



OKEE

Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering

Voortgangsrapportage Januari 2004 – Juni 2004

Ref.nr. 2003T1269/ augustus 2004

Vertrouwelijk
Consortium
Agrotechnology and Food Innovations BV
Plant Research International BV
KeyGene NV
Productschap voor de Tuinbouw

Report 242



OKEE

Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering

Voortgangsrapportage Januari 2004 – Juni 2004

Ref.nr. 2003T1269/ augustus 2004

Vertrouwelijk
Consortium
Agrotechnology and Food Innovations BV
Plant Research International BV
KeyGene NV
Productschap voor de Tuinbouw

Report 242

2250746

Colofon



Titel	<i>OKEE Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofieling</i>
Auteur(s)	<i>Consortium</i>
A&F nummer	<i>242</i>
ISBN-nummer	<i>-</i>
Publicatiedatum	<i>augustus 2004</i>
Vertrouwelijk	<i>Vertrouwelijk</i>
Project code.	<i>1330002000</i>

Agrotechnology & Food Innovations B.V.
P.O. Box 17
NL-6700 AA Wageningen
Tel: +31 (0)317 475 024
E-mail: info.agrotechnologyandfood@wur.nl
Internet: www.agrotechnologyandfood.wur.nl

© Agrotechnology & Food Innovations B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, hetzij mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. De uitgever aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten of onvolkomenheden.

All right reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system of any nature, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher. The publisher does not accept any liability for the inaccuracies in this report.

Dit rapport is goedgekeurd door: Voeg naam in van goedkeurende functionaris, normaliter het groepshoofd



Het kwaliteitsmanagementsysteem van Agrotechnology & Food Innovations B.V. is gecertificeerd door SGS International Certification Services EESV op basis van ISO 9001:2000.

Abstract

In this report, the progress of the EET project named OKEE is explained. The three collaborating partners that perform research have made progress and are basically on schedule as planned. The tomato-quality project continued with the analysis of new samples from growers. Similar to last year, differences in tomato softening among the tomato batches tested could be identified. The total number of tomato batches now has come to a total of 32, which forms a good basis for selection of variable batches for microarray analysis. These tomato microarray analyses have been optimised during this period to have as reproducible a protocol as possible. An optimised protocol has been chosen to perform further hybridisation experiments, and the first set of experiments, including data analysis, has been completed.

The other model studied is Botrytis prediction in roses. For this study, more batches of roses, directly obtained from growers, were tested for contamination of and sensitivity to Botrytis. The total number of samples tested has now reached 25 and from this a selection will be analysed by microarray to identify potential candidate bio-indicators. These microarray analysis of rose have also been optimised to first result in a reliable and reproducible protocol. With the intention to identify genes related to senescence, information that is needed to exclude genes involved in this process rather than for Botrytis prediction, a petal senescence range and Botrytis infection range were studied. These analyses showed a selection of genes that are related to senescence and will be handled with suspicion when choosing indicator genes (because not all flowers are cut at the same developmental stage).

Progress in the multiplex detection method focused on the further development of the Quality Quantifier assay. First-strand cDNA derived via mRNA and poly-A were tested as targets for the detection of expression of constitutive expressed tomato genes. Major progress was made towards a robust and easy protocol utilising first-strand cDNA targets, together with a simple reliable RNA isolation method. The QQ expression assay was validated with the RIN tomato gene and a first proof of quantitative detection was obtained. The QQ assay is now ready for testing of gene sequences related to tomato firmness and Botrytis in rose.

Content	
Abstract	3
1 Project gegevens	5
2 Voortgang in relatie tot de planning	6
2.1 Voortgang per taak over het afgelopen halfjaar	8
2.1.1 Ketenanalyse	9
2.1.2 Ontwikkelen kwaliteitsverloopmodellen	9
2.1.3 Analyse en definitie expressieprofielen	10
2.1.4 Ontwikkeling multiplex toetsmethode	11
2.1.5 Integratie en validatie	11
2.2 Kosten overzicht	11
2.3 Mijlpalen komend halfjaar	12
3 Resultaten	13
3.1 Overzicht onderzoeksresultaten	13
3.2 Knelpunten en oplossingen	22
3.3 Octrooiaanvragen	22
3.4 Interne rapportages	22
3.5 Openbare publicaties	23
4 Conclusies	24

1 Project gegevens

Projectcategorie: **EET project**

Titel: **Optimalisatie van Ketens Efficiëntie via Expressieprofielering (OKEE)**

Reductie van energieverbruik en uitval in de distributieketens van verse producten door innovatieve toepassing van genomics technologie.

Projectnummer: EETK01122

Verslagperiode: 1 januari 2004 tot 1 juli 2004

Penvoerder: Dr. J.J. Mes, Agrotechnology and Food Innovations BV

2 Voortgang in relatie tot de planning

Het doel in de drie jaar van het project is het leveren van een 'proof of principle' voor het concept dat complexe genexpressie profielen te koppelen zijn aan mathematische kwaliteitsverloopmodellen. Deze methodiek resulteert in een beslissings-ondersteunend instrument. Dit instrument zal de keten helpen in optimalisatie van de efficiëntie en het verbeteren van de duurzaamheid van verse producten in de distributieketens.

De grove planning van het project was dusdanig opgebouwd dat je zou kunnen spreken van 3 fases, die samenvallen met de projectperiode van 3 jaar. Het eerste jaar zou gebruikt worden voor het maken van de microarrays van zowel tomaat en roos, het bemonsteren van partijen uit de praktijk en het verkennen van de verschillende mogelijkheden voor het snel detecteren van genexpressie via een multiplex ligatie en amplificatie systeem. Het tweede jaar zou dan gebruikt worden voor microarray analyse, microarray data verwerking in combinatie met kwaliteitseigenschappen en het testen van indicator genen met andere methoden voor het detecteren van genexpressie. Het multiplex detectiesysteem zou in deze periode verder ontwikkeld worden, daar mogelijk met de eerste indicator genen uit de microarray analyse. In het derde jaar zal dan verificatie en betrouwbaarheid van de indicator genen getest worden, zo mogelijk met de ontwikkelde multiplex methode, en zal de link onderzocht worden met de kwaliteitsmodellen en bewaarvoorspellingen.

Om dit te realiseren is het eerste jaar een analyse gemaakt van de meest voorkomende distributieketens voor de voorbeeldproducten roos en tomaat. Daaruit zijn de keuzes voor tomaat in relatie tot stevigheid en bij roos de botrytis aantasting naar voren gekomen als belangrijke knelpunten bij het opzetten van productgebaseerde ketens. Vervolgens zijn er proefopzetten ontwikkeld waarin relaties gelegd kunnen worden met de intrinsieke kwaliteit van het product. De resultaten van het onderzoek naar het kwaliteitsverloop van regulier geteelde producten bevestigde het onvoorspelbare karakter van de kwaliteitseigenschappen en daarmee het nut die het hier beoogde instrument in de praktijk zal hebben. Gebruikmakend van de eerste variabele partijen zijn cDNA banken gemaakt en daaruit vervolgens de microarray samengesteld en gespot.

De eerste helft van het tweede jaar zou gebruikt worden voor de eerste microarray hybridisatie experimenten. Bij tomaat bleken de hybridisaties minder reproduceerbaar te lopen dan gehoopt en is veel tijd gestopt in het optimaliseren van het protocol. Aangezien deze techniek veel stappen en handelingen telt en het vaak niet eenduidig is waar de variaties in resultaten door veroorzaakt worden is het optimaliseren een tijdrovende zaak gebleken. Deze fase is inmiddels succesvol afgesloten. Er is een goed en reproduceerbaar protocol ontwikkeld en een eerste set hybridisaties is uitgevoerd. Hieruit zijn een aantal genen naar voren gekomen, waarvan expressie al bij de eerste monsters van de kwaliteitsverloopprouven duidelijk varieerde. Door herhalingen met meerdere samples zal worden bepaald welk deel van deze variatie reproduceerbaar is en in verband gebracht kan worden met verschillen in later kwaliteitsverloop. Bij de microarray experimenten van roos bleek na enkele optimalisaties een goed protocol te liggen waarmee begonnen is om een ontwikkelingsreeks van bloeistadia en een reeks van Botrytis infectie stadia

te analyseren. Deze hebben geleid tot de eerste bemoedigende resultaten over genen betrokken bij deze processen en kunnen straks helpen bij het maken van beslissingen rond indicator genen. Dit is allemaal in het eerste anderhalf jaar gerealiseerd en projectvoortgang is hiermee conform de planning.

Dit geldt tevens voor de multiplex toetsontwikkeling. Vanuit de eerste verkennende experimenten met bekende sequenties van tomaat, optimalisatie van de OLA-PCR probes en detectie op cDNA en RNA is de methode doorontwikkeld tot een betrouwbaar systeem waarbij op basis van een snelle mRNA isolatie, first-strand cDNA synthese, OLA hybridisatie en PCR genexpressie gedetecteerd kan worden. Een objectieve methode om genexpressie te kwantificeren is in ontwikkeling. Het QQ assay is klaar om met belangrijke tomaat en roos sequenties uit dit project opgezet te worden, conform de planning.

De haalbaarheidsindicatoren hoeven dus niet bijgesteld te worden, het project draait en maakt voortgang zoals gepland.

2.1 Voortgang per taak over het afgelopen halfjaar

De uitvoering van dit project valt in een aantal taken uiteen die deels parallel uitgevoerd worden. Sommige van deze taken worden uitgevoerd over een langer tijdbestek (zie timechart, figuur 1).

TAAK 1 - Ketenanalyse

Een constante interactie met de praktijk zal onderhouden worden om mogelijke veranderingen in de knelpunten en logistieke problemen die invloed hebben op dit project in een vroegtijdig stadium op te merken en mee te kunnen nemen in besluitvorming en richting geven aan het onderzoek. Resultaten van de kwaliteitsverloopproeven zullen teruggekoppeld worden met de praktijk om de knelpunten te evalueren en te toetsen of we op het goede spoor blijven.

TAAK 2 - Ontwikkelen kwaliteitsverloop modellen (KVM)

Kwaliteitsverloopproeven zullen (statistisch) geanalyseerd worden met als doel de producten te groeperen in kwaliteitsklassen. Deze klassenindeling zal gebruikt worden om tot een keuze van de monsters voor genexpressie analyse te komen. Voor beide producten roos en tomaat zijn hiervoor in het afgelopen halfjaar nieuwe partijen bemonsterd en tevens van deze partijen de kwaliteit gemeten. Dit heeft extra informatie opgeleverd over de kwaliteit van de producten. Deze resultaten zullen teruggekoppeld worden met de praktijk en meegenomen worden bij de ketenanalyse en modelvorming.

TAAK 3 - Analyse en definitie expressieprofielen

De microarrays zijn inmiddels gemaakt door de geselecteerde en vermenigvuldigde fragmenten plus controle DNA's op glasplaatjes te spotten. Het protocol voor het uitvoeren van de microarrays is vervolgens geoptimaliseerd en getest op betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid. De eerste microarray hybridisaties met ontwikkelingsreeksen en inslag monsters zijn uitgevoerd en geanalyseerd.

TAAK 4 - Ontwikkeling multiplex toetsmethode

De Quality Quantifier toets is uitgevoerd met (m)RNA en op first-strand cDNA. De keus is gemaakt om in het verdere verloop cDNA te gebruiken. Een hierop toegespitste mRNA isolatie methode en cDNA synthese zijn ontwikkeld. Met behulp van een tomaat test gen (RIN) is kwantitatieve detectie van variatie in genexpressie gevalideerd. Een objectief quantificatie protocol is in ontwikkeling.

TAAK 5 - Integratie en validatie van KVMs en gen-expressie-profielen voor roos en tomaat

Nog niet van toepassing in de afgelopen periode.

Een fasering per taak met tijdsplanning is weergegeven in de Gantt-chart. De voortgang per taak zal hieronder besproken worden.

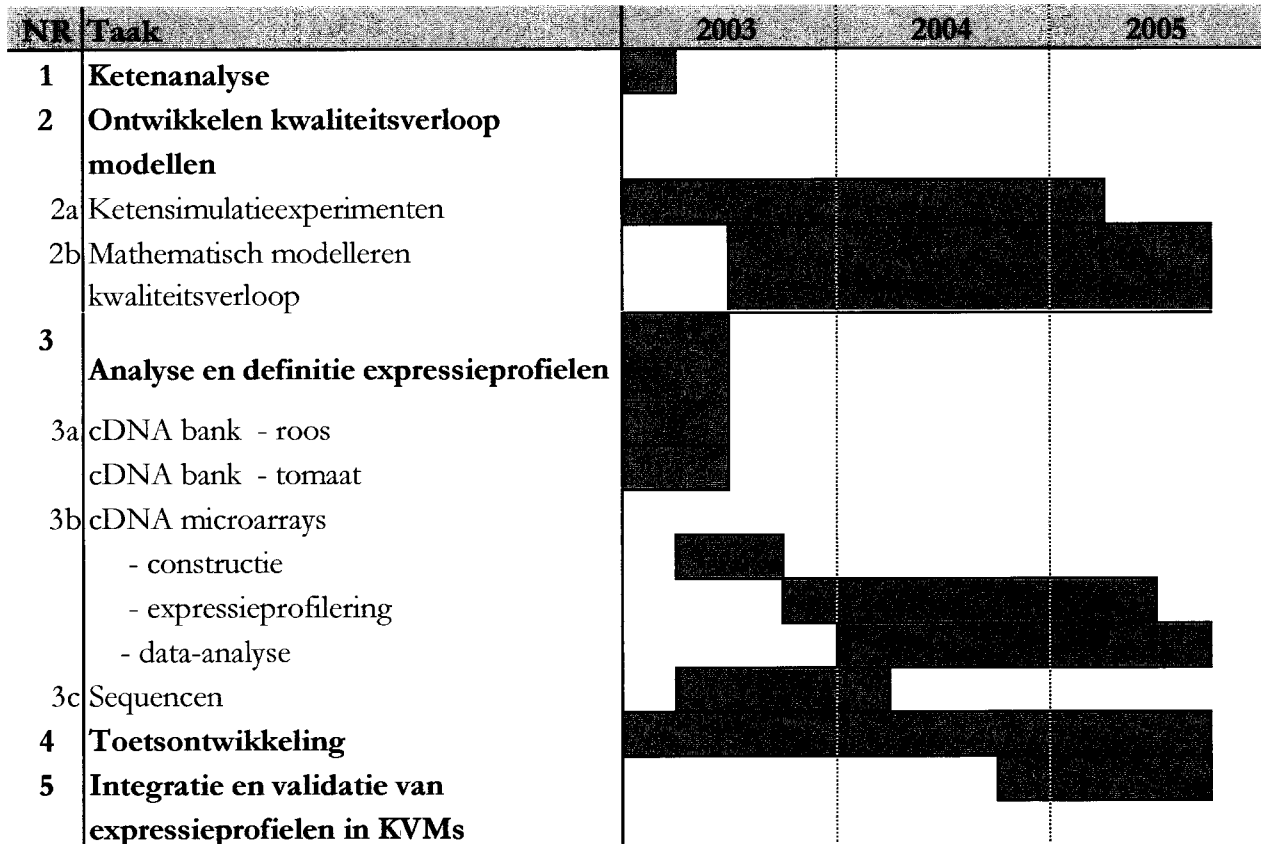


Fig 1. Timechart van het project verdeeld over de taken.

2.1.1 Ketenanalyse

Door een constante interactie met de praktijk zullen veranderingen in de knelpunten en logistieke problemen die invloed hebben op dit project meegenomen worden bij het bepalen van de richting van onderzoek. Tot op heden hebben zich geen veranderingen in de ketens zoals opgesteld in een eerdere fase van het project voorgedaan en is er dus geen aanleiding het project zoals ingeslagen bij te sturen.

2.1.2 Ontwikkelen kwaliteitsverloopmodellen

Op basis van kennis en expertise van het product is een proefopzet ontwikkeld voor zowel roos als tomaat waarin het kwaliteitsverloop efficiënt was te bepalen en te meten. Het afgelopen halfjaar zijn het aantal monsters uitgebreid wat geen nieuwe conclusies tot gevolg heeft gehad. Hetzelfde beeld blijft dus overeind dat er veel variatie is in kwaliteit bij de hier gebruikte voorbeeld producten, roos en tomaat.

Bij roos zijn we tot een indeling gekomen van drie kwaliteitsklassen maar houden we de mogelijkheid open om ze ook in vier klassen te analyseren. Op basis van deze indeling die ook statistische onderbouwd is en tevens op basis van bloem ontwikkeling van dezelfde batches hebben we een eerste selectie kunnen maken van monsters die geanalyseerd gaan worden met behulp van de microarray technologie.

Voor tomaat zijn ook meerdere partijen op dezelfde manier geanalyseerd op verlies van stevigheid. Dit bleek een succesvolle proefopzet die een zeer duidelijk beeld van de invloeden op kwaliteit hebben aangetoond. De uitgevoerde bemonstering en analyses hebben voldoende resultaten en variabele partijen opgeleverd dat een genexpressie analyse met een selectie van monsters uit de verschillende kwaliteitsklassen uitgevoerd kan worden. De voortgang voldoet hiermee aan de planning.

2.1.3 Analyse en definitie expressieprofielen

Vorig jaar zijn de voorbereidingen uitgevoerd voor het maken van de microarray. Daarvoor zijn eerst banken gemaakt, de DNA volgorde van de clonen bepaald, een selectie gemaakt van clonen die gespot zouden worden waarna deze vermenigvuldigd zijn en opgezuiverd. Begin dit jaar zijn de microarrays gespot zodat het begin van dit jaar met microarray hybridisatie begonnen kon worden.

Voor roos wordt gewerkt met totaal RNA opgezuiverd uit buiten petalen van de roos.

Optimalisatie van het hybridisatie protocol is beperkt gebleven tot het bepalen van de juiste concentratie RNA nodig voor een reproduceerbaar signaal. 50ug totaal RNA gaf een constante hybridisatie signaal waarbij ratio's (rood en groen fluorescerend label), bij labelling van hetzelfde monster, in goede balans waren. Vervolgens zijn de eerste monsters, bestaande uit buiten petalen afkomstig van rozen met een toename in verouderingsstadium, op de microarray geanalyseerd. Met behulp van deze analyse hebben we inzicht gekregen in genen die geassocieerd zijn met bloemontwikkeling en minder interessant zijn uit oogpunt van Botrytis gevoeligheid. Daarnaast zijn dezelfde ontwikkelingsstadia getest maar nu met zichtbare oplopende Botrytis aantasting. Interessante conclusies uit deze proef waren de Botrytis infectie gerelateerde genen die na analyse van deze reeks geselecteerd konden worden. De resultaten van de experimenten gaven een zeer betrouwbare indruk (reproduceerbaarheid, aantal clones met significant signaal, clustering van experimenten, clustering van bekende clones en clustering van identieke clones) en bevestigen de kracht van de techniek.

Voor tomaat werden een aantal RNA extractiemethoden een aantal keren herhaald en vergeleken naar RNA opbrengst, alsmede naar de geschiktheid van het RNA om een goede labelling voor microarray hybridisatie te krijgen. Gekozen is voor een directe (2-staps) opzuivering van mRNA uit de tomaatextracten omdat die het snelst en meest efficiënt bleek. In initiële labelling en hybridisatie experimenten leek dit materiaal steeds net wel of net niet voldoende signaal te geven op de geteste microarrays. Tevens was er sprake van veel, onregelmatig optredende hoge achtergrondsignalen die verder analyse bemoeilijkten. Door gebruik te gaan maken van een automatisch hybridisatiestation (waarbij de proefomstandigheden meer constant gehouden kunnen worden), werd zowel het signaal niveau alsmede de signaal/achtergrond-ratio zodanig

verbeterd, dat begonnen kon worden met de bewerking en hybridisatie van de eigenlijke proefmonsters.

2.1.4 Ontwikkeling multiplex toetsmethode

Basis voor de te ontwikkelen multiplex toets is de door KeyGene geïntroduceerde Quality Quantifier technologie. Hoogspecifieke DNA target herkenning op basis van oligo ligatie assays (OLA) en daaropvolgende amplificatie, gecombineerd met detectie van vooraf bepaalde lengtes van de specifieke ligatie producten wordt toegepast voor bepaling van mRNA (gen expressie) niveau's.

We hebben zowel (m)RNA als hiervan afgeleid first-strand cDNA target met het QQ assay getoetst. Omdat cDNA consequent de beste resultaten gaf hebben we besloten om in het vervolg first-strand cDNA als target te gaan gebruiken. Om het assay te valideren is expressie van het tomaat RIN gen bekeken in relatie tot de expressie van een aantal constitutieve genen. Weefsel specifieke en mutant (homo- en heterozygote) expressie zijn geanalyseerd. Ook hebben we het RIN gen gebruikt om tegen een constante expressieachtergrond een RIN verdunningsreeks te meten. Hiermee is een eerste opzet gemaakt voor kwantitatieve expressiemeting. De resultaten wijzen erop dat kwantificeren mogelijk is over een groot bereik van expressie.

2.1.5 Integratie en validatie

Integratie en validatie van genexpressie analyses en kwaliteitsverloop modellen komen pas later in dit project aan bod.

2.2 Kosten overzicht

Komt nog als alle declaraties binnen zijn.

2.3 Mijlpalen komend halfjaar

TAAK 1 - Ketenanalyse

Resultaten van de kwaliteitsverloop-proeven zullen teruggekoppeld worden met de praktijk om de knelpunten te evalueren en te toetsen of we op het goede spoor blijven.

TAAK 2 - Ontwikkelen kwaliteitsverloop modellen (KVM)

Voor zowel roos als tomaat zullen nog enkele partijen geanalyseerd worden tijdens risico perioden (einde van optimale seizoen) om nog extra partijen te hebben die later waardevolle informatie kunnen opleveren. De informatie over deze partijen zal gekoppeld worden met de genexpressie data verkregen met de microarray hybridisaties.

TAAK 3 - Analyse en definitie expressieprofielen

Komend half jaar zullen de genexpressie profielen gemaakt worden van de partijen uit de verschillende kwaliteitsklassen. Voor zowel roos als tomaat gaat dit gelijk op. De resultaten zullen geanalyseerd worden met de standaard genexpressie bewerkingsprogramma en statistische onderbouwingen om te komen tot een eerste verzameling van kandidaat bio-indicatoren voor de kwaliteitseigenschappen.

TAAK 4 - Ontwikkeling multiplex toetsmethode

In het komend half jaar zullen de eerste tomaat en roos genen worden geselecteerd uit de microarray data, die gaan dienen als “indicator” en constitutieve genen die nodig zijn voor kwantificeren. OLA probes zullen worden ontworpen en in het QQassay getest. Een definitieve samenstelling van OLA probes voor tomaat en roos wordt gemaakt. Voor het kwantificeren wordt een objectieve scoringsmethode ontwikkeld.

TAAK 5 - Integratie en validatie van KVMs en genexpressieprofielen voor roos en tomaat

Nog niet van toepassing in de komende periode.

3 Resultaten

3.1 Overzicht onderzoeksresultaten

De rozencultivar 'Bianca' blijkt in de praktijk gevoelig te zijn voor Botrytis aantasting. Zonder duidelijke symptomen tijdens en vlak na de oogst blijkt dat in sommige partijen toch zeer snel Botrytis aantasting ontwikkeld, wat de visuele kwaliteit ernstig beïnvloedt. De proeven zijn daarom uitgevoerd met de witte rozencultivar 'Bianca' die direct geleverd zijn door een teler en vervolgens een standaard behandeling ondergaan hebben. Deze rozen worden op vaas gezet bij een standaard luchtvochtigheid (60%) en kamertemperatuur (21°C), vergelijkbaar met de situatie bij de consument. Vervolgens wordt van deze bloemen het bloemstadium (verschillende fases van bloemknop tot complete verwelking) en Botrytis infectiestadium (0: geen tot 4: bruine vlekken, afhankelijk van het aantal Botrytis laesies en laesie oppervlak) bepaald.

Op identieke wijze zijn 'Bianca' rozen, afkomstig van verschillende kwekers (labelled as A t/m F) en op verschillende momenten in het jaar, geanalyseerd. De resultaten van deze experimenten staan in figuur 2. Daarin is te zien dat na een vaasleven van 7 dagen er veel verschillen in Botrytis aantasting is gevonden tussen de partijen. Deze aantasting was nog niet voorspelbaar op basis van de zichtbare aantasting op dag 1 (het moment van aankomst). De gemiddelde Botrytis aantasting (aantal bloemen x Botrytis index, gedeeld door het totaal aantal bloemen) varieerde tussen de 0.14 en 1.4. Voor de microarray analyse worden de partijen opgedeeld in drie of vier kwaliteitsklassen.

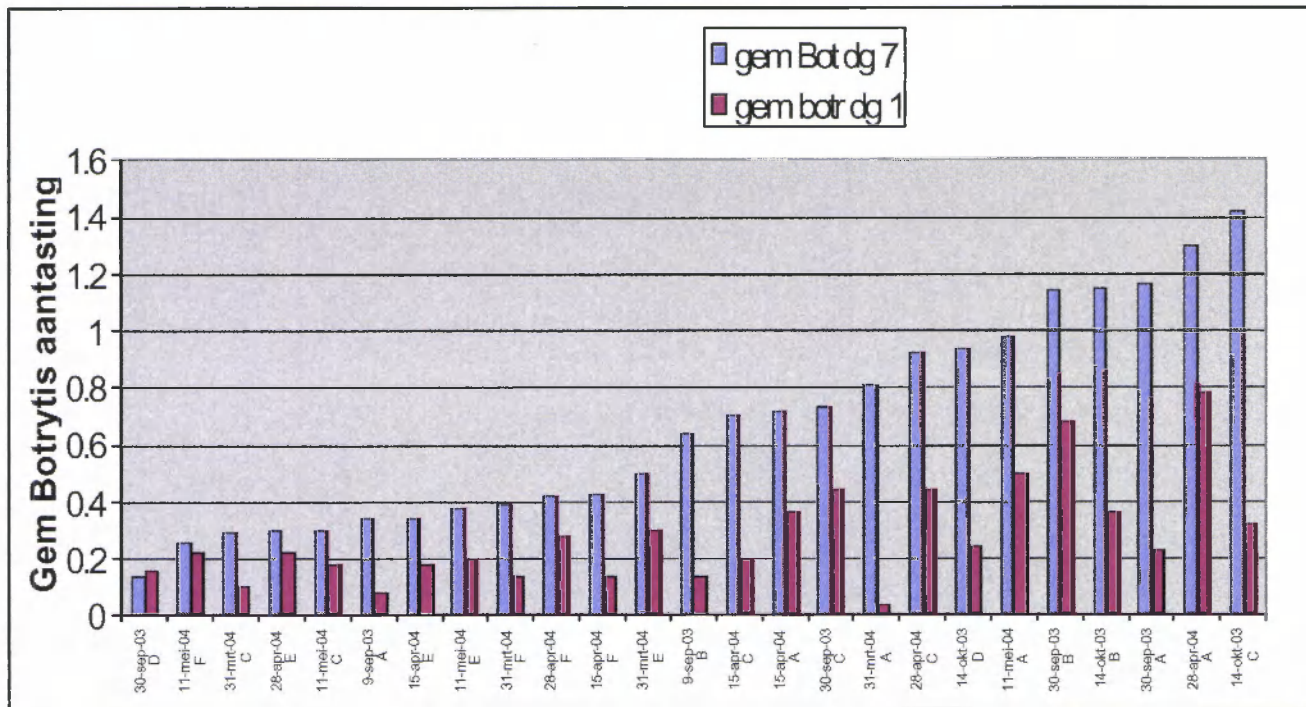


Fig. 2. Botrytis besmetting van 25 partijen 'Bianca' rozen geordend naar toename in % besmetting na 7 dagen. De proeven zijn uitgevoerd verspreid over het jaar. De label A t/m F geeft de teler, waar de bloemen vandaan komen, aan.

In april 2004 is opnieuw een kwaliteitsexperiment uitgevoerd voor tomaat waar een partij ‘Aromata’ tomaten afkomstig van 6 verschillende telers met elkaar zijn vergeleken. Net als bij de eerder uitgevoerde experimenten zaten er weer grote verschillen in kwaliteit tussen de partijen. In het algemeen was de gemiddelde kwaliteit van de partijen wel hoger dan de partijen die vorig jaar rond dezelfde periode zijn geanalyseerd. In figuur 3 zijn de resultaten van alle uitgevoerde experimenten verzameld en weergegeven als het moment dat ze door stevigheidgrens 5 gaan. Op basis van deze gegevens zijn de partijen verdeeld in vier kwaliteitsclasses. De keuzes voor de monsters die gebruikt zijn bij de microarray analyse zijn gebaseerd op deze klasse indeling.

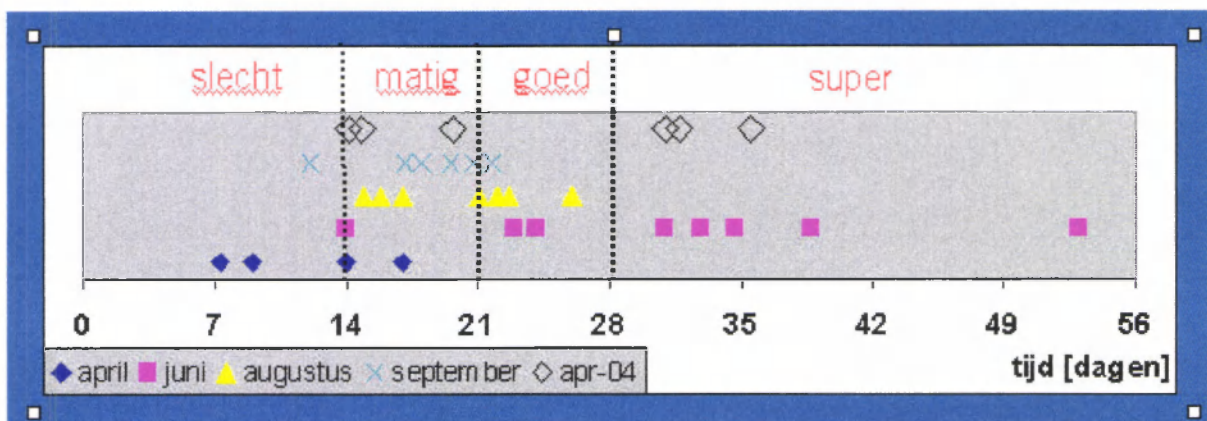


Fig. 3. Classificatie van de productkwaliteit van tomaat. Alle geanalyseerde partijen zijn weergegeven als het tijdstip (dagen na de oogst) dat ze door stevigheidgrens 5 heen gaan.

De eerste microarrays voor roos zijn uitgevoerd. Hierbij is eerst gekeken naar een bloemontwikkelings reeks van onbesmette buiten petalen van de bloem. Deze analyses zijn uitgevoerd om een indruk te krijgen over welke genen een rol spelen tijdens de ontwikkeling van de bloem. Deze kennis is belangrijk omdat batches van rozen niet altijd op hetzelfde moment gesneden worden en op het moment van veiling in verschillende bloeistadia kunnen zijn. Genen die betrokken zijn bij bloemontwikkeling (zeker als ze verschillen tussen stadia 1 en 2) kunnen beter vermeden worden als bio-indicatoren voor het voorspellen van Botrytis aantasting. Figuur 4 geeft een overzicht van het cluster met genen die ‘aangaan’ of harder ‘gaan aan staan’ tijdens de ontwikkeling van de bloem. Genen die bij deze analyse naar voren kwamen als getrokken genen komen overeen met wat te verwachten was op basis van de literatuur zoals de genen die te maken hebben met celwand afbraak en eiwit afbraak. Maar ook zijn er nieuwe interessante genen gevonden.

Naast deze onbesmette bloem ontwikkelingsreeks is er ook een zelfde bloem ontwikkelingsreeks geanalyseerd maar nu met toenemende Botrytis aantasting. Dit zal informatie opleveren over de genen die geassocieerd kunnen worden met Botrytis aantasting. Na analyse van deze arrays bleek ook hier genen te clusteren die al eerder geassocieerd werden met plant-pathogeen interacties (figuur 5). In dit cluster zijn ook genen te vinden die afkomstig zijn van de Botrytis zelf (nr 93,

120, 134, 797, 875 en 963). Dit geeft aan dat het maken van de microarray en de microarray hybridisaties goed zijn verlopen. De eerste conclusies die uit deze experimenten getrokken kan worden zijn: 1) dat de genen gevonden in het eerste cluster (fig 4) niet in aanmerking komen als bio-indicators omdat expressie verschillen van deze genen eerder zullen koppelen aan ontwikkelingsstadium van de bloem dan Botrytis aantasting en 2) dat vroegtijdige detectie van Botrytis op basis van schimmel genen met deze opzet niet mogelijk lijkt. Dit komt overeen met onze verwachting dat we echt op zoek moeten naar planten genen die als bio-indicator moeten gaan dienen.

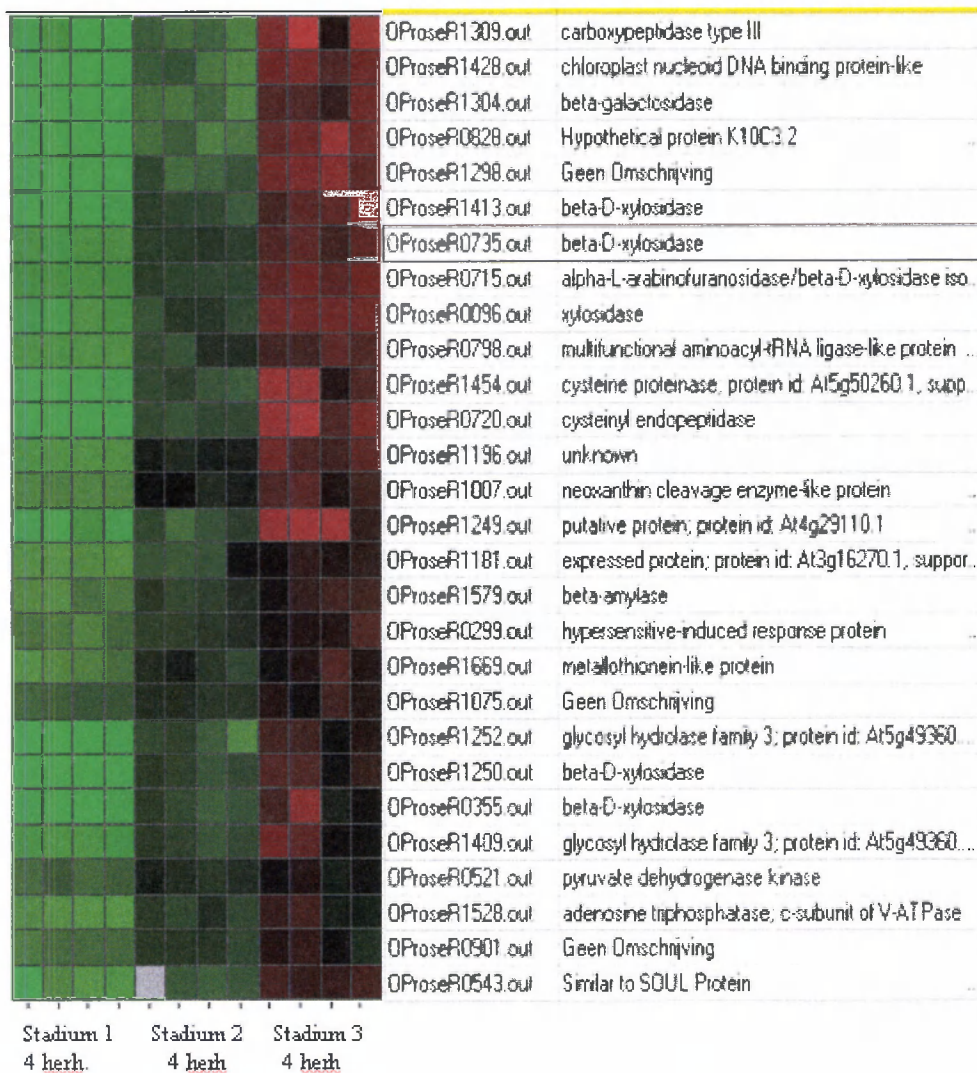


Fig. 4. Overzicht van de genen waarvan de expressie omhoog gaat tijdens de veroudering van de petalen (bloemstadium 1 t/m 3). Groen is uit, Rood is aan.

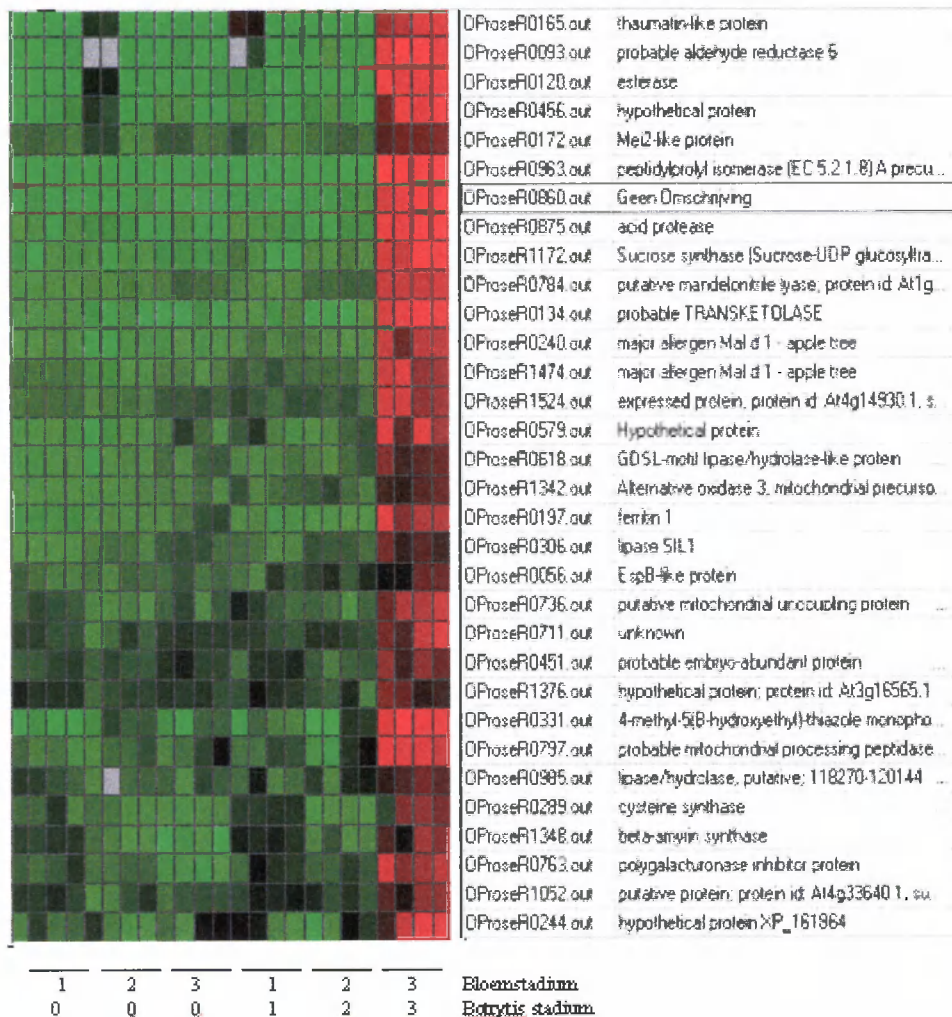


Fig. 5. Cluster van genen die aan gaan tijdens de kolonisatie van Botrytis van de bloem petalen en niet gerelateerd zijn aan het bloem ontwikkelingsproces.

Het tomaten array onderdeel heeft ook vooruitgang geboekt. Na optimalisatie van de RNA extractie en hybridisatie procedures, is begonnen met hybridisaties van proefmonsters. In een eerste serie experimenten werden hybridisaties gedaan met monsters van twee herkomsten. 1 en 3, uit april 2003, waarbij in kwaliteitsverloopmodellen gebleken was dat tomaten van herkomst 1 aanmerkelijk sneller zacht werden dan die van herkomst 3. Om het verloop van genexpressie in de tijd te volgen werden van beide herkomsten monsters van dag 0, 3, 5, 7 en 10 na de oogst gebruikt. Alle hybridisaties van monsters werden uitgevoerd tegen een identiek referentiemonster (bestaande uit een mengsel van RNAs van een groot aantal verschillende monsters) en ratio van de spotintensiteit monster / spotintensiteit referentie voor elk monster en elke spot op de array bewaard. Een eerste analyse van data laat zien dat 60-70% van alle spots voldoende signaal levert in de meeste experimenten, en dus verder bruikbaar is voor analyse. Na het verwijderen van de onbruikbare data werden de overgebleven data onderworpen aan Principal Component Analysis (PCA).

Dit is een statistische methode om de voornaamste bronnen van variatie in experimentele data te helpen identificeren en tevens snel vast te stellen welke data (in ons geval: welke spots op de microarray) het meest verantwoordelijk zijn voor die variatie. Figuur 6 laat de bijdrage van de twee belangrijkste oorzaken van variatie zien, weergegeven als de x- en y-coördinaten van experimenten in een grafiek. Hierin wordt getoond hoe de verschillende experimenten van elkaar verschillen volgens die twee componenten. Alle experimenten zijn gedaan op elk twee arrays per glaasje, en de data van die twee arrays zijn weergegeven als A en B. Experimenten zijn aangeduid met dag (dag0- etc.) en met herkomst dag0-1A of dag0-3A, voor de twee herkomsten, respectievelijk). De relatieve bijdrage van de twee componenten (X en Y as) in de totale variatie was 32 en 16% van het totaal, respectievelijk. Het is duidelijk dat experimenten die in tijdstip verschillen langs de X-as zijn gerangschikt, en dat de afstand (en dus de mate van variatie) afneemt naarmate het tijdstip langer na de oogst valt. Er is dus een aanzienlijke factor tijd betrokken bij de genexpressievariatie. Monsters van de twee herkomsten zijn min of meer gescheiden langs de Y-as, en ook daar neemt het verschil af monsters van langer na de oogst. Wanneer specifiek gekeken wordt naar de gegevens van spots die volgens de PCA het meest bijdragen aan deze variatie, blijkt dat voor deze spots inderdaad een duidelijk verschil op dagen 0 en 3 te zien is, en dat dit verschil minder wordt in de tijd (figuur 7).

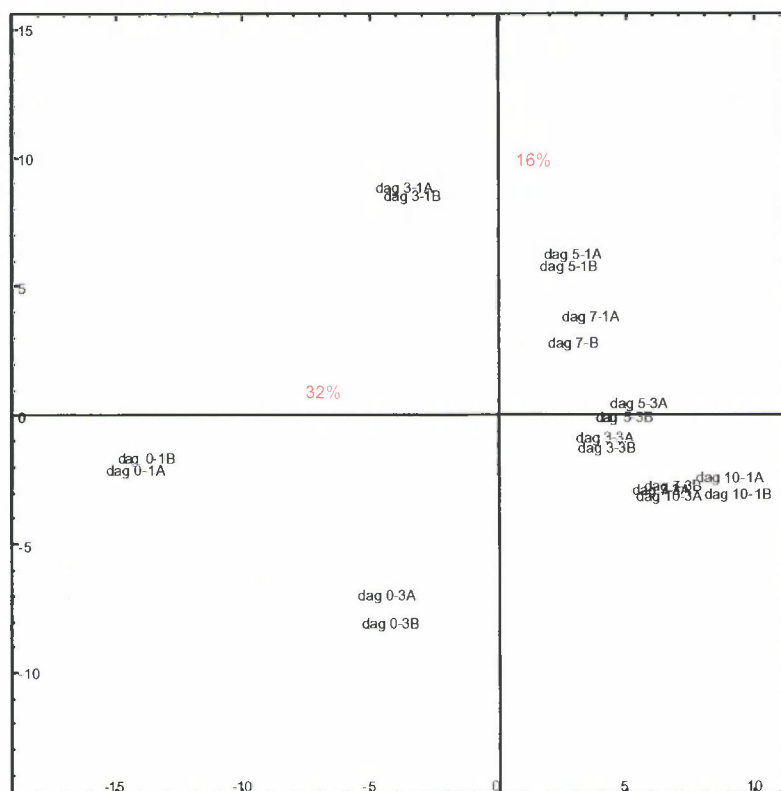


Fig. 6. PCA plot van de eerste serie experimenten. De belangrijkste variatie (tot. 32%) is langs de X-as uitgezet en komt het meest overeen met variatie in de tijd. Plaatsing langs de Y-as komt het best overeen met het verschil in herkomst.

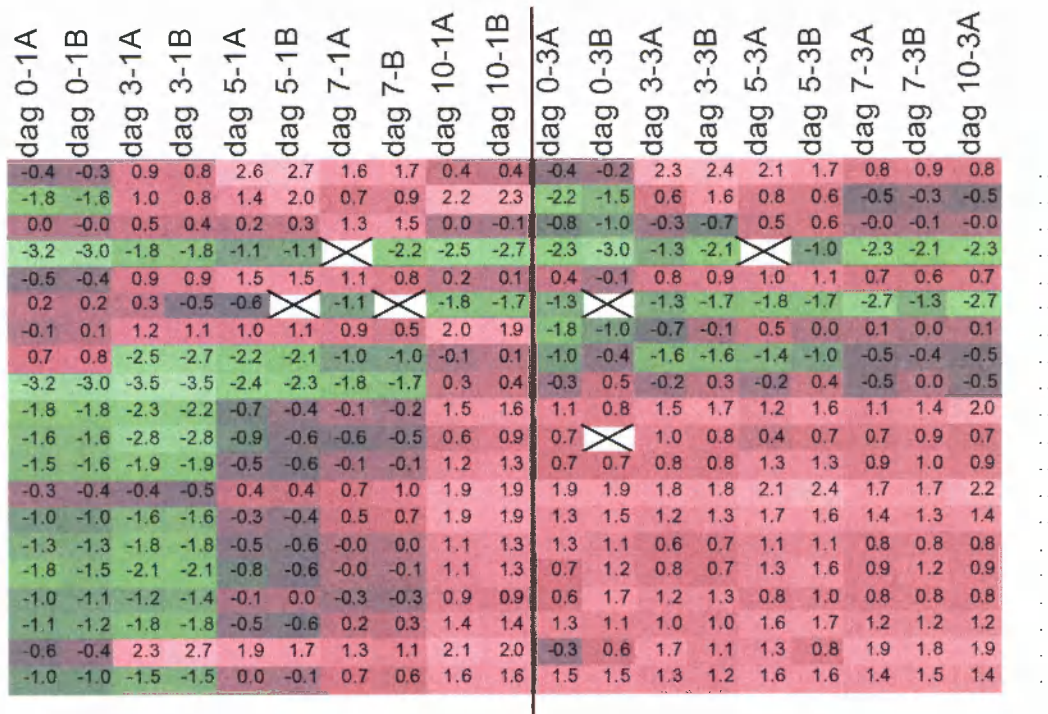


Fig. 7. Ratios van de intensiteit monster/referentie (2log) voor spots (horizontale rijen) in verschillende monsters (kolommen), gescheiden per herkomst door de verticale lijn, voor de microarray spots die volgens de PCA het meest bijdragen aan de variatie in samples. Ratios zijn weergegeven in de blokjes. De achtergrond van de blokjes is gekleurd afhankelijk van de waarde van deze ratio: negatief groen, positief rood. Kleurintensiteit neemt toe met de mate waarin deze waarde van 0 (2log, dus ratio=1, betekent niet verschillend in expressie tussen monster en referentie).

Dergelijke spots maken dus een duidelijk onderscheid tussen de twee herkomsten mogelijk, zij het alleen voor deze monsters. Of dat dit fenomeen reproduceerbaar is, m.a.w. of deze verschillen altijd optreden bij monsters met verschillend kwaliteitsverloop, zal moeten worden bepaald door veelvuldige herhalingen met verschillende monsters.

Multiplex toets

Uit de eerste Quality Quantifier toetsen met RNA (totaal RNA en mRNA) als target bleek dat de resultaten niet goed reproduceerbaar waren. Een aantal genen kon worden geïdentificeerd maar met zwakke signalen en een hoge achtergrond. Omdat het bij de OLA gebruikte ligase veel actiever is bij ligatie van oligo's op DNA dan op RNA is overgegaan op de detectie van, van het RNA afgeleid, first-strand cDNA. Voor het gebruik van first-strand cDNA moesten nieuwe op de "sense" streng gerichte oligo's ontworpen worden. Voor de isolatie van mRNA uit diverse weefsels is gekozen voor de Dynabeads mRNA DIRECT kit (DYNAL biotech). Deze kit garandeert een snelle efficiënte degradatie vrije isolatie van poly-A RNA. Op het aan de beads gebonden mRNA wordt direct cDNA synthese uitgevoerd.

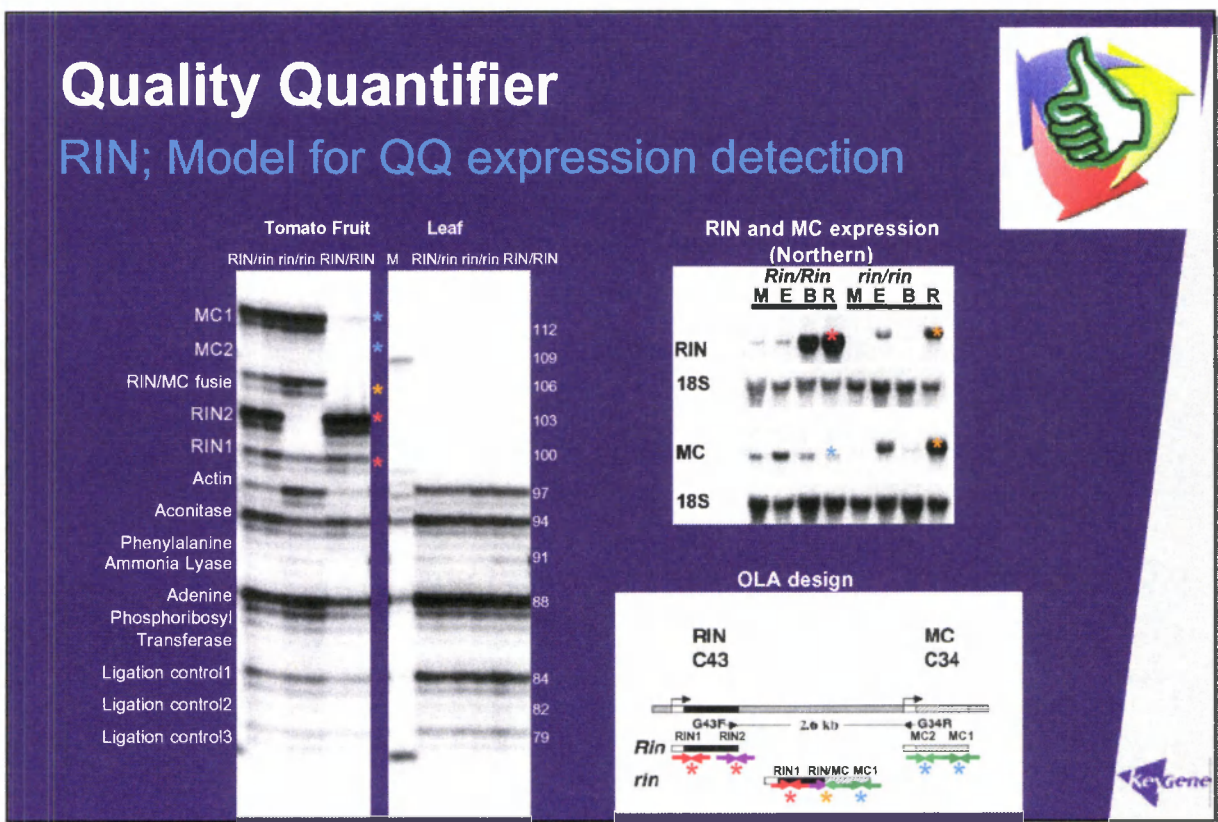


Fig. 8. RIN en MC genen als testmodel voor QQ expressedetectie.

Panel OLA design: voor RIN en MC als ook het mutantfusie gen zijn de locaties van de OLA probes schematisch aangegeven. De gekleurde * geeft de corresponderende Northern expressie en QQ detectie weer. * = RIN; * = MC; * = rin-mc fusieproduct tgy deletie

Panel RIN en MC expressie: detectie van RIN en MC expressie in diverse rijpingsstadia, van belang is (R): rode vrucht. (M): volwassen groene vrucht, (E): ethyleen stimulatie van M, (B): breaker vrucht. Panel QQ assay: detectie van tomaat-vrucht en blad specifieke expressie van RIN, MC en rin-mc in wt, heterozygoot en homozygoot mutant, samen met constitutieve genen en controles.

Om het QQ assay te toetsen aan bekende data hebben we de expressie van de tomaat RIN en MC genen bepaald. Het expressieprofiel van de RIN en MC genen in wildtype (RIN/RIN), heterozygoot (RIN/rin) en ook de afwijkende expressie van de homozygoot (rin/rin) mutant zijn vanuit literatuur en KeyGene data bekend. De resultaten zijn weergegeven in figuur 8. Duidelijk is te zien dat de RIN en MC expressiedetectie van het QQ assay van tomaat-vrucht overeenkomt met die op de Northern (alleen MC set2 werkt om niet opgehelderde redenen nog niet). In blad komen RIN en MC niet tot expressie.

Om te testen of het QQ assay geschikt is voor het kwantificeren van genexpressie is een concentratiereeks gemaakt van RIN cDNA van vrucht en RIN cDNA (geen expressie) van blad waarbij de totale hoeveelheid cDNA in het assay constant is gehouden. Hiermee wordt een afnemende expressie van RIN (MC) gesimuleerd. De resultaten worden weergegeven in figuur 9.

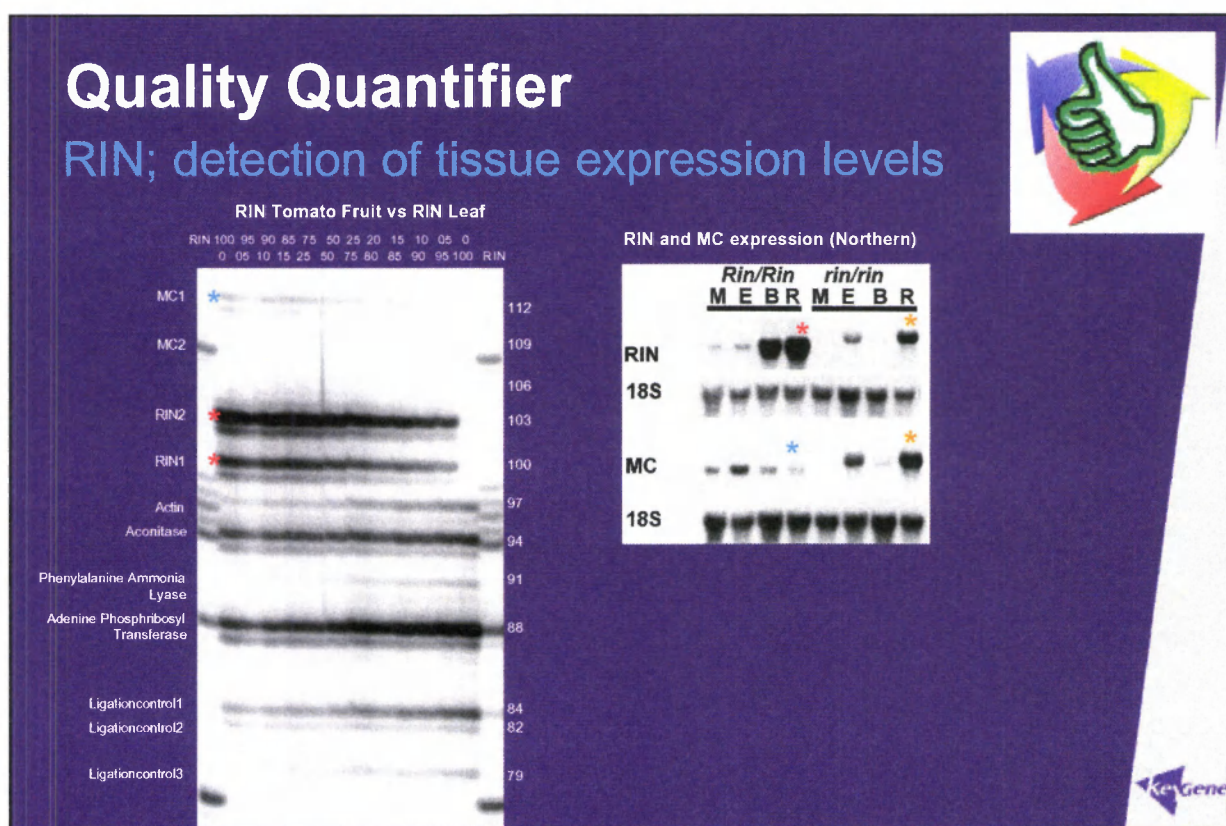


Fig. 9. Detectie van RIN expressie niveaus.

Panel RIN en MC expressie: Northern expressie data; zie boven.

Panel QQ assay van RIN vrucht versus RIN blad: RIN vrucht en blad cDNA zijn gemengd in de aangegeven verhouding (100%-0%). Detectie van RIN en andere genen en controles is aangegeven.

Figuur 9 laat zien dat deze gesimuleerde afnemende expressie van RIN (en MC) in een constante achtergrond van andere genen met de QQ toets gedetecteerd wordt. Er is een duidelijk teruglopende signaal waar te nemen. Het geringe aantal banden in het assay resulteert nog wel in een wisselwerking in de verdeling van het radioactief signaal tussen de te meten genexpressie en die van de “constante” genen. De signalen uit het bovenstaande radioactieve assay zijn gekwantificeerd en de niveau’s van RIN en MC expressie ten opzichte van de gemiddelde “constitutieve” genexpressie is bepaald. Deze is weergegeven in figuur 10

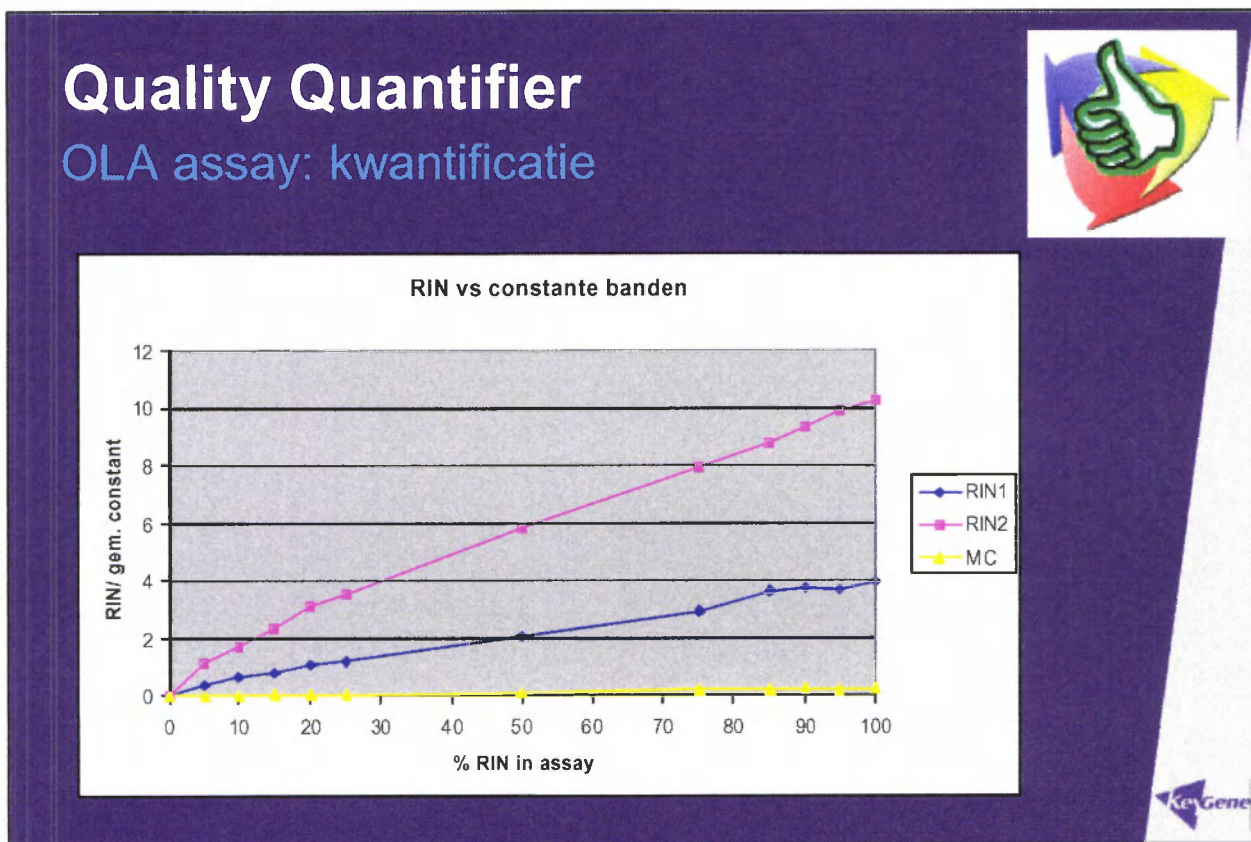


Fig. 10. Kwantificatie van RIN en MC genexpressie

De verhouding van RIN en MC expressie (simulatie genexpressie variatie) en de gemiddelde constante genexpressie is uitgezet tegen het percentage RIN (MC) in het assay.

Te zien is dat over een ruim bereik de verschillende concentraties van het RIN cDNA in een constante achtergrond lineair gedetecteerd konden worden. Tevens is te zien dat de probe sets RIN1 en RIN2, ontworpen tegen hetzelfde cDNA, een verschillende detectie efficiëntie hebben. Conclusies uit deze reeks experimenten zijn: 1) de Quality Quantifier toets met first-strand cDNA als target geeft een duidelijk beeld van genexpressie. 2) de QQ toets is gevoelig genoeg om verschillen in genexpressie (up en down regulatie) over een groot bereik met een relatieve kwantificatie te detecteren. 3) het assay is klaar om op relevante tomaat en roos targets toegepast te worden.

3.2 Knelpunten en oplossingen

Tot op heden hebben zich nog geen knelpunten voor gedaan. Ook voor het komende halfjaar verwachten we geen onoverkomelijke hindernissen op de weg te vinden.

3.3 Octrooiaanvragen

Nog niet van toepassing.

3.4 Interne rapportages

Interne verslagen, notulen en presentaties zijn opvraagbaar bij de projectleider J. Mes (A&F).

Notulen:

- OKEE vergadering met begeleidingscommissie, 23 januari 2004

Documenten:

- Tweede Halfjaarverslag EET, 2003
- Tweede Halfjaarverslag PT, 2003
- Eerste Halfjaarverslag PT, 2004

Presentaties:

- Bijeenkomst met begeleidingscommissie, 23 januari 2004:
 - Deliverables EET-OKEE
 - Tomaat kwaliteit- data en analyse
 - OKEE - Voortgang Tomaat
 - OKEE - Voortgang Roos
 - Sequence data en selectie support
 - OKEE - Voortgang multiplex toetsmethode
- OKEE bijeenkomst zonder begeleidingscommissie, 28 mei 2004
 - Tomaat kwaliteitsproeven 2004
 - Tomaat microarray voortgang
 - Roos kwaliteitsproeven en microarray voortgang
 - Multiplex toets voortgang

Openbare presentatie:

Jurriaan J. Mes. Op weg naar een toets voor Botrytis aantasting in roos. KNPV werkgroep Botrytis gehouden op 18 mei, te Lisse.

3.5 Openbare publicaties

Jurriaan J. Mes, Renata M. Ariens, H. Martijntje Vollebregt, Eric P. Boer, Monique F. van Wordragen. Op weg naar een toets voor Botrytis aantasting in roos. KNPV werkgroep Botrytis gehouden op 18 mei, te Lisse. Abstract in Gewasbescherming (in press).

4 Conclusies

De kwaliteitsverloop-proeven bij roos en tomaat hebben een duidelijk beeld opgeleverd over de variatie in kwaliteit zoals ook gevonden wordt in de praktijk. De uitgevoerde experimenten hebben een aardige verzameling van batches opgeleverd die variëren in kwaliteit en vormen daarmee een goede basis voor het microarray werk. De eerste microarray experimenten hebben de kracht van de techniek weer duidelijk onderstreept. Na analyse van enkele hybridisaties konden veel genen geïdentificeerd worden die geassocieerd kunnen worden met de bloemontwikkeling van roos, met de botrytis aantasting in roos en met de verzachting van het vruchtvlees van tomaat. Veel van de betrokken genen waren reeds al bekend in de literatuur (wat de betrouwbaarheid van de analyses lijkt te onderbouwen) maar ook nieuwe genen zijn als potentieel interessant aan te merken. Deze nieuwe genen kunnen als basis dienen van nieuwe hypothesen over de oorzaak en achterliggend moleculair mechanisme van de kwaliteitsproblemen. Ook op het gebied van de multiplex toets methode is een goede voortgang geboekt. In de getoonde experimenten is gevonden dat de expressie van het voorbeeld gen *rin* goed te detecteren was en dat daarmee een goede stap vooruit is geboekt. De volgende stap zal het toepassen en testen zijn op voorbeeld genen van roos en tomaat.

Alle partners maken progressie en volgen nagenoeg de planning zoals eerder beschreven. De samenwerking tussen de partners is ook zeer motiverend. De begeleidingscommissie die aanwezig was op de vergadering van 23 januari 2004 was tevreden met de voortgang die gemaakt is en was het eens met de keuzes en conclusies zoals hier geformuleerd. Binnenkort zal er een presentatie gehouden worden over de voortgang over de eerste periode van 2004 zoals ook hier in het verslag staat beschreven.