn maximaal 15 verschillende dsRNAs te zien (figuur 1). Dat zijn er minder dan in Engeland en Ierland maar het zijn wel dezelfde als die in Engelse en Ierse monster voorkomen. Het HRI-Warwick heeft een aantal experimenten gedaan om aan te tonen of de aanwezigheid van bepaalde dsRNAs samengaat met symptomen. Hiervoor zijn 2 verschillende stammen gebruikt die een verschillend patroon dsRNAs hebben. De eerste stam heeft de grotere dsRNA banden en is afkomstig uit een teelt met een vertraagde productie. Enten met een toenemende hoeveelheid "besmet" broed leidt tot vertraagde teelten en de betreffende dsRNAs konden weer worden geïsoleerd uit de champignons. De andere stam bevat ook de kleinere dsRNAs en is geïsoleerd uit een teelt met bruinverkleurde champignons. Infecties met deze stam hebben laten zien dat vooral besmetting later in de teelt (b.v tijdens cac-ing) meer symptomen (bruinverkleuring) geeft dan vroege infecties. Ook bleek dat maar erg weinig materiaal nodig was om een symptoom op te roepen.

Zoals eerder gezegd komen in Nederland en aangrenzende landen alleen de bruinverkleuring als symptomen voor. Na analyse van een groot aantal monsters heeft PPO een goede correlatie aangetoond tussen de 5 kleinste dsRNAs en de bruinverkleuring. Hoe bruiner de champignon des te hoger de concentratie van deze dsRNAs (VX4, VX5, VX6, VX7 en VX8). Deze kleinere dsRNAs zijn daarom "symptomatisch" genoemd. Ze komen nooit alleen voor in een monster. Altijd zijn meerdere grotere dsRNAs aanwezig. De samenstelling van deze grotere dsRNAs vertoont enige variatie.

In teelten met symptomen komen zowel witte als verkleurde champignons voor. Een vergelijk tussen extracties uit witte en bruine champignons laten op gel zien dat in de witte champignons van een teelt met symptomen de kleinere symptomatische dsRNAs niet of nauwelijks zijn te zien. Champignons die verkleurd zijn vertonen geen andere afwijkingen. Op doorsneden champignons zijn ook geen verschillen waar te nemen tussen witte en verkleurde champignons. De verkleuring beperkt zich dus tot het vliesje op de hoed. Uit analyse is gebleken dat juist in dit vliesje de concentratie van de symptomatische dsRNAs hoog is. Er is dus een duidelijke kwantitatieve

correlatie tussen de symptomatische dsRNAs en de verkleuring.

3 Doel van het project

De doelstelling van dit project is om een gevoelige test te maken voor de symptomatische banden om daarmee de vraag te kunnen beantwoorden: "Zijn de symptomatische dsRNAs altijd aanwezig of betreft het hier een infectie?" In het eerste geval kan het zijn dat de concentratie van het virus hoog wordt door externe omstandigheden. Dit gebeurt vaker met virussen. Ze zijn vaak onschuldig maar kunnen in aantal toenemen door verandering in omgeving, vooral stress. De symptomen die dan optreden kunnen worden veroorzaakt door het virus of door de stress zelf. In het laatste geval is het toenemen van het aantal virusdeeltjes slechts een bijkomstigheid.

Als het virus niet aanwezig is in teelten zonder symptomen spreken we van een infectie. Beide scenario's vereisen uiteraard een verschillende aanpak. Als het virus altijd aanwezig is moet de "stress-volle" omgeving vermeden worden. Als daarbij het virus de symptomen veroorzaken moeten rassen worden gebruikt die geen virussen bevatten. Als er sprake is van een infectie moet alles gericht zijn om deze infectie te voorkomen. In beide gevallen is het nodig om een gevoeliger test te hebben voor de dsRNAs dan de tot nu toe gebruikte gel-analyse, waarbij dsRNAs worden opgezuiverd uit paddestoelen, op gel gescheiden en gekleurd met ethidiumbromide. Om met zekerheid te kunnen zeggen of in een champignon geen virus zit moeten erg lage concentraties kunnen worden aangetoond. Immers er is in principe slechts één dsRNA molecuul nodig om weer een grote hoeveelheid te maken. Zeker als het om infecties gaat is een gevoelige test ook nodig om na te gaan waar infecties in tunnels of teelten ontstaan en hoe infecties worden overgedragen. Gevoelige testen kunnen alleen gemaakt worden als de volgorde van de bouwstenen (sequentie) van de dsRNAs bekend zijn. Met deze kennis kan met behulp van RT-PCR stukjes van het erfelijk materiaal snel vermenigvuldigd worden tot een hoeveelheid die op gel zichtbaar is. Op deze manier kunnen zéér lage concentraties dsRNA zichtbaar worden gemaakt. In dit project is van een aantal dsRNAs een groot gedeelte van de sequenties bepaald. Daarbij zitten de kleinere symptomatische banden en drie grotere dsRNAs.

4 Analyse van symptomatische dsRNAs

Voor het ophelderen van de sequenties is op grotere schaal dan gebruikelijk dsNA geïsoleerd uit bruinverkleurde paddestoelen. De dsRNAs zijn gescheiden op gel en afzonderlijk uit de gel gehaald. Op elk dsRNA is vervolgens een techniek losgelaten waarbij kleine stukken worden omgezet in DNA. Van deze stukken wordt de volgorde van de baseparen bepaald. Als er voldoende stukken zijn verkregen is er voldoende overlap tussen de fragmenten om een aaneengesloten sequentie te krijgen. Dit is bij een aantal dsRNAs gedaan en gelukt. De uiteinden hebben we nog niet te pakken. Dat is wat lastiger. Er is in ieder geval voldoende sequentie verkregen om een gevoelige test te maken voor deze dsRNAs. Als een band uit de gel wordt gesneden bestaat de mogelijkheid dat deze verontreinigd is met dsRNAs van andere banden (meestal grotere banden). Dit kan leiden tot het toewijzen van sequenties aan verkeerde dsRNAs. Dat is in ieder geval gebeurd bij één van de dsRNAs (zie hierna).

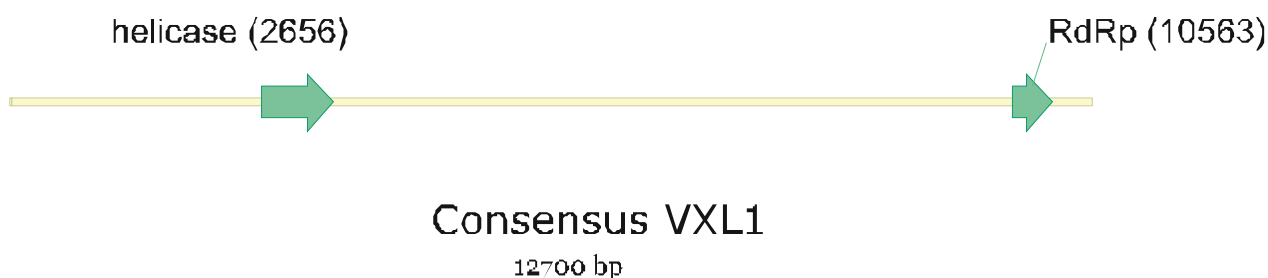
4.1 VXL1

VXL1 heeft een geschatte lengte van 15.000 bouwstenen (basen). Dit ds-RNA wordt door HRI-Warwick geassocieerd met een vertraagde teelt. VXL1 is pas 2 jaar na het optreden van Virus X symptomen in Nederland waargenomen. Van VXL1 hebben we van ca 12.700 basen de volgorde kunnen bepalen. Evenals bij de andere dsRNAs hebben we de uiteinden nog niet kunnen bepalen. Dat blijkt in de praktijk lastig te zijn. De hoeveelheid sequentie die we nu hebben is echter voldoende voor een gevoelige test.

We hebben de sequentie vergeleken met die van andere virussen en hierbij de twee gebieden geïdentificeerd van

genen die in virussen sterk geconserveerd zijn (gedurende de evolutie niet veel veranderd): het RdRp en de helicase (fig 2; appendix). Uit de vergelijking is gebleken dat dit virus het meest lijkt op virussen uit het geslacht Endornavirussen. Dit zijn plantenvirussen die eerder zijn waargenomen in wikke, bonen en rijst (Gibbs et al., 2004). Zeer recentelijk is dit virus ook aangetroffen in *Fytoftora*, een bekende infectie in aardappelen en meer recentelijk in bomen. *Fytoftora* is een schimmel-achtig organisme dat eigenlijk tot de bruinalgen behoort maar om zijn groei en uiterlijk vaak tot de schimmels wordt gerekend. Endornavirussen maken geen deeltjes maar komen voor in kleine membraanblaasjes die waarschijnlijk door de gastheer worden aangeleverd. In champignons met Virus X zijn tot nu toe ook geen deeltjes aangetroffen.

Het HRI heeft ook al wat sequenties verkregen van dit dsRNA en komt op dezelfde sequenties uit. Dat bevestigt dus dat we inderdaad beide aan dezelfde dsRNA hebben gewerkt. Eerdere experimenten hebben aangetoond dat een dsRNA, uitgesneden uit de gel, verontreinigd kan zijn met ander dsRNA. Dat is dus bij VXL1 niet het geval. Voor VXL1 is RT-PCR een test ontworpen.



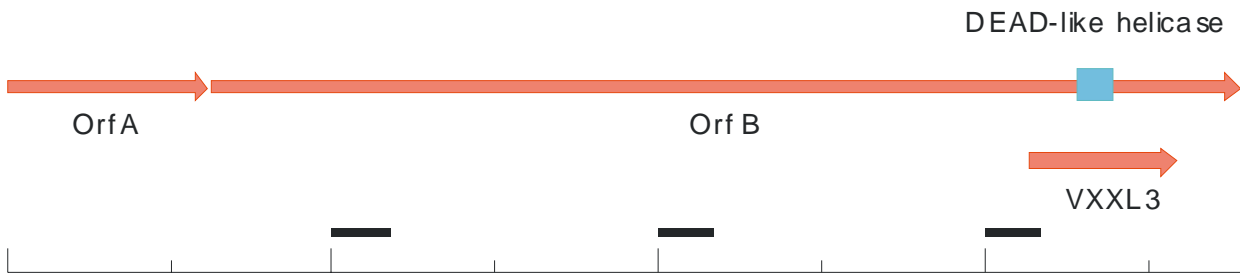
Figuur 2. Schematische voorstelling van dsRNA VXL1. Dit RNA is ca 15.000 basen lang en van ca 12700 basen is de volgorde bepaald. Uit een vergelijking van de sequenties met eerder gepubliceerde sequenties kunnen we geconserveerde stukken van andere virussen herkennen: de helicase en het RdRp.

4.2 VXL2

VXL2 heeft een geschatte lengte van 10.000 basen. Er zijn een groot aantal stukken DNA gegenereerd met het uitgesneden dsRNA. De lengte van deze stukken samen bedraagt meer dan 15.000 basen. Dat betekent dat de uitgesneden band waarschijnlijk verontreinigd is met dsRNA van andere banden. De lengte van de stukken DNA variëren van een paar honderd basen tot 1500 basen. We hebben nog te weinig sequenties bepaald om de stukken in de goede volgorde te kunnen leggen. Als de afzonderlijke stukken worden vergeleken met andere virussequenties dan blijken sommige stukken te lijken op virussen eerder waargenomen in schimmels of planten. Omdat we niet precies weten van welk dsRNA de afzonderlijke DNAs afkomstig zijn hebben we hiervoor geen test ontwikkeld.

4.3 VXXL3

VXXL3 heeft een geschatte lengte van 17000 basen. Van 2024 basen is de sequentie bepaald (figuur 3). We zijn aan de sequentie gekomen door de VXL4 band uit te snijden. De uitgesneden band blijkt echter materiaal te bevatten van één van de grotere banden. Na een test (hybridisatie) bleek de sequentie afkomstig te zijn van VXXL3. De bepaalde sequentie lijkt sterk op het hypovirus dat gevonden is in *Cryphonectria parasitica*, de schimmel die de kastanjekanker veroorzaakt. Dit virus verzwakt de schimmel *Cryphonectria* zodanig dat deze de kastanjeboom niet meer kan doden. Het *Cryphonectria* hypovirus maakt ook geen deeltjes en is verpakt in membraanblaasjes.



***Cryphonectria hypovirus 1* (3787 aa)**

Figuur 3. VXXL3 is ca. 17.000 basen lang en van zijn ca. 2024 basen is de volgorde bepaald (VXXL3 pijl rechts in de figuur). Deze sequentie lijkt op die van een hypovirus gevonden in *Cryphonectria parasitica* die een kanker in kastanjabomen veroorzaakt. Orf A en Orf B zijn sequenties die tot twee verschillende eiwitten leiden.

4.4 VX3

VX3 heeft een geschatte lengte van 2600 basen en van 2347 basen is de sequentie bepaald. Het is een dsRNA dat al heel lang in vrijwel alle rassen te zien is. Het wordt niet geassocieerd met symptomen en lijkt dus een onschuldig virus te zijn. Uit de sequentie blijkt dat dit dsRNA maar zéér kleine stukjes eiwit kan maken. Dat betekent dat dit dsRNA andere dsRNAs nodig heeft om zich te vermenigvuldigen. Welk dsRNA dat is, is niet bekend. VX3 kan dus als een satelliet dsRNA worden beschouwd.

4.5 VX4

VX4 heeft een geschatte lengte van 2300 basen en van 1807 basen is de sequentie bepaald. VX4 is één van de vier dsRNAs die een kwantitatieve correlatie vertonen met bruinverkleuring. Hoe bruiner de champignon des hoger de concentratie van dit dsRNA. VX4 is altijd samen met de andere symptomatische dsRNAs waargenomen (VX5, VX6, VX7 en VX8).

De sequentie van VX4 lijkt op geen enkel bekende sequentie en lijkt slechts zéér korte stukjes eiwit te kunnen maken. Voor VX4 geldt dus ook dat het afhankelijk is van andere dsRNAs voor zijn vermenigvuldiging en kan dus als een satelliet dsRNA worden beschouwd.

4.6 VX5

De geschatte lengte van VX5 is 2100 basen en van 1786 basen is de sequentie bepaald. De sequentie lijkt een beetje op het Equine rhinitis A virus dat in paarden voorkomt. De VX5 sequentie is vrijwel volledig coderend en kan dus een eiwit maken dat functioneel is. Het hypothetische eiwit heeft een aantal aminozuren op geconserveerde gebieden zitten die identiek zijn aan een RdRp. Dat betekent dat VX5 waarschijnlijk codeert voor een eiwit dat in staat is om dsRNA te vermenigvuldigen en dus zichzelf en andere dsRNAs in stand kan houden.

4.7 VX6

De geschatte lengte van VX6 is 1000 basen waarvan 739 basen zijn gesequenct. Het stuk waarvoor de sequentie is bepaald codeert voor een eiwit en kan dus gebruikt worden om een eiwitproduct te maken. Aangezien de VX6 sequentie op geen enkele bekende sequentie lijkt is niet duidelijk wat het product zou kunnen zijn.

4.8 VX7 en VX8

De geschatte lengte van VX7 is 850 basen en van 695 basen is de sequentie bepaald. Het lijkt niet waarschijnlijk dat dit dsRNA voor een eiwit codeert. Dit geldt ook voor VX8. De geschatte lengte hiervan is 700 base en van 524 basen is de sequentie bepaald.

Omdat VX4, 5, 6, 7 en 8 altijd samen voorkomen lijken ze zéér waarschijnlijk afkomstig te zijn van één virus of viraal complex. VX5 codeert waarschijnlijk voor het eiwit dat in staat is om deze 5 dsRNAs te vermenigvuldigen en zo het virus in stand te houden.

5 RT-PCR testen

Voor de symptomatische banden zijn primers opgesteld om lage concentraties te kunnen aantonen. De test verloopt in twee stappen (figuur 4). Eerst wordt een gedeelte van het RNA molecuul omgezet in DNA (RT-PCR) en dit gedeelte wordt vermenigvuldigd (eerste PCR). Daarna wordt een monster van dit materiaal genomen waarna met nieuwe primers een korter stuk van het gegenereerde DNA wordt vermenigvuldigd. Deze methode is gekozen omdat ze gevoelig is en minder vals positieve monsters geeft.

De primer sets voor VX4 tot en met VX8 (de symptomatische dsRNAs) geven allen het verwachte product wanneer getest op een stuk DNA dat gemaakt is van het betreffende dsRNA.

Vervolgens zijn de primers getest op champignonmonsters van een teelt met symptomen (opgeslagen in de vriezer) en 20 bedrijven zonder symptomen (verzameld in de maanden september-oktober van dit jaar). De bedrijven zijn zo gekozen dat zowel plukkers als snijders zijn vertegenwoordigd. De composten waren afkomstig van 4 verschillende leveranciers. Ook waren twee bedrijven vertegenwoordigd die eerder symptomen hebben gehad, positief waren bevonden in de test en nu geen problemen meer kenden.

De champignonmonsters uit de teelt met symptomen geven de verwachte banden voor VX4 t/m VX8. Dit geldt voor zowel de bruine als de witte campignons. De testen werken dus. We hebben wel de indruk dat de gevoeligheid van de testen nog geoptimaliseerd moet worden.

Alle andere monsters, verzameld uit teelten zonder problemen, gaven geen signaal en zijn dus negatief (bevatten geen symptomatische dsRNAs).

Uit deze eerste screening kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Alle champignons uit een teelt met symptomen bevatten de symptomatische dsRNAs. Dit geldt voor zowel de bruine als de witte champignons.
- Alle symptomatische dsRNAs (VX4 t/m VX8) komen samen voor.
- Champignons uit teelten zonder symptomen bevatten geen symptomatische dsRNAs.

De belangrijkste constatering is dat we te maken hebben met een virus dat niet altijd aanwezig is. We spreken dus van een infectie.

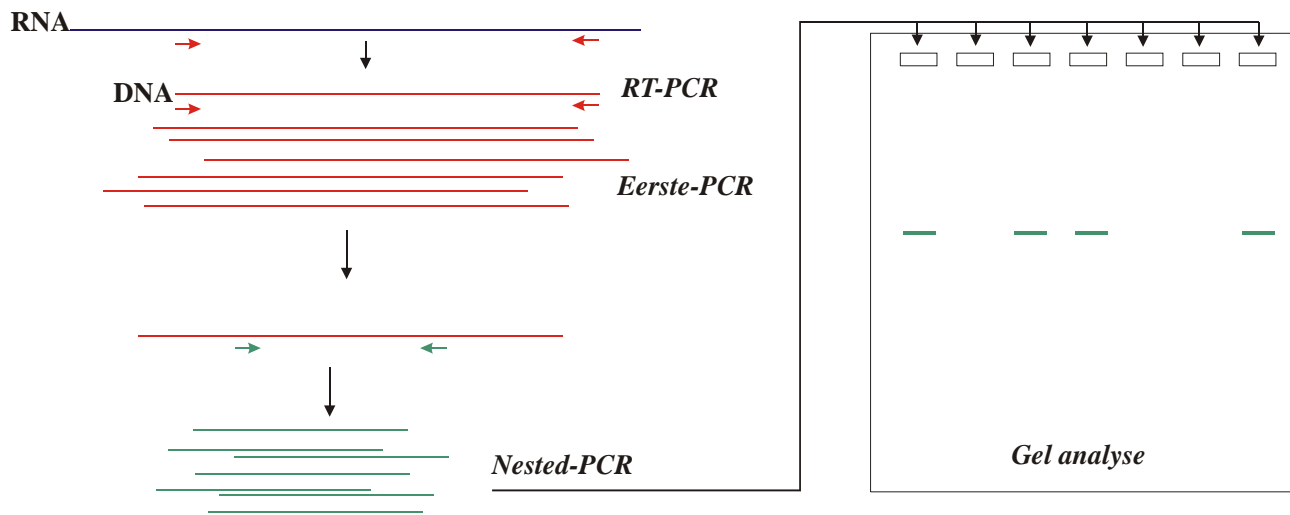
Het dsRNA VXL1 wordt in Engeland in verband gebracht met trage teelten. In Nederland zien we dit dsRNA regelmatig in teelten met bruinverkleuring, maar niet altijd. De correlatie met symptomen is dus niet zo duidelijk als die van de symptomatische banden (VX4 t/m VX8). In teelten zonder symptomen komt VXL1 een enkele keer voor.

VXXL3 komt in vrijwel alle monsters voor (teelten met en zonder symptomen) en behoort dus tot de virussen die geen symptomen veroorzaken.

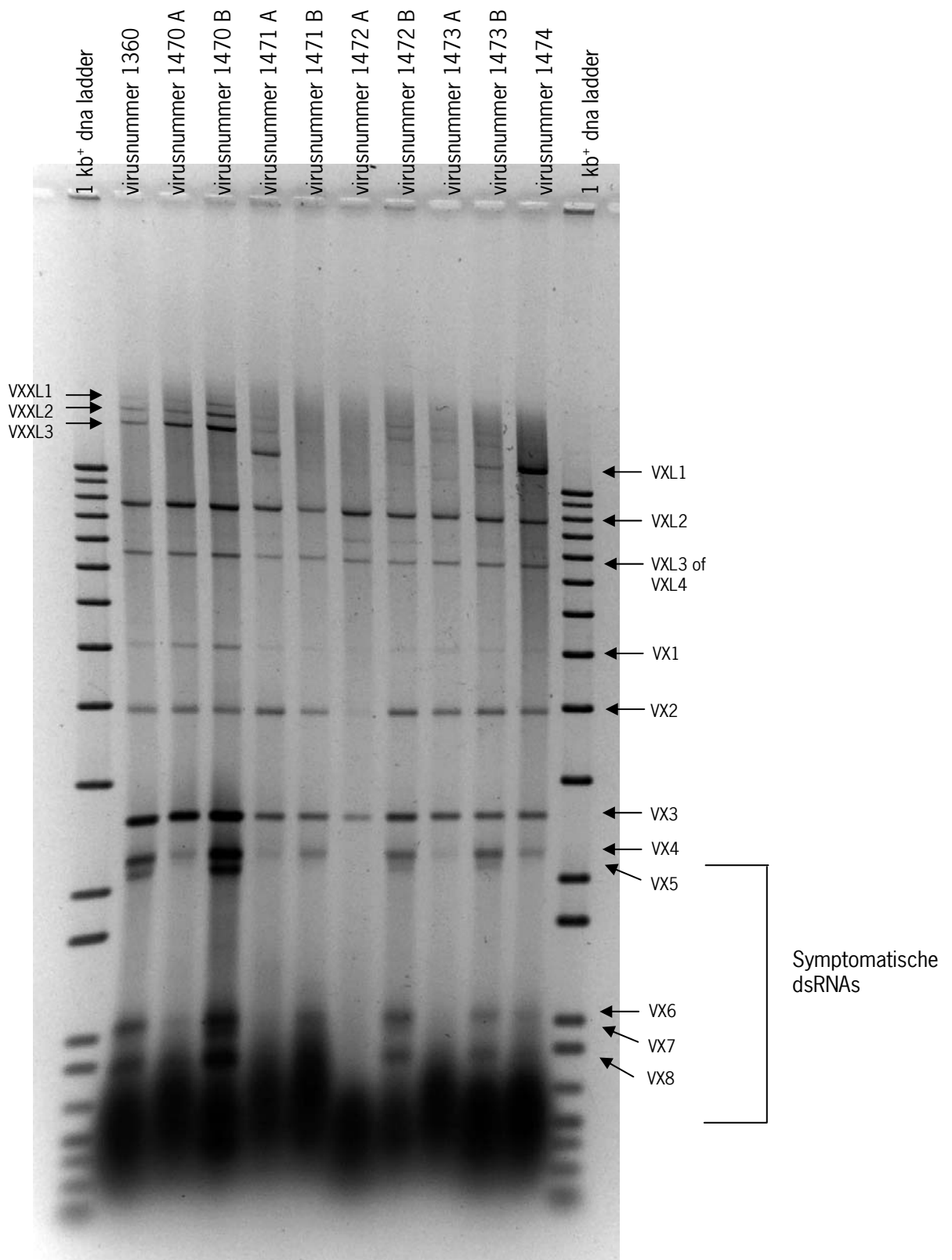
Monster	VX4	VX5	VX6	VX7	VX8	VXL1	VXXL3
bruinverkleurde champignon	++	++	++	++	++	+/-	++
witte champignon: teelt met symptomen	+	+	+	+	+	+/-	++
witte champignon: teelt zonder symptomen	-	-	-	-	-	- / +	++

Tabel 1. RT-PCR testen op monsters uit teelten met en zonder symptomen. In de teelten met symptomen zijn zowel bruinverkleurde als witte champignons meegenomen.

Er is een goede correlatie tussen bruinverkleuring en de aanwezigheid van VX4 t/m VX8). Er is enigszins een correlatie tussen symptomen en VXL1. VXXL3 vertoont geen correlatie met symptomen.



Figuur 4. Een RT-PCR reactie schematisch weergegeven. Eerts wordt het dsRNA bij hoge temperatuur enkelstrengs gemaakt. Daarna worden kleine stukjes sequenties (primers), toegevoegd die een sequentie hebben complementeër aan de sequentie van het RNA. Op deze complementaire plekken zullen de primers binden en dienen als opstapplaats voor het enzym dat het RNA vertaald in een streng DNA. Vervolgens wordt dit DNA vermenigvuldigd met een eerste PCR. Nieuwe primers worden gebruikt om dit verder te vermenigvuldigen.



Figuur 1. dsRNA patronen van paddestoelen met bruinverkleuring. De onderste 5 dsRNAs zijn altijd aanwezig in bruin verkleurde paddestoelen. De andere banden treden in wisselende samenstelling op en vertonen geen duidelijke correlatie met symptomen.

6 Referenties

- Buck, K.W. 1998. Molecular variability of viruses of fungi.
- Ghabrial, S.A. 1989. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* 16, 119-131.
- Gibbs et al. 2004. Genus *Endornavirus*. In: *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp 603-605. Ed (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & A.L. Ball. London: Elsevier/Academic Press.
- Grogan et al. 2003. Double-stranded RNA elements associated with MVX disease of *Agaricus bisporus*. *Myc. Res* 107 (2), 147-154.
- Hacker et al. 2005. A double-stranded RNA from a *Phytophthora* species is related to the plant endornaviruses and contains a putative UDP glycosyltransferase gene. *J. Ge. Virol.* 86, 1561-1570.
- Harmsen et al. 1991. Sequences of three dsRNAs associated with La France disease of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). *Curr. Genet.* 20, 137-144.
- Jian, JH. Et al. 1997. Association of distinct double-stranded RNAs with enhanced or diminished virulence in *Rhizoctonia solani* potato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 10 (8), 1002-1009.
- Lende van der, T.R. 1996. Functional analysis of ds RNAs (L1, L3, L5 and M2) associated with isometric 34-nm virions of *Agaricus bisporus* (white button mushroom). *Virology* 217, 88-96.
- Nuss, D.L. 2005. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 632-642.
- Reville et al., 1994. The nucleotide sequence and genome organisation of mushroom bacilliform virus: a single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Virology* 202, 904-911.
- Sinden J.W. & Hauser, E. 1950. Report of two new mushroom diseases. *Mushroom Science* 1, 96.

7 Appendix

In deze appendix bevat achtergrondinformatie over de sequenties van VXL1, een planten virus dat nog niet eerder in schimmels is waargenomen. Onlangs is dit virus aangetroffen in *Phytophthora*, een schimmelachtig bruine alg. De volgorde van bouwstenen in het erfelijk materiaal van virussen verschilt behoorlijk tussen de verschillende type virussen. Alleen de gebieden die betrokken zijn essentiële functie van het virus hebben enige overeenkomst (zijn geconserveerd in de evolutie). Hieronder staan de drie geconserveerde gebieden die we in VXL1 hebben aangetroffen en waarmee we hebben kunnen constateren dat het een virus is en om welk type virus het gaat. De betreffende sequenties van VXL1, het *Phytophthora* virus (PEV1) en een soortgelijk virus uit een plant (rijst: OsEV) zijn onder elkaar gezet.

7.1 Helicase VXL1

Een vergelijking tussen de sequenties van het geconserveerde helicase gen van drie Endornavirussen: van de champignon (VXL1), de boon (Pev1) en rijst (OsEV).

De zwarte gebieden geven aminozuren weer die identiek zijn voor de drie virussen en de grijze gebieden geven aminozuren aan die waarschijnlijk ooit dezelfde zijn geweest maar ontstaan zijn door kleine verandering in het dsRNA.

```

      10      20      30      40      50      60
VXL1hel  TECVLAVPGAGKTYEILNSYNAGDCIIAMTSHNKS SIYRRRAKEMKKIVNVKSLEKFLSEG
Pev1     SECTLAVPGWGKSTKIVKEFDTDTTVTCVITSEAVKNLVAMGLPRNKVT--SVERAVESK
OsEV     SNLTLGPAGYGKSTMISKAITHGDLCVAMTRSSVMSIEEKKTKDKHITVC--SLEKASSSM
Consensus  :: .* . * ** : * : . . : * : : . : . * : * : . .

      70      80      90      100     110     120
VXL1hel  KKY-KTVYLDECTLVKPFDG-VLVLTLCDKMYAYGDNNQIPFVDMSSASAGTREVKNITDV
Pev1     IHT-KKLAIDECTQVDWLMVHMC GDEVEIITLAGDSFOIGAVDFASASTGERTITSCN--
OsEV     MKCPNTLFDVDEATMIDWLKLLALCEP-TTTLRMYGSESQVGAVDMSPTPLRHITRIQDL
Consensus  : : : : * : * : : : : : : * : * : * : * : * : * : .

      130     140     150     160     170     180
VXL1hel  VKPEKTEFKLLSRRFGPSLSVSEISPLIPGIMCHPSVEHDDTDIRFANYEKNSIQVTAETEN
Pev1     MFSLHQNTYNNSHRFGQPLCSQLTVLNP--RLTTDALHOTSYSVHNLSSLDLNVLGSVIA
OsEV     LLENQISR FYSTYRIGESLATFIRPIEP--KLVSLADHKITTYNVTVLEDAEFKLPVIIVH
Consensus  : : . : * : * : * : : : * . . * : * . . . : : :

      190     200     210     220     230     240
VXL1hel  NVRFNFKPNVVLVFFOAKKAFWLKRLHPIV-----VETVHSYQGNEADN-VVVIQEPN
Pev1     QER---PGVILTFHQITKSQIQRAFGRITIKTSLTTGDKTVHSYQ GKES SR-VMVIQDFL
OsEV     RCK---PDVITTPYNYNRQRLENMTDVTIP-----VVITHSYQGQEVNKS LVILRADR
Consensus  . : . * : * : : . : : : : : * * : * : * : * : * : : : :

      250     260
VXL1hel  EXTFGICADKKYVISAASRAVKHL
Pev1     S-PAGVHTDRRYLMSAASRASN--
OsEV     TGKWDLNGNALYLNSALTRAKH--
Consensus  . : : * : * : * : :

```

7.2 RNA dependent RNA Polymerase VXL1

Een vergelijking tussen de sequenties van het geconserveerde RdRp gen van drie Endornavirussen: van de champignon (VXL1), de boon (Pev1) en rijst (OsEV).

De zwarte gebieden geven aminozuren weer die identiek zijn voor de drie virussen en de grijze gebieden geven aminozuren aan die waarschijnlijk ooit dezelfde zijn geweest maar ontstaan zijn door kleine verandering in het dsRNA.

```

      10      20      30      40      50      60
VXL1RdRp PLWVFERDFITKQDRQDDEDLINFEYVYKQLGVHDDVISFWRKTHENWFYKGTDLSGSLS
Pev1     --VLIEDDLTRQDSQTDSDTINVEFGVYDILGLDRRVAASWRRVHELWRFKGDVREGVWQ
OsEV     VFGFFENDLTKQDRQDTPILEVEMLMYLMLGVHPNIISSWRSSHDDWRFKSTNYWGKST
Consensus  . : * * : * : * * * . : : * : * : * : * : * : * : * : *

      70      80      90      100     110     120
VXL1RdRp WMRLTGQCTTALGNAITNMVNSRRTYQEYEQNIKIMLLLGDNSMISDCEINVHNSRKIS
Pev1     EMRLTGQATTALGNVAVNLAVHWRLLVSQLGPAMKMYLLLGDDSLFFSRTTIDATSLRRNT
OsEV     AMRLTGQATTALGNCTITMNVHSHKFKVLIKKNKYWLKFALFLGDDMCMGFSHKPNTOHLRQDI
Consensus  * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

```

                130       140
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
VXL1RdRp  RDYINMESKDFCKKHTGIFLRMI
Pev1      ADYINMKSKAFVYKDHGTFCSM
OsEV      ACKFNMSKDSWMTNGATFCSMV
Consensus  :*:** .. . * * :

```

7.3 Glycosyl Transferase VXL1

Een vergelijking tussen de sequenties van het geconserveerde glycosyl transferase gen van VXL1 en het *Phytophthora endorna* virus.

```

.|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
LHHC GSGT THTA MLAG LPQI LLPV DFDQ PQWAG ALNKKG
IHHG GAGT TNWF MRLS MRQI ILPL FNDQ WIWANC VSKLG
:* * :*: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

7.4 RNA dependent RNA Polymerase VX5

Een vergelijking tussen de geconserveerde RdRp gebieden van het paardenvirus, mond en kauwzeer virus en VX5. De grijs gearceerde gebieden geven de aminozuren aan die alle RdRp van virussen gemeenschappelijk hebben. Dit suggereert dat het VX5 dsRNA codeert voor een eiwit dat in staat is om ds-RNAs te vermenigvuldigen en dus het symptomatische virus in stand te houden.

```

                250       260       270       280       290       300
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
equine  GSAIG----CDPDVDWTRFGLERFRYVYACDYSRFDANHAADAMRVVLNYYFFSEDHGF
Food    GSAVG----CNPDVDWQRFQTHFAQYKNVWDVDYSAFDANHCSDAMNIMFEEVFSTDFGF
VX5     GPVDFRYGYKRDDVYLCEHLTRDSKCRVTLEGDYSRNDREQRSRVAYIIDAALD--VLGF
Clustal Consensus *..          ** .. . : : . *** * : : : . : : . : **

                310       320       330       340       350       360
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
equine  DPGVPAFIESLIDSVHAYE---EKRYNIYGLPSGCSCSILNTILNNVYILAAMMKAYE
Food    HPNAEWILKTLVNTEHAYE---NKRITVEGGMPSPGCSATSIINTILNNIYVLYALRRHYE
VX5     DSEVRKWMLESSEYEVFAPLCGLKAKLKHQLPTGTTCTTFRNSVFNVSVMFATSMIQQGV
Clustal Consensus .. . : : .. : : : : : * : * : * : * : * : * : :

                370       380       390       400       410       420
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
equine  NFEPDDIQVICYGDDCLIASDFEIDFQQLVPVFSSFGQVITTAD-----KTD--FF
Food    GVELDITYTMISYGDDIVVASDYDLDFEALKPHFKSLGQTITPAD-----KSDKGFV
VX5     TN----ARALVGLGDDLLANSQEDIRLQEWINCVDRFKMLVKAFKPGLSGKATFLSRRLIM
Clustal Consensus . . : *** : * : : : . . : . . . . : :

```



```

                                430      440      450      460      470      480
equine      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Food        KLTTLSEVTFLKRAFVPDG--AFYKP-----VMDVKTLEAILSFVRPGTQAEKLLS---
VX5         LGHSITDVTFLKRHFHMDHGTGFYKP-----VMASKTLEAILSFARRGTIQEKLIS---
Clustal Consensus : *...: .:* *:* *:* *:* ...

```