

# Kwaliteitsgenomics Champignons

Eindverslag

Vertrouwelijk

Jurriaan Mes  
Brigitte Verkerk  
Maurice Konings  
Anton Sonnenberg

Rapport nr. 379

## Colofon

Dit project is een samenwerkingsverband tussen A&F B.V. en PPO Horst, gefinancierd door Productschap Tuinbouw.

Titel	Kwaliteitsgenomics Champignons
Auteur(s)	Jurriaan Mes, Brigitte Verkerk, Maurice Konings, Anton Sonnenberg
A&F nummer	379
Publicatiedatum	28 februari 2005
Vertrouwelijk	Ja
Goedgekeurd door	Herman Peppelenbos

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](mailto:info.agrotechnologyandfood@wur.nl)  
Internet: [www.agrotechnologyandfood.wur.nl](http://www.agrotechnologyandfood.wur.nl)

© Agrotechnology & Food Innovations 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, 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 rights 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 inaccuracies in this report.*



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

## **Inhoudsopgave**

<b>1 Inleiding</b>	<b>5</b>
<b>2 Monsters uit de praktijk</b>	<b>7</b>
<b>3 Maken van de microarray</b>	<b>11</b>
3.1 Genen uit de subtractie banken	11
3.2 Overige genen op de microarray	12
3.3 Printen van de array	13
<b>4 Microarray analyse van bewaarreeks</b>	<b>15</b>
<b>5 Microarray analyse van monsters met verschillende kwaliteitverloop</b>	<b>21</b>
<b>6 Validatie microarray analyse</b>	<b>25</b>
<b>7 Conclusies</b>	<b>27</b>
<b>8 Vervolgtraject</b>	<b>29</b>



# 1 Inleiding

De champignonsector staat op dit moment onder grote druk als gevolg van de arbeidskosten voor de oogst. Deze zijn hoger dan die van de belangrijkste concurrent (Polen). Naast arbeidskosten is de productkwaliteit een belangrijk concurrentiepunt. Er wordt een algemene trend gesignaleerd van een toenemende vraag naar een product van hoge kwaliteit, een product dat veilig is voor de consument en een product dat een voorspelbare kwaliteit heeft in de keten. Met name voor het laatste zou een betrouwbare en makkelijk inzetbare methode voor kwaliteitsmonitoren en – voorspellen, in een vroeg stadium van de keten, een beslissing kunnen steunen over het afzetgebied. Dit kan verder uitval in de keten verminderen. Tevens kan een dergelijke methode gebruikt worden in de teeltsturing, zodat champignons van optimale kwaliteit geproduceerd worden.

Recent ontwikkelde technologieën, gebaseerd op genexpressie (de werking van erfelijk materiaal), bieden een goede mogelijkheid om een kwaliteitstest te realiseren. Binnen dit project is gekozen om te zoeken naar stukken erfelijk materiaal (genen) die direct of indirect betrokken zijn bij kleur en verkleuring, een groot probleem voor de naooogstkwaliteit van champignons. Deze indicatorgenen zitten in elke champignon maar de mate waarin ze ‘aan’ staan kan bepalen of de betreffende champignons snel zullen verkleuren of relatief lang van goede kwaliteit blijven. Dit project is bedoeld als eerste opstap naar het vinden van indicatorgenen die de verkleuring van champignons kunnen voorspellen. Indien duidelijke aanwijzingen zijn gevonden dat dergelijke indicatorgenen bestaan en betrouwbaar ingezet kunnen worden om kwaliteit te voorspellen, kan deze methode uitgewerkt worden tot een labtoets of mogelijk zelfs naar een eenvoudige toetsysteem uitvoerbaar direct na oogsten bij de kweker, exporteur of bij aankomst van bij de detailhandel.

Een eerste stap naar een kwaliteitstoets is het vinden van kandidaat indicator genen. Daarvoor is allereerst door PPO een bank gemaakt van genen die ‘aan staan’ in de champignon. Door genen, die ‘aan staan’ in goed en/ of relatief slecht ogend materiaal, in 2 richtingen van elkaar af te trekken is verrijkt voor genen die mogelijk relevant zijn voor de kwaliteitseigenschap kleur en verkleuring.

Uit de resulterende cDNA banken is vervolgens van een groot aantal klonen de DNA volgorde bepaald zodat een selectie van verschillende genen op de microarray geprint konden worden (hoofdstuk 3). Vervolgens is de microarray gebruikt om de genexpressie, de mate van ‘aan staan’ van deze geprinte genen, te analyseren.

De eerste analyse bestond uit een tijdreeks van champignons die 0, 1, 3 of 7 dagen in de koeling hadden gestaan. Hieruit konden genen geselecteerd worden die betrokken zijn bij de kwaliteitsvermindering tijdens een dergelijke bewaring (hoofdstuk 4).

Daarnaast is de genexpressie geanalyseerd van verschillende batches champignons (hoofdstuk 2) waarbij de genexpressie op dag 0 gecorreleerd kon worden aan de kwaliteit van die zelfde batch na 7 dagen bewaring. Uit de data analyse van deze twee sets hybridisatie-experimenten kunnen

genen geselecteerd worden die interessante kandidaat indicator genen zijn voor de verkleuring van champignons (hoofdstuk 5).

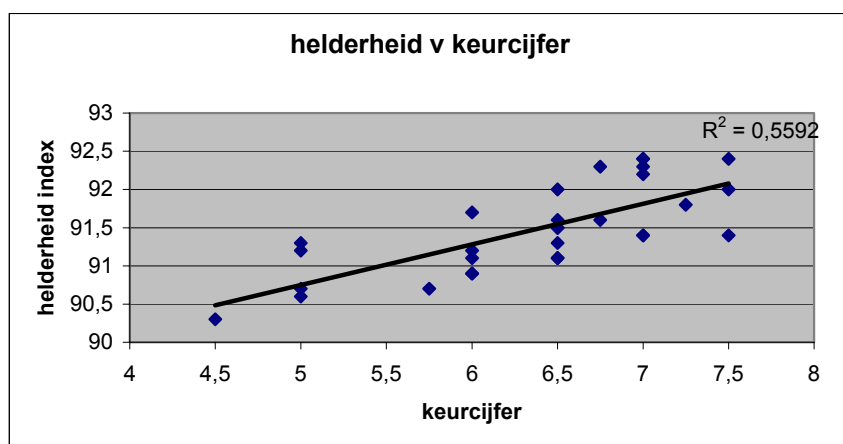
Op basis van de data-analyse van het eerste microarray-experiment, de tijdreeks, is een zestal genen geselecteerd. De expressie van deze genen zoals gevonden met behulp van microarray analyse is gevalideerd met een andere methode, een Real-Time PCR gebaseerde methode. Mogelijk zou deze PCR-methode, als een eerste stap naar een kwaliteitstoets, gebruikt kunnen worden om genexpressie te meten. De resultaten van de Real-Time PCR-experimenten worden beschreven in hoofdstuk 6.

De resultaten die in dit rapport worden beschreven kunnen mogelijk aanleiding geven, na verificatie van genexpressie en correlatie met de kwaliteitseigenschappen en voorspelling daarvan, tot het patenteren van deze genen voor deze toepassing. Hierbij is het belangrijk dat de hier besproken resultaten vertrouwelijk worden behandeld. Als openbaar rapport zullen daarom enkele teksten met verwijzingen naar genen en figuren aangepast worden.

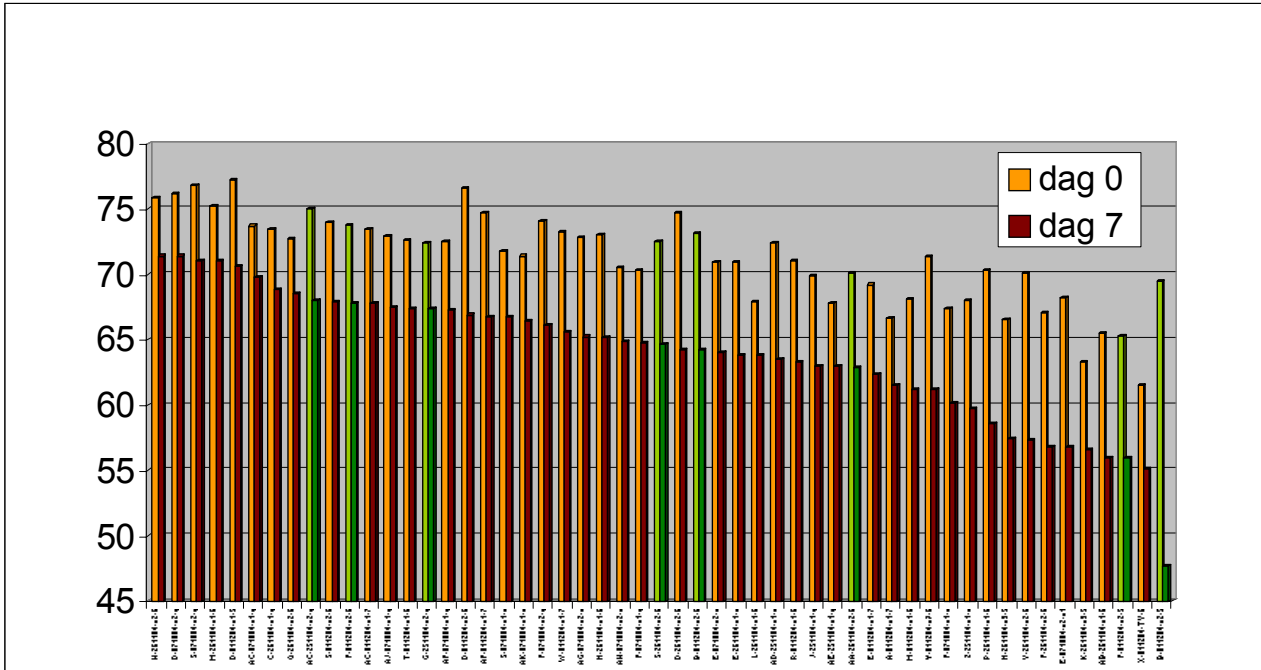
## 2 Monsters uit de praktijk

Een cruciaal onderdeel van het project zijn de monsters die met behulp van de microarray techniek onderzocht zullen worden op genexpressie. Deze monsters moeten namelijk een betrouwbaar beeld geven van wat er in de praktijk afspeelt. Ideaal zou zijn om partijen champignons te hebben met initieel gelijke kwaliteit, van hetzelfde ras en dezelfde vlucht, gelijke behandeling vanaf de pluk tot de eerste keuring of meting die vervolgens onder gelijke bewaarcondities een uiteenlopende bewaarkwaliteit laten zien. Met dergelijke monsters kunnen we op zoek gaan naar verschillen in genexpressie, tussen de partijen op het moment van de eerste keuring, om deze genexpressie te correleren aan de bewaarkwaliteit.

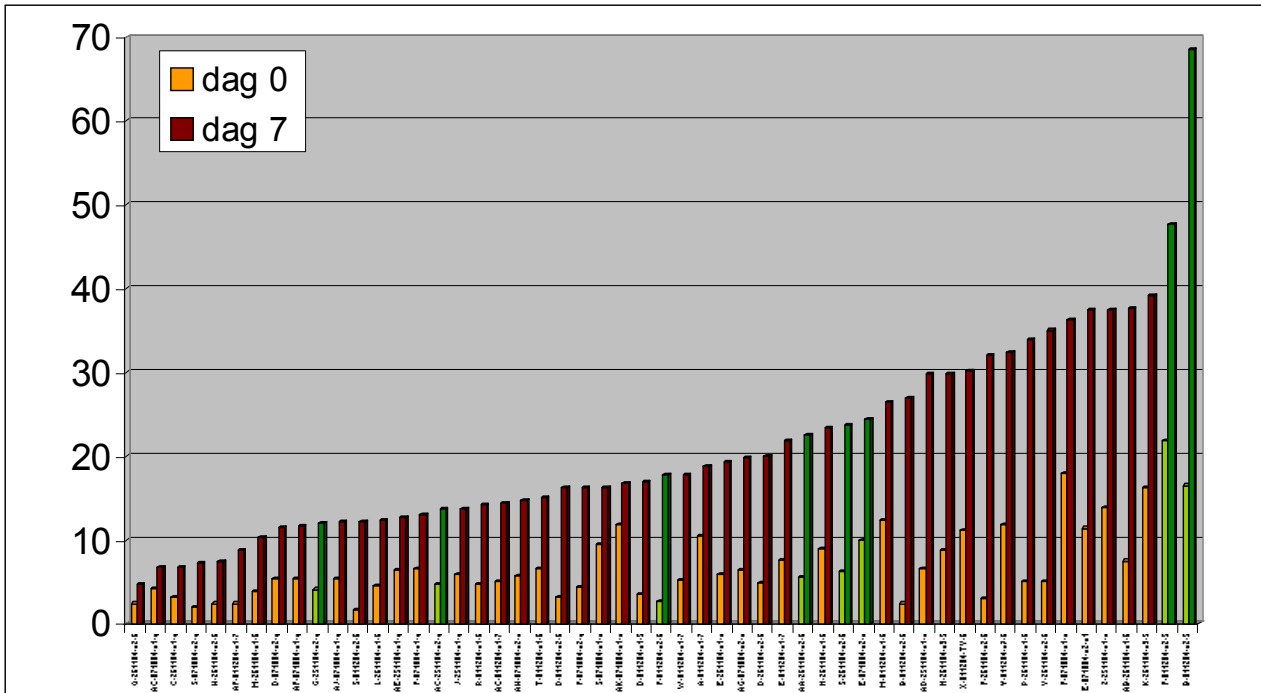
Om de juiste monsters in handen te krijgen is contact gezocht met de Greenery (Peter van Hapert) en zijn diverse partijen bemonsterd. Eerst is gewerkt met partijen die de Greenery gelijktijdig onderzocht in houdbaarheidsproeven. Aangezien deze proeven slechts 4 dagen werden uitgevoerd en in deze partijen de verschillen niet al te groot waren hebben we gekozen om nieuwe partijen 7 dagen te bewaren bij PPO. Deze random bemonsteringen zijn uitgevoerd in oktober, november en december 2004. De partijen zijn na monsternamen bij de Greenery onmiddellijk ingevroren in vloeibaar stikstof (om de genexpressie snel te fixeren) en een gedeelte van dezelfde partij is gekoeld vervoerd naar PPO voor computer beeld analyse (CBA) aan het begin en aan het eind van de 7 daagse bewaarperiode bij 2°C. Tevens is van deze monsters op het moment van binnenkomst bij de Greenery een keurcijfer bepaald door de keurmeester van de Greenery. Bij de bepaling van het keurcijfer door de Greenery worden meer kenmerken meegenomen dan verkleuring. Kenmerken als mate van waterstelen en kwaliteitsortering (gebaseerd op ontwikkelingsstadium) vormen ook een onderdeel van de beoordeling. Dat betekent dat de eindbeoordeling door de Greenery niet direct gecorreleerd is met de CBA analyses. Bij de Greenery werd kleur alleen geclassificeerd in wit, crème en lichtbruin. CBA analyse kan deze classificatie kwantificeren in een continue verdeling met betrouwbare waarden.



Figuur 1. Correlatie tussen helderheid gemeten met CBA en algemeen keurcijfer gegeven door keurmeester van Greenery op gehele uiterlijk van de partij.



Figuur 2. Witheid index van 53 champignonbatches gemeten op dag 0 en na 7 dagen bewaring bij 2 °C (sommige waren de middag daarvoor aangevoerd en hebben extra nacht koeling gehad). De groen gekleurde bars zijn de partijen geselecteerd voor microarray experimenten.



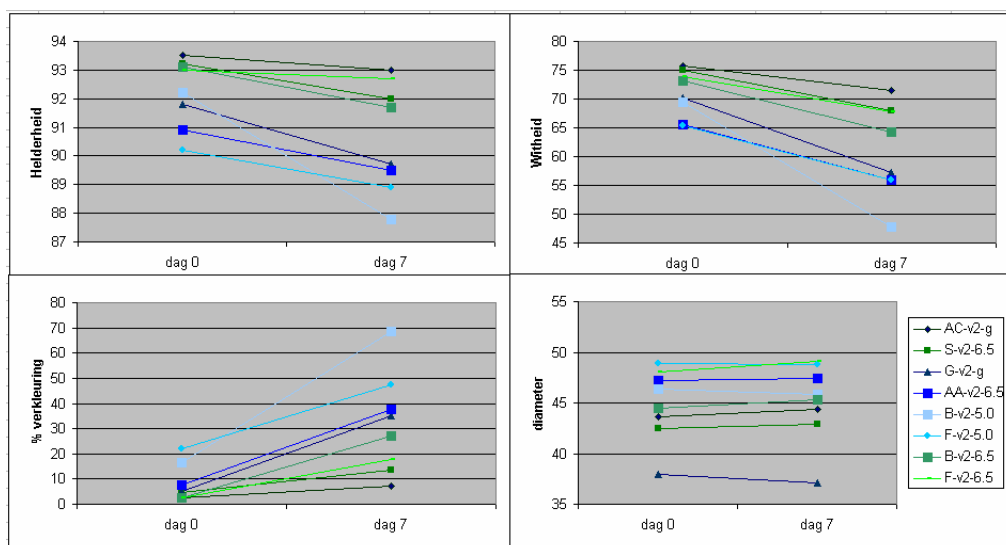
Figuur 3. Percentage verkleuring van 53 champignonbatches gemeten op dag 0 en na 7 dagen bewaring bij 2 °C (sommige waren de middag daarvoor aangevoerd en hebben extra nacht koeling gehad). De groen gekleurde bars zijn de partijen geselecteerd voor microarray experimenten.



Er is gekozen voor de CBA analyse omdat die methode te iken is en daarmee een gestandaardiseerde bepaling. Hierdoor worden mogelijke variabele in het detecteren van de kwaliteit onafhankelijk van andere omstandigheden waaronder de keuring gedaan wordt (denk bv aan type licht in de koelcel) en tevens keuringsmeester onafhankelijk. Uit vorige proeven bij PPO, en uit de eerste analyses uitgevoerd binnen dit project, was reeds gebleken dat kleur een van de belangrijkste aan type licht in de koelcel) en tevens keuringsmeester onafhankelijk. Uit vorige proeven bij PPO, en uit de eerste analyses uitgevoerd binnen dit project, was reeds gebleken dat kleur een van de belangrijkste kwaliteitsfactoren was en dat helderheid of witheid index die het best benaderde (zie figuur 1).

Totaal zijn 53 batches op deze manier verzameld, bewaard en met CBA geanalyseerd. Het betreft hier willekeurige monsters die op dat ogenblik bij de Greenery vers werden aangevoerd (Nederlandse kwekers) en zijn dus niet geselecteerd op basis van partijen met verdachte kwaliteit. Enkele partijen waren een dag daarvoor al aangevoerd bij de Greenery maar konden die dag niet meer verwerkt worden. Ook van deze batches zijn enkele monsters meegenomen en op dezelfde manier geanalyseerd als de vers aangevoerde monsters. In figuur 2 en 3 staat de witheid index en verkleuring van de partijen op dag 0 en dag 7. Na sortering op CBA waarden gemeten op dag 7 is er enigszins een correlatie te zien tussen CBA op dag 0 en dag 7 maar is ook te zien dat sommige partijen hiervan afwijken.

Hoedmaat en sortering vielen alle in klasse 1. Binnen klasse 1 zitten echter ons inziens nog redelijke grote verschillen zodat we genoodzaakt waren monsters verder te selecteren op zoveel mogelijke gelijke eigenschappen. Op basis van deze eigenschappen zoals hoedmaat (zoveel mogelijk gelijk), sortering (niet te onregelmatig) en vlucht (gelijk), ras en verloop in CBA waarden zijn een 8-tal partijen geselecteerd voor microarray analyse (de groen gekleurde bars in figuur 2 en 3 en tevens gezamenlijk weergegeven in figuur 4). De batches zijn alle afkomstig van een tweede vlucht en hebben een gemiddelde hoedmaat die niet meer groeide tijdens de bewaring.



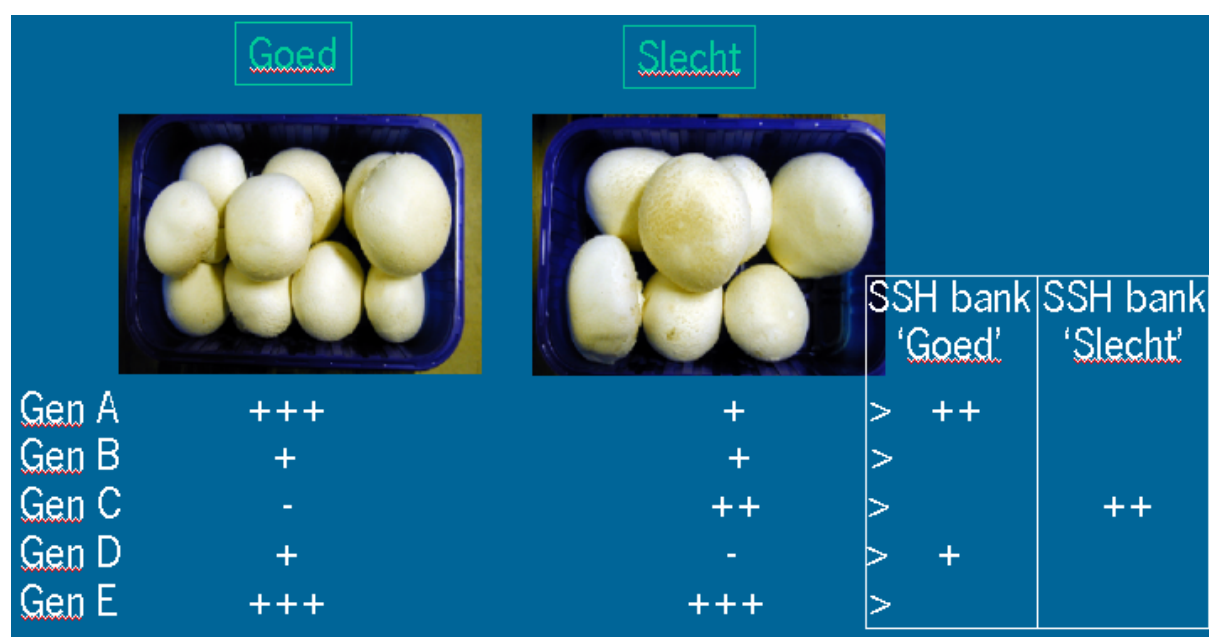
Figuur 4. Kwaliteitsverloop gemeten met CBA van 8 van de geselecteerd partijen voor de microarray analyse



### 3 Maken van de microarray

#### 3.1 Genen uit de subtractie banken

De microarray zoals wij die willen gebruiken zal moeten bestaan uit DNA fragmenten van champignon die afkomstig zijn van genen die 'aan staan' tijdens de naogst fase. Om dit op een zo efficiënt mogelijk manier voor elkaar te krijgen zijn 2 banken (SSH, subtractie banken) gemaakt waarbij verrijkt is voor genen die 'aan staan' in een goede partij champignons en die juist 'uit staan' in een slechte batch champignons en omgekeerd (slecht min goed). Beide banken zijn gemaakt zoals beschreven in het eerste halfjaarverslag en schematisch weergegevens in figuur 5.



Figuur 5. Schematisch overzicht van de verrijgingsprocedure voor het maken van SSH banken.

Om te weten te komen welke genen actief zijn en om er voor te zorgen dat niet te vaak hetzelfde gen op de array komt te staan zijn vele fragmenten gesequenced (DNA volgorde bepalen). Van 672 fragmenten uit een 'slechte' bank en 576 uit de 'goede' bank is de DNA volgorde bepaald. Na contig analyse (het zoeken naar identieke of overlappende sequenties) bleken er 687 unieke fragmenten te zijn die alle 1 of meerdere keren op de array zijn geprint. Om foutloos alle geselecteerde fragmenten te verzamelen in nieuwe platen om ze vervolgens te vermenigvuldigen (amplificeren, omdat je grote hoeveelheden nodig hebt om op de array te spotten) is software ontwikkeld die ons aan de hand van mallen heeft geholpen met deze werkzaamheden (zie tweede halfjaar verslag). Naast deze contig analyse is er ook een BlastX analyse uitgevoerd. Dit betekent dat de gevonden sequenties (DNA volgorde) vergeleken is met sequenties die al in publieke databases zitten. Bij vele van die sequenties zijn namelijk ook al biologische functies omschreven. Heeft een sequenties afkomstig van *Agaricus bisporus* heel veel overeenkomsten met een gen dat al beschreven is in de database, waar ook al de functie van bekend is, dan geeft dat een beetje

houvast als expressie data van die genen geanalyseerd worden. Van een aantal huishoudgenen is namelijk bekend dat ze vrij constant tot expressie komen, terwijl van andere misschien al bekend is dat ze juist gerelateerd zijn aan de groeiontwikkeling of iets dergelijks. Als veronderstelde biologische functie en genexpressie overeenkomen geeft dat een positieve ondersteuning bij de analyses, maar deze zullen niet als doorslaggevend worden beschouwd. Genen die op elkaar lijken kunnen toch hele andere functies hebben.

Uit onze BASTX analyse bleek dat er weinig genen in de database zitten die lijken op de genen van *Agaricus bisporus*, waarschijnlijk omdat er nog van weinig schimmels het genoom bepaald is en al helemaal weinig van schimmels die vruchtlichamen maken. Daarbij staan paddestoelen toch erg ver evolutionair af van plant en dier. Bij slechts 10% van de genen op de microarray kan dan ook maar met enige zekerheid gezegd worden welke biologische functie ze zouden kunnen hebben. Onder de genen die wel overeenkomsten vertonen met bekende genen zitten zeer interessante genen waarbij een rol bij veroudering bedacht kan worden zoals: tyrosinases, ubiquitin hydrolases, chitin synthase, chitinases, heat shock proteins,  $\beta$ -(1-6) glucan synthases, ABC transporters, cytochrome P450's, phosphatases en kinases, permease, glutathion S transferase, cellulase, metacaspase en vele andere. Een interessante collectie van genen die we dus op de microarray hebben geprint om de expressiepatronen van deze genen te analyseren.

### 3.2 Overige genen op de microarray

De samenstelling van de microarray bepaalt in grote mate het succes van de benadering. Het liefst heb je zoveel mogelijk genen op de array staan omdat alleen deze geëvalueerd worden als mogelijke interessante indicatoren. De financiën bepalen echter hoe groot de array maximaal kan worden, de DNA fragmenten die we vinden in de bank bepalen vervolgens wat we op de array aan genen kunnen zetten. Naast de genen die we gevonden hebben in onze subtractiebanken hebben we de literatuur en contacten geraadpleegd om de verzameling verder uit te breiden met potentiële kandidaatgenen.

In de database vonden we negentien genen die geassocieerd kunnen worden met postharvest kwaliteit van champignons (Eastwood et al. 2001, Mycol Res 105:1223-1230). Geen van deze gensequenties bleken in onze subtractie bank te vinden. Dit hoeft niet te betekenen dat ze er ook niet in aanwezig waren omdat vaak maar kleine stukjes van een gen bekend zijn. Het kan dus zijn dat wij een ander stuk hebben van het onvolledige gen dan dat nu in de database staat. Deze 19 Post Harvest clonen (PH1-19) zijn geamplificeerd en ook op de array geprint.

Naast deze genen zijn ook genen op de array gezet die afkomstig zijn van eerder onderzoek uitgevoerd op A&F waaronder twee tyrosinases (PPO1 en 2), twee  $\beta$ -(1-6)-glucanases (AbEXG1 en 2), een mannitol dehydrogenase en een controlegen in de vorm van glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

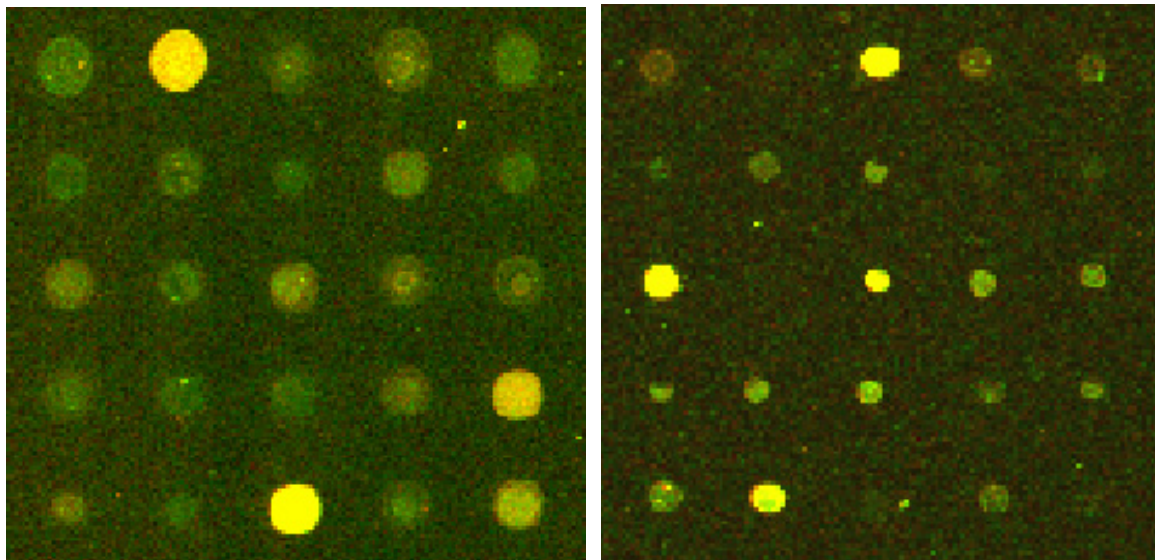
Op de Universiteit van Nijmegen, in de groep van Op den Camp, is voorheen ook aan de champignon gewerkt. Zij hebben voornamelijk onderzoek gedaan naar het gebruik van verschillende stikstofbronnen als voeding. Uit dit onderzoek zijn ook een aantal interessante genen gekomen die mogelijk belangrijk zijn voor de post-harvest kwaliteit. Deze tien extra genen,

waaronder urease, arginase en aspartate transaminase zijn ook geamplificeerd en op de array meegeprint.

Aangezien er nog plaats op de array over was, omdat er in veelvoud van 384 geprint wordt, zijn er uit de 'goede' subtractie bank, waarin veel unieke gensequenties zaten nog eens 102 fragmenten op de array gezet die echter niet gesequenced waren. Als de genexpressie van deze klonen straks interessant blijken te zijn kan de sequentie alsnog bepaald worden voor verdere analyse.

### 3.3 Printen van de array

Na overleg met Isogen BV, zijn eerst enkele DNA oplossingen (in verschillende verdunningen) geprint op 2 verschillende type glaasjes. Daaruit bleek dat de oplossing waarin het DNA was opgelost verschillend kwaliteit spots gaven. Het type glaasje (coating) leek niet veel verschil te geven. De array werd vervolgens in de beste spotbuffer geprint op epoxy slides. Na hybridisatie van deze microarrays bleken de spots echter zeer klein, veel kleiner dan met de test-array en ook kleiner dan van een andere array van A&F die in dezelfde periode bij Isogen geprint is. Nadat enkele optimalisatie-experimenten geen verbeteringen van het hybridisatiesignaal gaven is gekozen om in samenwerking met Isogen nogmaals een test uit te voeren met andere type glasslides. Daaruit bleek dat de Corning slides de beste resultaten gaven met grootste, egaalste en meest ronde spots (zie figuur 6). De spotbuffer waar het DNA in oplost zat bleek prima resultaten te geven met dit type glaasje. Besloten is toen de array opnieuw te printen op deze Corning slides waarbij ook andere settings tijdens het printen (zoals RV, wassen en spotsnelheid) zo optimaal mogelijk zijn ingesteld. Gebruikgemaakt van ons eerder geoptimaliseerd standaard protocol bleken de eerste hybridisaties direct goede betrouwbare signalen op te leveren.



Figuur 6. Hybridisatie signaal van de microarray geprint op 2 verschillende glasslides. Links de eerste array geprint op Epoxy slides, Rechts de nieuwe array geprint op Corning slides.



## 4 Microarray analyse van bewaarreeks

Genen die betrokken zijn bij kwaliteitsvermindering tijdens bewaring zijn interessant als mogelijke targets voor het verbeteren van de kwaliteit van champignons. Stel dat er een bepaald gen sterk ‘aan gaat’ tijdens de bewaring dan zou dit gen te maken kunnen hebben met bijvoorbeeld de verkleuring van het monster tijdens deze bewaring. Of het ‘aan staan’ van dit gen de verkleuring veroorzaakt of volgt op het bruinverkleuringsproces is met deze techniek natuurlijk niet te achterhalen. Daarvoor is verder onderzoek nodig. Maar stel dat het een veroorzaker is dan zou gezocht kunnen worden naar rassen waarbij dit gen minder hard ‘aan staat’ of zelfs naar rassen waarbij dit gen afwezig of onwerkzaam is. Dat zou bijvoorbeeld een ras kunnen opleveren dat minder kneusgevoelig is en dus geschikter voor mechanische oogst. Een eerste verkenning van genen die een rol spelen tijdens de bewaring kan daarom interessante genen en daarmee nieuwe hypothesen opleveren.

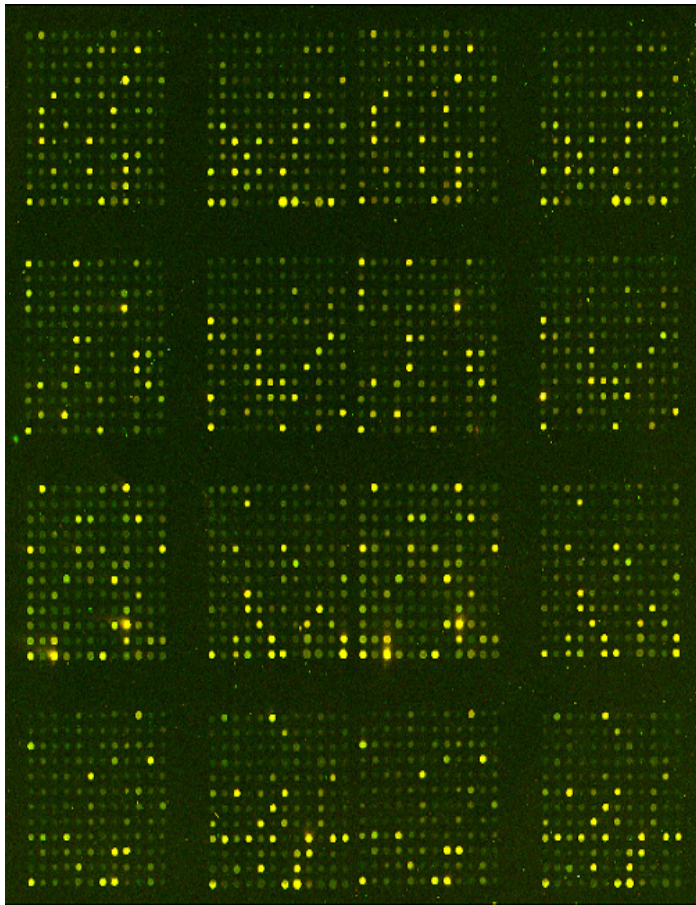
Een tweede reden voor het analyseren van een tijdreeks is dat mogelijk dezelfde genen die betrokken zijn bij kwaliteitsverslechtering tijdens bewaring ook indicatoren zijn voor het verloop van de kwaliteit vlak na de oogst. Zo zouden genen die tijdens de bewaring altijd ‘aan gaan’ op dag 0 al direct na de oogst een verschil in expressie kunnen vertonen tussen partijen die snel in kwaliteit achteruitgaan en partijen die langer goed blijven. Dit soort genen geven dus vroegtijdig aan of een partij vlak na de oogst al aan het verouderen is.

Vanwege deze redenen is gekozen om een bewaarreeks te analyseren van een batch champignons die bij 2°C is bewaard. De partij is afkomstig van de Greenery en kreeg bij binnenkomst kwaliteitkeurcijfer 6. De partij is gekoeld vervoerd naar PPO waar CBA analyse is uitgevoerd en dezelfde champignons zijn ingevroren bij –80 °C. De rest van de partij is in een bewaarcel geplaatst bij 2 °C en 90% RV (instelling 100%). Elke meet dag (dag 1, 3 en 7) is een partij uit de koeling gehaald, gemeten met CBA en ingevroren in vloeibaar stikstof. In tabel 1 staan de CBA waarden van het betreffende monster. Uit de CBA analyse blijkt dat de helderheid (Lightness) en witheid index pas meetbaar veranderde op dag 7 terwijl de verkleuring al op een eerder tijdstip een opgaande lijn vertoont. Deze monsters zijn gebruikt voor microarray analyse waarbij elk monster in duplo is gehybridiseerd en elke hybridisatie een duplo bepaling heeft (zie figuur 7).

Datum	dagen bewaard	Lightness	Witheid index	%Verkleuring	Diam
200704	0	89.7	64.1	11.5	49.8
210704	1	89.7	63.7	14.7	49.4
230704	3	89.9	64.3	15.7	48.4
270704	7	88	58.6	41.2	47.9

Tabel 1. CBA waarden van de champignonmonsters gebruikt voor microarray analyse van de tijdreeks.





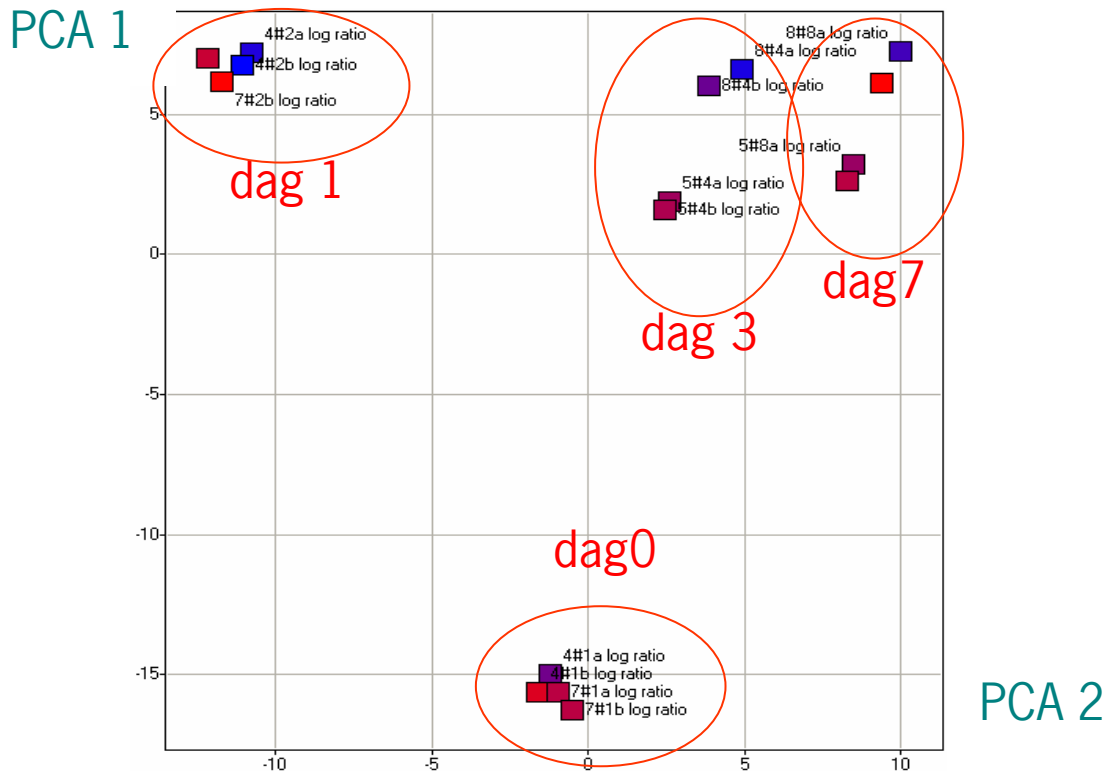
Figuur 7. Een voorbeeld van een microarray hybridisatie resultaat.

De hybridisatieresultaten zijn geanalyseerd met Principle Component Analysis (PCA). PCA is een veelgebruikte techniek in microarray onderzoek voor clusteranalyse. PCA is ontworpen om de variantie in een dataset te vatten in termen van principle components. Men probeert dan het aantal dimensies te reduceren om de belangrijkste componenten (verbanden) zichtbaar te maken en tegelijkertijd de achtergrond (ruis) te reduceren.

Een eerste globale analyse van de hybridisaties met PCA (figuur 8) leert ons dat de duplo bepalingen dicht bij elkaar vallen, aangevend dat de reproduceerbaarheid goed is. Daarnaast valt op dat dag 0 in de eerste PCA (uitgezet langs de verticale as) gescheiden wordt van de andere dagen wat betekent dat er veel veranderingen optreden in genexpressie na dag 0 tijdens bewaring bij 2°C. In de tweede PCA (uitgezet langs de horizontale as) zien we dan een soort reeks van de dagen in de bewaring waarbij dag 3 en 7 dicht bij elkaar vallen. Deze PCA zal dus voornamelijk beheerst worden door de verschillen in genexpressie die ontstaan tijdens de eerste dagen van de bewaring bij 2°C en geven aan dat de veranderingen in genexpressie later (tussen dag 3 en 7) relatief minder groot zijn. Terwijl CBA analyse pas verschillen aangeeft tussen dag 3 en 7 toont genexpressie al veranderingen vanaf dag 0. Genexpressie toemt de metabolische veranderingen

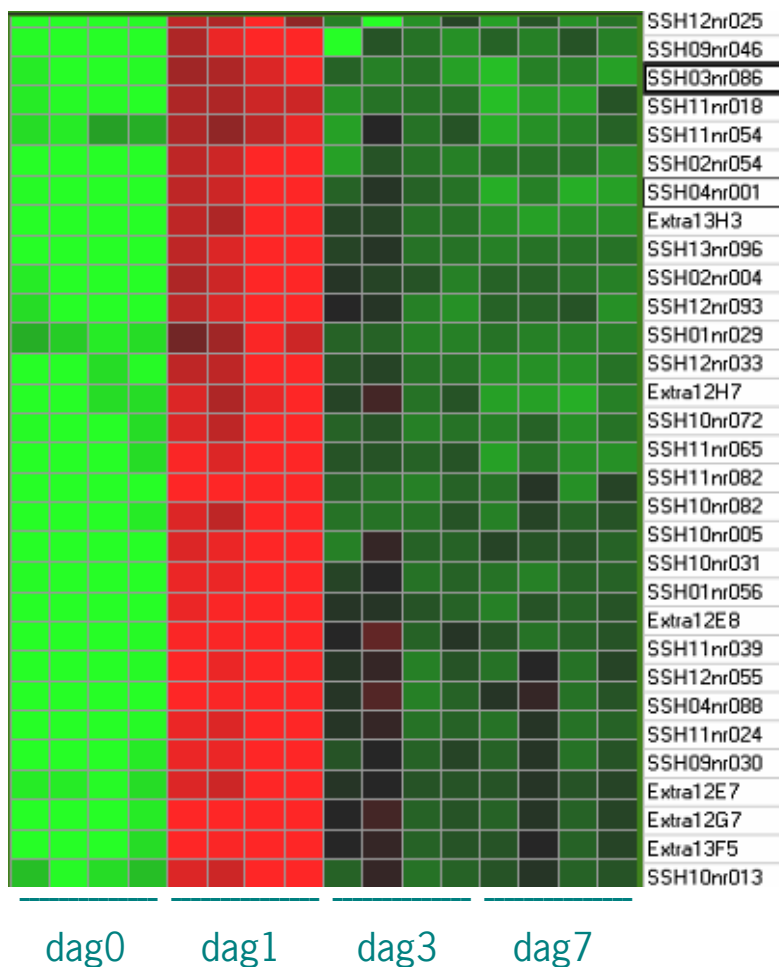


die plaatsvinden in dit weefsel die al voornamelijk tijdens de eerder fase optreden. We kunnen dus wel stellen dat genexpressie een veel dynamischer beeld geeft van het product.



Figuur 8. Principal Component Analyse van de totale set aan hybridisaties uitgevoerd op de champignonmonsters die een bewaring van 0, 1, 3 of 7 dagen bij 2 °C hadden ondergaan.

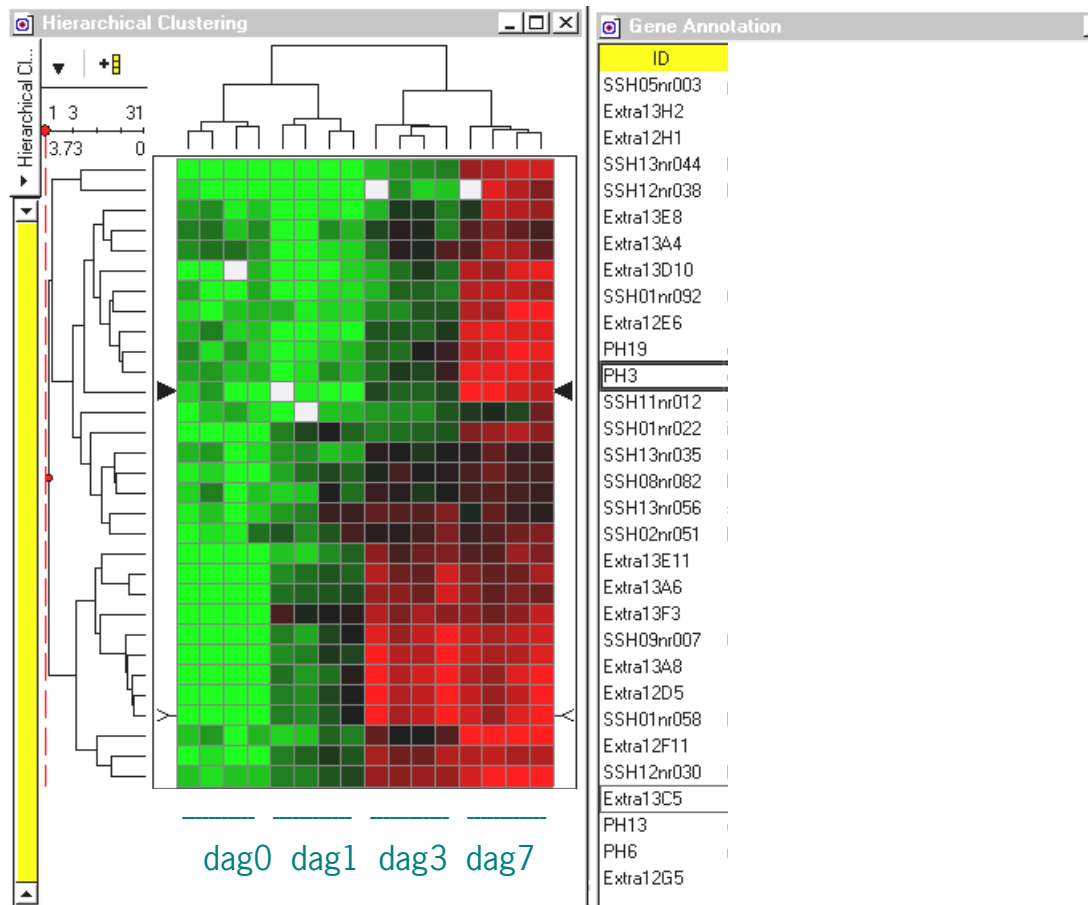
Als we vervolgens de genexpressie gaan analyseren, waarbij genen bij elkaar geclusterd worden (hierarchische clustering) die een zelfde tendens in genexpressie laten zien over de monsters, vallen de heatshock proteïnen meteen op (zie figuur 9). Deze genen stonden uit op dag 0 maar gaan hoog aan na 1 dag bewaring, waarna ze in de daarop volgende dagen weer bijna uit gaan. Dit heeft mogelijk te maken met de koude stress die ontstaat tijdens de bewaring. Als dit patroon een realistische weergave is van wat er gebeurt in de champignon (dus ook bij andere partijen) dan zouden dergelijke genen mogelijk gebruikt kunnen worden om vast te stellen of een partij vers gesneden is of toch al een dag in de koeling heeft gelegen. Als de expressie tevens gereguleerd zou worden door de koelingstemperatuur zou daarmee mogelijk een test ontwikkeld kunnen worden op de keten tussen oogst en aanleveren bij de handel.



Figuur 9. Hiërarchische cluster van genen tijdelijk up gereguleerd op dag 1. Log2ratio Groen = -3, rood = +3

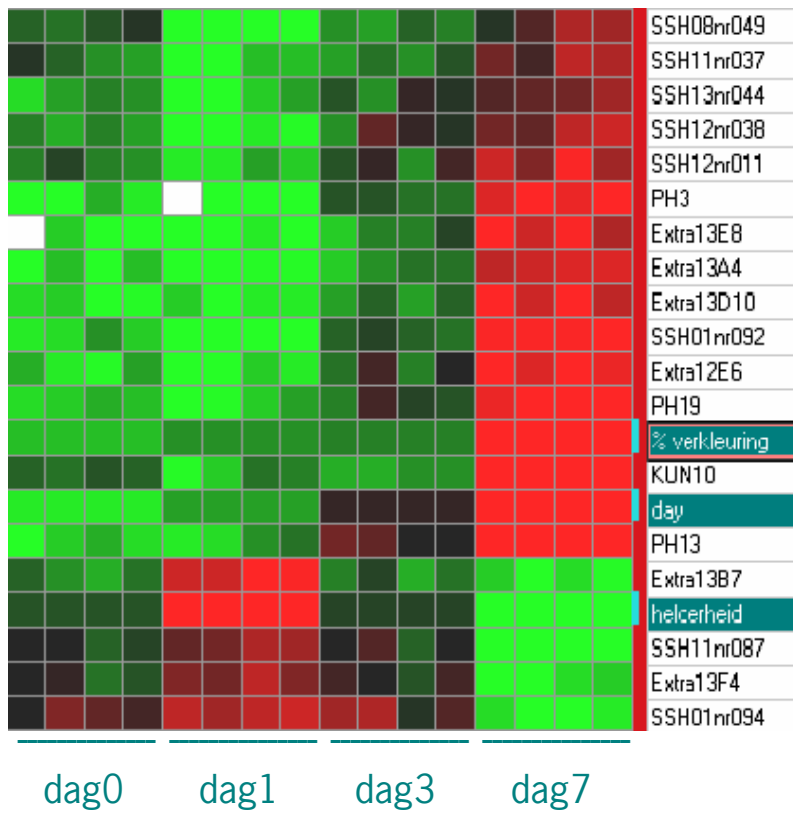
Naast het cluster van genen met gepiekte genexpressie laten veel genen een globalere ‘aan’ of ‘uit’ gaande tendens zien. Daarin zijn verschillende typen expressies te onderscheiden zoals genen die snel de grootste sprong maken tussen dag 0 en 1 en dan redelijk gelijk blijven of die juist een opgaande of neergaande tendens laten zien over de hele reeks van dag 0 tot dag 7. Figuur 10 geeft een dergelijk cluster weer waarbij de genexpressie geleidelijk toeneemt naarmate de champignons langer bewaard werden. Hieronder zijn veel van de PH klonen die afkomstig zijn uit het artikel van Eastwood et al., 2001. Veel van de daarin beschreven genen die geselecteerd waren op basis van veranderende genexpressie tussen champignons die 3 dagen bij 18 °C waren bewaard komen ook tijdens onze bewaringsreeks bij 2 °C differentieel tot expressie. In het cluster is goed te zien dat overeenkomstige spots op de array (zoals bijvoorbeeld de glucan synthase genen) gelijke expressie tonen terwijl een ander glucan synthase gen SSH11nr061 (niet in dit cluster) een iets ander patroon laat zien. Net al bij de stressseiwitten geven deze clustering van identieke genen op de array dat de hybridisaties zeer betrouwbaar zijn verlopen. Dat niet identieke genen, die mogelijk wel een zelfde biologische functie hebben, verschillende expressie

laten zien klopt ook met de verwachtingen omdat elk gen zijn eigen promotor ('aan/ uit' schakelaar) heeft en dus een eigen expressiepatroon kan hebben.



Figuur 10. Cluster van genen met geleidelijke opgereguleerde gen expressie tijdens de bewaring. Log2ratio Groen = -3, gedimd, rood = +3, verhoogd

De kwaliteitswaarden die behoorden bij de verschillende monsters is mee te clusteren met de genexpressie. Hierdoor kan gezocht worden naar genen die het meest correleren met de verschillende eigenschappen. In figuur 11 zijn de eigenschappen 'dagen bewaring' (day), 'helderheid' en '% verkleuring' (allen in het groen gemarkeerd) met de genexpressie meegeclusterd. Deze analyse toont bijvoorbeeld een gen dat correleert met verkleuring. Samenvattend hebben deze analyses aangetoond dat de microarray hybridisaties reproduceerbaar zijn uitgevoerd en er veel verschil in genexpressie is te vinden tussen de monsters. De meest interessante zijn de stress eiwitten, genen betrokken bij de celwanden, suiker transport, enkele van de tyrosinase genen die op de array geprint waren en vele onbekende genen al dan niet gesequenced (zoals 13F3, 9.007, 9.042, 13A8 en 1.022).



Figuur 11. Cluster van genen met regulatie van gen expressie gerelateerd aan de kwaliteitskenmerken. Log2ratio Groen = -3, rood = +3

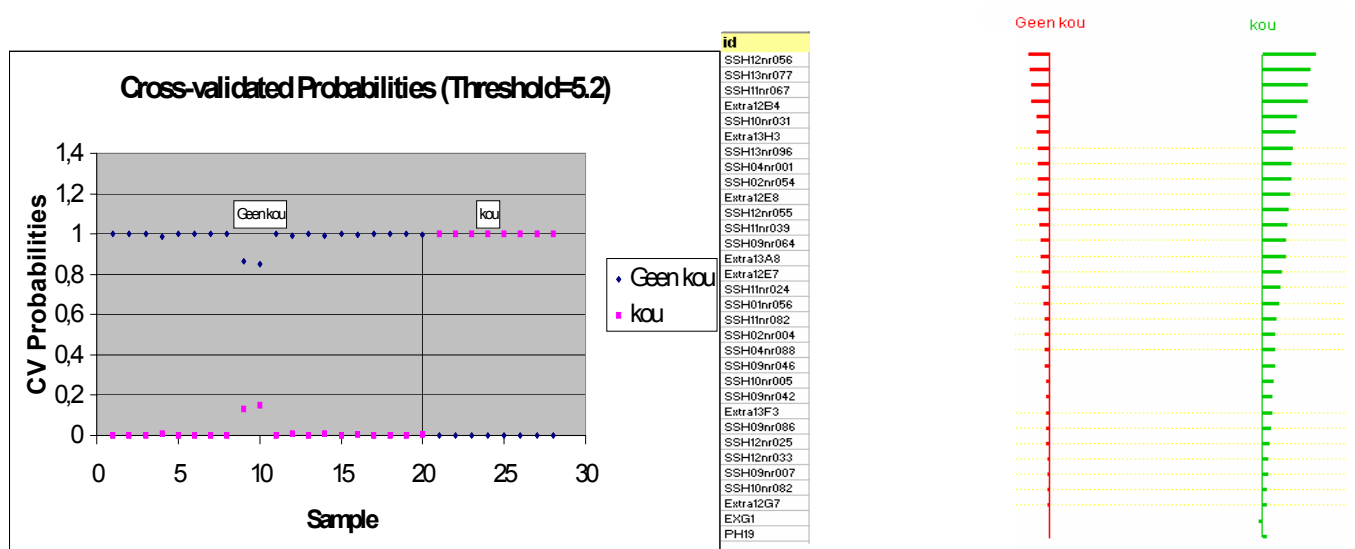
## 5 Microarray analyse van monsters met verschillende kwaliteitverloop

De champignonmonsters beschreven in hoofdstuk 2 hebben gediend als uitgangsmateriaal voor de microarray analyses die als doel hebben om genen te identificeren waarmee batches van champignons te voorspellen zijn op kwaliteit en houdbaarheid. De middels CBA analyse gemeten kwaliteitseigenschappen kleur (helderheid en witheidindex) en verkleuring zijn daarbij de kenmerken waarmee correlaties gezocht zullen worden. Hiertoe is RNA geïsoleerd van de acht omschreven monsters en zijn deze monsters in duplo geanalyseerd tegen een gemeenschappelijk referentie monsters. Ter herinnering nog even een korte omschrijving van de monsters:

- 1) Alle samples zijn afkomstig van de Greenery in de periode oktober-december 2004
- 2) Alle monsters zijn afkomstig van een tweede vlucht
- 3) Twee monsters hebben een nacht gekoeld gestaan voordat ze bemonsterd werden en de naooft bewaring in gingen (AC2511 en G2511)
- 4) Twee monster waren redelijk slecht (B0112-5,0 en F0112-5,0) terwijl van beide, op dezelfde dag, ook een partij werd aangevoerd van redelijk kwaliteit (B0112-6.5 en F0122-6.5)
- 5) Twee andere partijen waren van matige (AA-2611) tot redelijke (S2611) kwaliteit

Na standaard analyse van de microarray hybridisaties en een globale analyse van de resultaten is besloten om een enkele array in eerste instantie bij de analyses niet mee te nemen vanwege het afwijkende expressie patroon en de vele ontbrekende spots. Deze afwijkende patronen zien we helaas vaker bij uitgebreide microarray analyses en worden waarschijnlijk veroorzaakt door storende stoffen in labelings en of hybridisatie reacties. De overige arrays zijn op verschillende statistische manieren onderzocht op genen met correlerende expressie patronen met de kwaliteitseigenschappen.

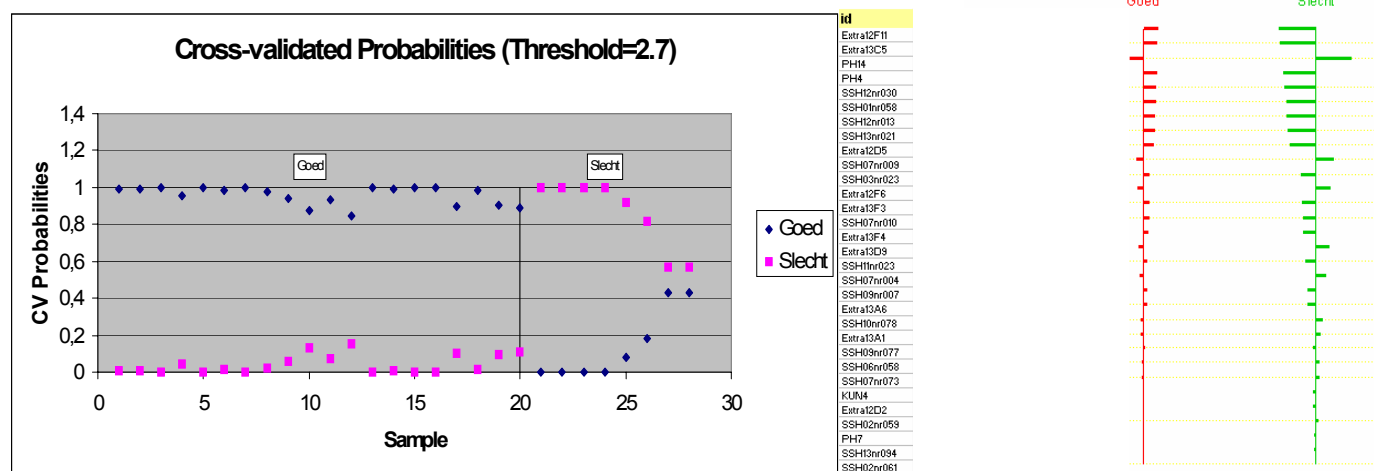
Wat meteen opvalt zijn de monsters die overnacht bewaard zijn geweest voordat ze zijn ingevroren en met de overige monsters de bewaarproeven in gingen. Een hele reeks van genen zijn bij deze monsters aangeschakeld die overeen komen met de dag 1 specifieke genen van de bewaarreeks (zie figuur 9). Een methode voor het analyseren van microarrays met als doel een meest indicatieve selectie van genen te selecteren voor een bepaalde eigenschap is de Predicted Analysis Microarray (PAM). Deze methode is ontwikkeld in het kankeronderzoek waarbij gezocht werd naar indicator genen voor het typeren van verschillende typen borstkanker. Bij deze methode classificeer je eerst zelf de arrays (in ons geval bijvoorbeeld de samples die kou hebben gehad en die dat niet hebben gehad). De software selecteert vervolgens de genen die de grootste expressie verschillen laten zien tussen beide klassen. Hierbij hangt betrouwbaarheid van de classificatie en het aantal genen die nodig zijn voor deze classificatie nauw samen. Figuur 12 geeft de analyse weer waarbij de batches zijn geclassificeerd naar wel of geen kou en hebben we de software zo ingesteld dat ongeveer 30 genen gebruikt mogen worden om voor classificatie.



Figuur 12. Probability score van batches met en zonder kou bij een threshold van 5.2 wat overeenkomt met de 30 genen in het rechter paneel.

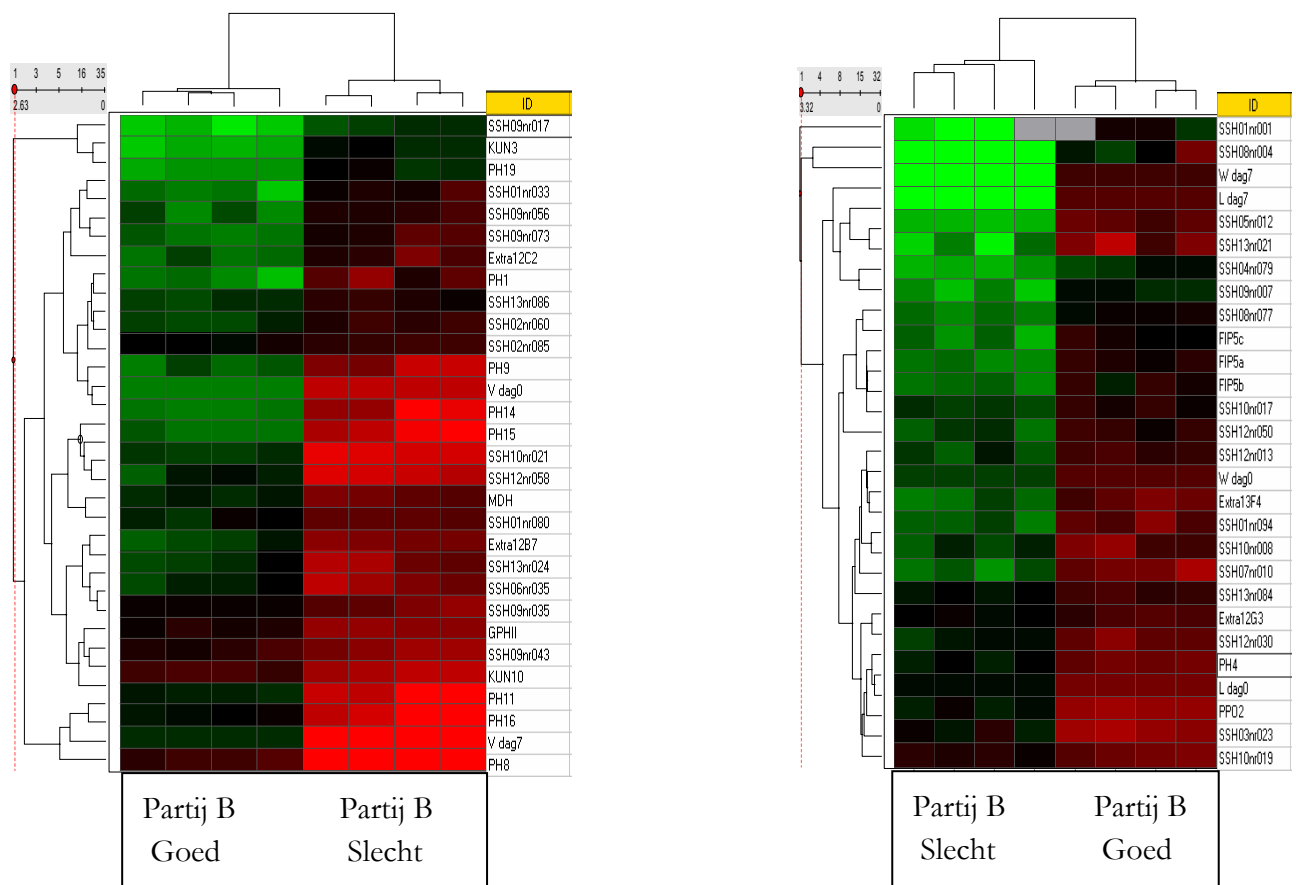
Te zien is dat alle batches met zeer hoge waarschijnlijkheid zijn in te delen (1 = maximale betrouwbaarheid) in de juiste klasse. De genen die gebruikt zijn voor het indelen van die beide klassen zijn te vinden in figuur 12, rechter paneel. Hieruit wordt duidelijk dat wederom de stressgenen en nu tevens de genen coderend voor suikertransporters de indicator genen zijn voor de gekregen koude behandeling. De rode en groene bars geven daarbij de richting aan van de expressie verschillen, een bar naar links betekent lagere expressie dan gemiddeld en naar rechts betekent een hogere expressie dan gemiddeld.

Op dezelfde wijze zijn ook de overige batches geanalyseerd maar nu geclassificeerd naar kwaliteit. Hierbij kunnen verschillende grove indelingen van de CBA analyses is gehanteerd. Zo zouden bijvoorbeeld de beide batches B0112-5.0 en F0112-5.0 als slecht geclassificeerd kunnen worden en de overige partijen (met of zonder kou) als goed (zie figuur 13).



Figuur 13. Probability score van de batches geclassificeerd als goed en slecht bij een drempel van 2.7 wat overeenkomt met de 30 genen in het rechter paneel.

Ook deze analyses leveren een acceptabele indeling van de monsters op. Alle monsters worden in de juiste klasse ingedeeld en de waarschijnlijkheid (probability) score is weer zeer hoog. Wat tevens positief is dat de genen die geselecteerd zijn om tot deze indeling van de klassen te komen grotendeels overeenkomen met de genen die eerder geïdentificeerd waren in de bewaarrange. Deze genen correleren dus tevens met kwaliteitverslechtering tijdens bewaring. Dit geeft dus aan dat genen die betrokken zijn bij verkleuring van champignons en bij alle partijen vroeg of laat aangaan tijdens de bewaring al verschillen vertonen in expressie op het moment dat de kleurverschillen nog niet of nauwelijks zichtbaar zijn.



Figuur 14. Selectie van genen met de grootste verschillen in genexpressie tussen de beide partijen B die gelijktijdig werden aan gevoerd bij de Greenery, afkomstig zijn van dezelfde teler en zelfde vlucht maar verschillen in CBA analyse.

De microarray data zijn ook op een andere manier te analyseren bijvoorbeeld door twee partijen die zeer op elkaar lijken van oorsprong maar wel verschillen in CBA analyse met elkaar te vergelijken. Dit kan door middel van een software programma genaamd Significant Analysis Microarray (SAM) dat alleen een tabel van meest significante genen produceert maar dit kan ook eenvoudig met de kleurbalkjes zichtbaar gemaakt worden zoals in figuur 14. In deze figuur zijn de beide partijen van teler B, die op hetzelfde moment bij de Greenery werden aangevoerd maar wel

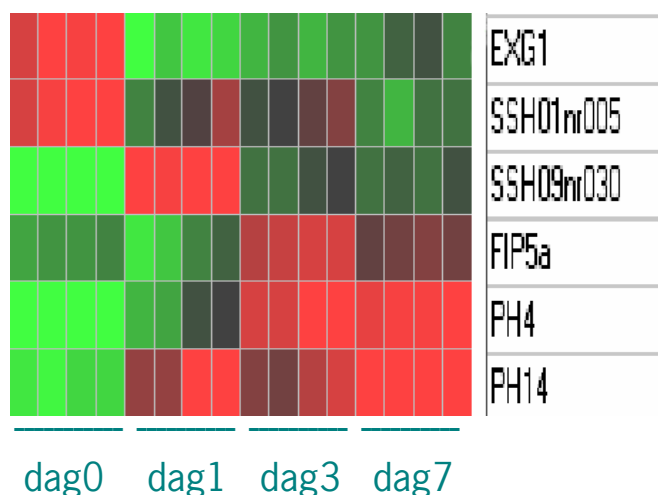
varieerde in CBA analyse op dag 0 en dag 7 met elkaar vergeleken. Bij de meest differentieel tot expressie komende genen zitten weer veel van de eerder geïdentificeerde genen die betrokken zijn bij bewaring en die hierboven bij de bredere vergelijking van goede en slechte partijen als meest indicatief geselecteerd waren. Veelal dezelfde genen zijn weer duidelijk aanwezig in deze geselecteerde genenset. Bij het vergelijken van de twee partijen afkomstig van teler F bleken toch weer andere genen juist differentieel tot expressie te komen dan bij de vergelijking van de partijen van teler B. Mogelijk dat er verschillende oorzaken kunnen zijn in de biologische achtergrond waarom partijen slecht houdbaar zijn.

Na een systematische analyse van de hybridisaties zijn we in staat om een selectie te maken van de meest informatieve genen die differentieel tot expressie tussen de verschillende goede en slechte batches. Deze selectie van potentiële kandidaatgenen zullen dan verder onderzocht moeten worden op hun correlatie met meerdere batches en hun waarde als voorspellers van de kwaliteit. Tevens bieden de genen en mogelijke bekende biologische functies aanknopingspunten voor verder onderzoek om tot betere rassen te komen.



## 6 Validatie microarray analyse

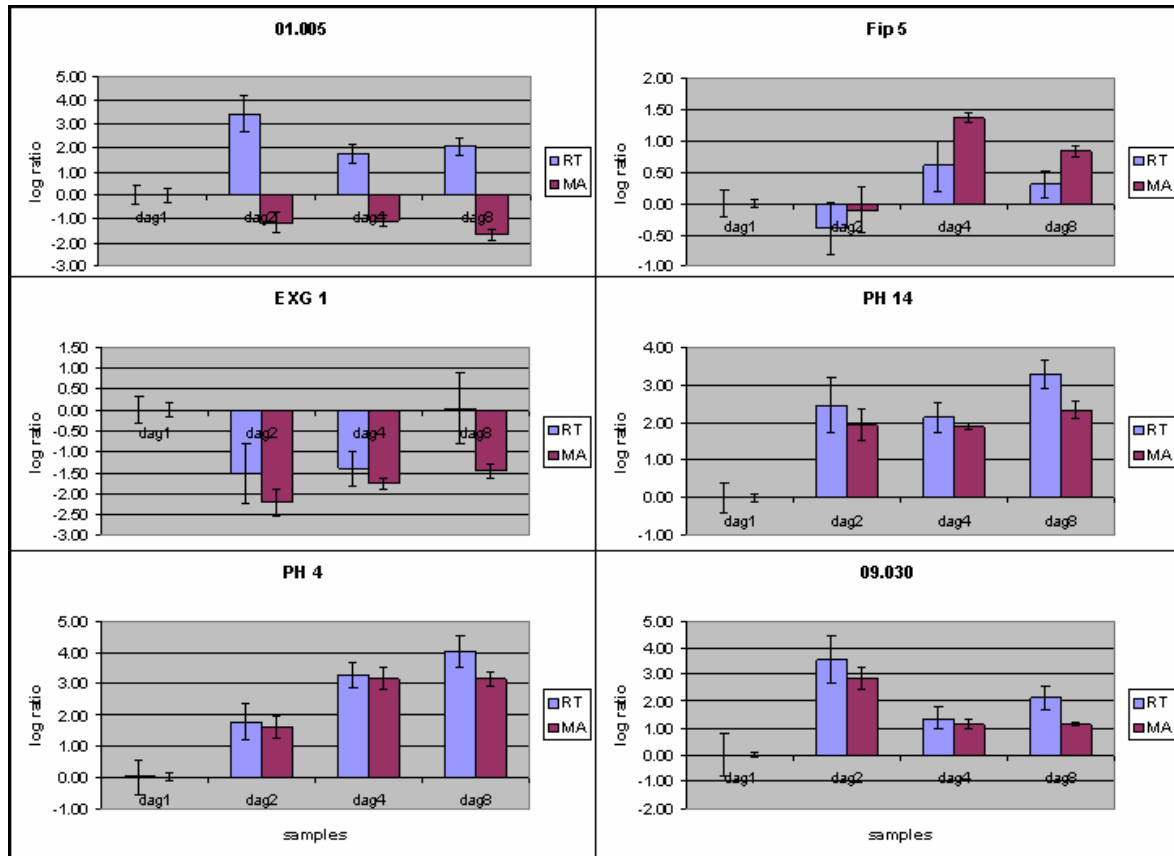
Microarray analyse, mits goed uitgevoerd, geeft een betrouwbaar beeld van de genexpressie van een groot aantal genen in een enkel experiment. Verschillende onderzoeken hebben echter uitgewezen dat er ook verschillen kunnen ontstaan tussen microarray gebaseerde genexpressie en andere methoden van detecteren van genexpressie zoals Northern blot analyse of kwantitatieve PCR (Real-Time PCR). De verschillen kunnen ontstaan omdat er meerdere genen in het genoom aanwezig kunnen die zeer sterk op elkaar lijken hierdoor kunnen soms iets verschillende genen toch aan dezelfde spot hybridiseren. Het signaal dat je dan detecteert is in een dergelijk geval eigenlijk een optelling van een aantal genen. Wanneer je de genexpressie van een dergelijk hybridisatie signaal wilt valideren met bijvoorbeeld Real-Time PCR, een methode die specifiek gemaakt kan worden voor één enkel gen uit een hele familie, kan dit andere resultaten opleveren. Andersom kan het ook zijn dat de primers voor de PCR juist in een geconserveerd gebied zijn gekozen maar dat de hybridisaties wel specifiek waren omdat omliggende sequenties wel uniek zijn. Uit eigen ervaring en uit vele publicaties blijkt echter dat microarray resultaten voor 90% overeenkomen met andere methoden van genexpressie analyse en dat deze alternatieve methoden de verschillen vaak nog iets extremer tot uiting komen.



Figuur 15. Microarray expressie data van de genen geselecteerd voor Real-Time PCR gebaseerde validatie. Gen expressie weergegeven als Log<sub>2</sub> ratio, groen = -2.5, rood = +2.5.

Aangezien dergelijke vergelijkende analyses tussen microarray en bijvoorbeeld Real-Time PCR nog nooit voor *Agaricus bisporus* uitgevoerd zijn leek het ons zinnig deze analyse vast op een kleine schaal uit te voeren. Om een indruk te krijgen of de genexpressie die we met microarray detecteren met hoge slagingspercentage kunnen omzetten in Real-Time PCR analyses (die snel en goedkoop zijn uit te voeren) zijn 6 genen geselecteerd voor validatie studie (zie figuur 16). Op basis van de gensequenties zijn primers ontwikkeld voor deze genen als ook voor GAPDH en 18S. Deze laatste twee genen zijn genen die in de meeste gevallen constant tot expressie

komen (ongeacht van weesfel of andere fysiologische verschillen) en daarmee gebruikt kunnen worden als interne standaard voor het corrigeren op verschillen in RNA concentratie en cDNA synthese.



Figuur 16. Vergelijk van microarray data (MA) en Real-Time PCR data (RT) van een zestal geselecteerde genen. Duidelijk is te zien dat bij de methoden goed overeenkomen voor een 5 tal genen. Uitzondering is 01.005, een tyrosinase gen.

In figuur 16 is te zien dat bij 5 van de 6 genen de microarray data overeenkomen met de Real-Time PCR data. Bij deze genen kloppen de tendensen zoals gevonden op basis van de microarray met die van de Real-Time data die zijn uitgevoerd op dezelfde bewaarreeks zoals beschreven in hoofdstuk 3. Slechts bij het tyrosinase gen SSH1nr005 blijkt de correlatie niet op te gaan, en lijkt de expressie gemeten met Real-Time PCR juist tegenovergesteld aan de met de microarray gemeten genexpressie. Bij SSH1nr005 zouden we dus met een genfamilie te maken kunnen hebben waarbij we met Real-Time een andere homolog detecteren dan met de microarray. Of vindt het processen van DNA naar RNA naar eiwit op een iets andere manier plaats dan bij de meeste andere genen.

In het algemeen kan gezegd worden dat kandidaatgenen met een redelijke hoge slaagkans omgezet kunnen worden in een snelle detectie methode.

## 7 Conclusies

Het doel van het door Productschap Tuinbouw gefinancierde onderzoek naar kwaliteitsdiagnostisch onderzoek bij champignon is het vinden van indicatoren voor de bewaarkwaliteit. Tot op heden is er voor de champignonbranche nog geen goede voorspel methodiek ontwikkeld waarmee deze kwaliteit op een betrouwbare manier is te bepalen. Computer Beeld Analyse kan de witheid en verkleuring van champignons op een standaardmanier bepalen maar geeft slechts een indruk van het product op het moment van meten. Als alle partijen een gelijke afname in kwaliteit zouden laten zien, die samenhangt met de beginkleur die door middel van CBA of het oog bepaald kan worden, zouden voorspellingstoetsen niet nodig zijn. De werkelijkheid leert echter dat partijen die bij aanvoer een gelijke kwaliteit hebben later een nogal verschillend kwaliteitsverloop kunnen vertonen. Dit probleem heeft zich het afgelopen jaar meerdere keren voorgedaan bij de Greenery, met zowel partijen uit Polen als uit Nederland. Partijen die met een zelfde kwaliteit binnenkomen en tijdens bewaring bij de handel of verder in de keten zéér grote verschillen laten zien zijn juist de partijen die voor de ontwikkeling van houdbaarheidsvoorspellende methoden van groot belang zijn. Het is echter niet te voorspellen of en wanneer dergelijke partijen binnenkomen. Uiteindelijk zijn we genoodzaakt geweest om 53 partijen op drie willekeurige dagen aangevoerd bij de Greenery te bemonsterd. Deze partijen gaven onderling wel enig verschil te zien in kwaliteitsverloop maar dit waren niet de verschillen die nu de grootste problemen geven.

Voor dit project zijn we dus gedwongen geweest om random te monstren. De kwaliteitsmeting met CBA geeft enkel een verloop weer van kleur en verkleuring en zal grotendeels overeenkomen met wat de consument waarneemt. Dit project heeft duidelijk aangetoond dat CBA analyse niet zo onderscheidend werkt als genexpressie analyse. Met CBA niet of nauwelijks waarneembare kwaliteitsachteruitgang geeft vaak wel heel veel verschil in genexpressie. Dat valt vooral op tijdens de eerste dagen van bewaring. Het meest aansprekend zijn misschien genen die aangeschakeld worden tijdens koeling. Naast de beoogde kwaliteitsindicatoren voor bewaring zouden deze koude-inductie genen mogelijk ook interessante indicatoren kunnen zijn van de verkregen voorbehandeling. Bij aanvoer zou gemeten kunnen worden of de champignons voldoende zijn gekoeld na de oogst.

We hebben geprobeerd om voor dit project champignonmonsters te nemen die een gelijke kwaliteit hebben bij binnenkomst en grote verschillen tonen na bewaring. Zoals gezegd bleek dat moeilijk te realiseren omdat de aanvoer van dergelijke partijen niet is te voorspellen. De uiteindelijke geselecteerd batches hebben geen exact identieke kwaliteit gehad bij binnenkomst. Het is daarom niet helemaal uit te sluiten dat deze verschillen een invloed hebben gehad op de uiteindelijke selectie van indicatorgenen. Wanneer betere batches voorhanden komen zou microarray analyse van dergelijke partijen kunnen bijdrage aan een betere en mogelijk meer relevante selectie van kandidaatgenen. Een andere benadering zou zijn om de op basis van de hier uitgevoerde experimenten kandidaatgenen te selecteren en de expressie van deze genen vervolgens te analyseren bij meerdere partijen. Correlaties tussen de expressie van de

kandidaatgenen en de aanvoerskwaliteit en houdbaarheid zal vervolgens uitsluitend moeten geven welke genen het meest indicatief zijn.

Bij de keuze van de samples voor de microarray analyses zijn zoveel mogelijk factoren, die een invloed op genexpressie kunnen hebben maar niet gerelateerd zijn aan kwaliteit, gelijkgehouden (alle monsters van dezelfde vlucht, zelfde ras, zelfde dag aangeleverd bij handel etc.). De analyses hebben duidelijk genen geïdentificeerd die goed correleren met kwaliteitsverloop. Door de beperkte aantal hybridisaties die we hebben kunnen doen weten we dus niet in hoeverre die nu vermeden factoren invloed op de genexpressie van de kandidaatgenen kunnen hebben. Ook hiervoor zullen dus meerdere batches (andere vluchten etc) vergeleken moeten worden op genexpressie van deze kandidaatgenen om tot concluderende uitspraken te komen.

Op basis van de nu uitgevoerde hybridisaties kunnen we 30 tot 35 genen selecteren die potentiële kandidaten zijn voor kwaliteitsvoorspelling. Van een aantal van deze genen is de biologische rol bekend en het is goed voor te stellen dat dit inderdaad met kwaliteitsverloop heeft te maken. Dit zijn genen die een rol spelen bij fenoloxidasen, celwandsynthese en/ of afbraak en genen waarvan Eastwood en collegae heeft aangetoond dat ze bij veroudering een rol spelen. Dat onderstreept de betrouwbaarheid/ bruikbaarheid van de methode. Erg intrigerend zijn uiteraard de genen waarvan we niet weten wat de biologische functie is omdat er geen vergelijkbare sequenties in publieke databases is gevonden. Expressie-analyse in meerdere monsters zal moeten aantonen hoe goed deze te gebruiken zijn voor kwaliteitsvoorspelling. Interessant is ook om te kijken of er kandidaatgenen zijn die te maken hebben met kneusgevoeligheid (belangrijk voor mechanische oogst voor de versmarkt).

De vertragingen die dit project heeft opgelopen heeft een aantal oorzaken. De opzet was om de monsters te gebruiken van de bewaarproeven van de Greenery. Door de verhuizing van de Greenery liep dat vertraging op. Uiteindelijk hebben we monsters at random genomen en over een langere periode bewaard dan de 4 dagen die de Greenery aanhoudt. Dat kon niet bij de Greenery worden uitgevoerd en is dus bij PPO gedaan. Desalniettemin heeft dit onderzoek de verwachte resultaten opgeleverd namelijk kandidaatindicator genen voor het voorspellen van de bewaarkwaliteit. Helaas moeten we daarbij natuurlijk concluderen dat we er met kandidaatgenen nog niet een toets hebben. Daarvoor is vervolgonderzoek nodig die in het kort in hoofdstuk 8 besproken worden.

## 8 Vervolgtraject

Het vervolgonderzoek kan in een aantal sequentiële stappen uitgevoerd worden.

1. Uitbreiding van de microarray analysis
  - a. Bemonsterde samples, bijvoorbeeld andere vluchten
  - b. Nieuwe extremere monsters
  - c. Eindselectie van kandidaatsindicator genen
2. Verificatie van de kandidaatsindicator genen met behulp van RealTime PCR
  - a. DNA volgorde bepalen van de kandidaatgenen die nog niet waren gesequenced
  - b. Selectie van genen die geschikt zijn en zelfde correlatie geven als microarray resultaten.
  - c. Mogelijk stap maken naar ander medium high throughput methode van detectie van gen expressie zoals in ontwikkeling bij KeyGene
3. Doorscrenen van meerdere partijen
  - a. Verzamelen meer partijen
  - b. Analyseren meerdere partijen
  - c. Analyseren partijen met andere voorketen (Polen, afwijkende koeling etc)
4. Opzetten van implementatie in de praktijk
  - a. Samenwerking tussen A&F, PPO, KeyGene en diverse branche organisaties (telers, Greenery)