

# Collectievorming en Instandhouding

Januari 2004 tot oktober 2004

Patrick M. Hendrickx en Anton S.M. Sonnenberg

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.  
Sector Paddestoelen  
december 2004

PPO nr. 2004-21

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, 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 het Productschap Tuinbouw

PPO Projectnummer: 620059

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.**

Sector Paddestoelen

Adres : Peelheideweg 1  
: Postbus 6042, 5960 AA, Horst  
Tel. : 077-4647575  
Fax : 077-4641567  
E-mail : info.ppo@wur.nl  
Internet : www.ppo.wur.nl

# Inhoudsopgave

pagina

1	INLEIDING .....	4
2	INSTANDHOUDING.....	5
3	SAMENSTELLING COLLECTIE EN NIEUWE AANWINSTEN. ....	7
4	IDENTIFICATIE VAN SOORTEN EN STAMMEN. ....	8
4.1	Identificatie van soorten .....	8
4.2	Identificatie van stammen .....	9
4.3	Identificatie van commerciële champignonrassen .....	10

# Inleiding

De collectie van PPO paddestoelen is van cruciaal belang voor innovaties in de paddestoelenteelt. Dat blijkt uit het groot aantal projecten dat gebruik maakt of heeft gemaakt van de collectie. Juist omdat de collectie al een lange historie heeft is van een groot aantal stammen in de loop van de tijd veel teeltkundige en andere informatie verzameld. Het niet in stand houden van deze stammen zou betekenen dat de referentie met onderzoek uit het verleden verloren gaat.

Zo speelt de collectie nu maar ook in de toekomst een grote rol in de veredeling van paddestoelen. De genetische variatie van de gecultiveerde champignon is zeer beperkt. Het gevolg is dat alle rassen een vergelijkbare gevoeligheid hebben voor de huidige ziekteverwekkers. Om nieuwe eigenschappen zoals resistentie te kunnen vinden is er een pool van genetisch divers uitgangsmateriaal nodig. PPO heeft dit in huis in de vorm van een wildcollectie, paddestoelen van diverse soorten die uit verschillende delen van de wereld zijn verzameld. Hoe groter de genetische variatie tussen de stammen des te meer nieuwe eigenschappen zijn er beschikbaar voor het maken van commercieel interessante rassen.

Niet alleen voor de champignon beschikt PPO over een grote wildcollectie. Ook voor andere commercieel interessante soorten als oesterzwam, shiitake, paarse ridderzwam en amandelchampignon is een grote pool van genetisch verschillende stammen aanwezig.

Voor de ontwikkeling van de sporenloze oesterzwam is de onderlinge verwantschap van alle commercieel verkrijgbare handelsrassen goed bestudeerd. Het zou een verspilling van energie en tijd zijn wanneer twee nauw verwante stammen uitgekozen werden om sporenloos gemaakt te worden. De kans zou groot zijn dat beide sporeloze eindproducten dezelfde kwaliteiten en/of fouten bevatten.

PPO ontwikkelt testen om pathogenen vroegtijdig met moleculaire technieken aan te tonen. Het is onmogelijk om een dergelijke test te ontwikkelen wanneer er geen compleet beeld bestaat over de groep ziekteverwekkers die bepaalde symptomen oproepen. Om die reden verzamelt en identificeert PPO pathogenen uit de praktijk. Uit resultaten uit de praktijk weten we dat er bijvoorbeeld een grote variatie binnen het geslacht *Trichoderma* bestaat en dat alle groene schimmels die in compost voorkomen niet allemaal dezelfde zijn. Door vergelijking met groene schimmels geïsoleerd uit Ierse en Amerikaanse teelten waarin veel problemen met groene schimmels zijn voorgekomen weten we ook dat deze typen nog niet in Nederland zijn waargenomen. De stammen in de collectie dienen echter wel als referentiemateriaal dat direct inzetbaar is voor identificatie mochten in Nederland ook agressieve groene schimmels opduiken.

Verder dient de collectie als basis voor onderzoek naar medicinale paddestoelen, VirusX (MVX), softrot, en bacterievlekken.

Één van de behoeften van de paddestoelsector in Nederland is productdiversificatie. Naast het maken van nieuwe producten op basis van champignons bieden andere soorten een kans. Er is de laatste tijd duidelijk een groei te zien in de productie en handel van andere paddestoelen. De collectie van PPO kan daarvoor uitstekend als basis dienen.

De collectie is uniek in zijn soort in Nederland. Instanties als het Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS) hebben ook een grootte collectie van schimmels maar deze is niet toegespitst op soorten die in de paddestoelenteelt worden gebruikt. Daarnaast kijkt het CBS naar de instandhouding van het mycelium en legt zich niet toe op het op peil houden van eigenschappen zoals die van paddestoelen. PPO ziet echter wel grote meerwaarde in samenwerking met andere collecties, nationaal en internationaal.

Collecties kunnen elkaar aanvullen en er kan worden gedacht aan een back-up collectie. Een backup-collectie op een andere locatie heeft als doel dat voor onderzoek belangrijke stammen niet verloren gaan door brand of andere calamiteiten.

PPO heeft dit jaar grootte voortgang gemaakt op gebied van identificering en instandhouding van stammen. Daarnaast zijn technieken ontwikkeld die het mogelijk maken om stammen op langere termijn goedkoper in stand te houden en toegankelijker te maken voor onderzoek. Het toegankelijker maken van de collectie is noodzakelijk. In het verleden kostte het opsporen van bepaalde stammen te veel tijd omdat niet alles digitaal beschikbaar was. Deze achterstand is ingelopen en alle stammen die in de collectie aanwezig zijn

staan ook in een digitale lijst.

Het is voor het onderzoek zeer belangrijk dat alle beschikbare informatie van een bepaalde stam in een database komt. Op deze wijze kunnen er relaties gelegd worden tussen gegevens die voortkomend uit celproeven, experimenten op het laboratorium en gegevens die van elders komen. Op dit moment zijn de gegevens niet geïntegreerd. Er is echter software voorhanden om deze databases op te stellen en enkele collectiebeheerders elders hebben ook programma's opgesteld. PPO wil graag gebruik maken van deze expertise en hier ook een dergelijk geïntegreerde database opstellen.

Het koppelen van onderzoekgegevens aan de stam is nu slechts beperkt mogelijk. Zo wordt het in toekomst mogelijk om uit de hele collecties lijsten op te roepen met bepaalde kenmerken, bijvoorbeeld alle bruine *Verticillium*-resistente champignons met een opbrengst tussen de 15 en 20 kg/m<sup>2</sup>. De investering in deze database zal terugbetaald worden in het feit dat onderzoek nog doeltreffender opgezet kan worden en dat er makkelijker en meer informatie uit onderzoek gehaald kan worden. Experimenten kunnen in de loop van jaren met elkaar vergeleken worden en daardoor kunnen trends herkend worden. Het voltooien van de database is een doel voor 2005 en 2006.

Op gebied van instandhouding zijn er ook grootte verbeteringen te melden. In het verslag van 2003 werd voorgesteld dat er een standaardprocedure ontwikkeld moest worden voor het invriezen van alle stammen. Deze procedure is ontwikkeld voor alle stammen die nog niet in de stikstofcollectie waren opgeslagen. Daarnaast is gewerkt aan het standaardiseren van een vele efficiëntere methode die ontwikkeld is door het CCBAS (de collectie basidiomyceten van het Instituut voor Microbiologie, Praag, Tsjechië). Deze methode maakt het mogelijk om ook moeilijk instand te houden stammen succesvol te bewaren. De impact van deze methode zal verder beschreven worden in het hoofdstuk 2 Instandhouding.

Zeker een punt van aandacht is de continuïteit van de collectie. Het wegvallen van een collectie betekent niet alleen het verlies van stammen maar ook van unieke gegevens en expertise. Dit is niet meer opnieuw op te bouwen omdat we niet kunnen terugvallen op andere bronnen. PPO heeft bijvoorbeeld 250 commerciële stammen van champignons in zijn collectie waarin 18 (voormalige) broedfirma's zijn vertegenwoordigd. Vooral het verdwijnen in de tijd van veel broedfirma's maakt deze collectie uniek.

Hoewel de collectie blijft groeien is het streven van PPO om de kosten hiervoor niet te laten groeien. Daarom wordt, zoals reeds aangegeven, steeds gezocht naar efficiëntere methoden voor alle werkzaamheden die collectiebeheer met zich meebrengt. Daar hoort bij dat we zoveel mogelijk stammen alleen onder vloeibare stikstof bewaren, snelle methoden gebruiken om stammen te identificeren en goede digitale databasen opbouwen om gegevens te koppelen en te ontsluiten voor diverse projecten. PPO zal daarom vragen om een continuering van de ondersteuning van dit project met PT gelden.

## 1 Instandhouding

Om efficiënt met de collectie te kunnen werken zijn er verschillende manieren om stammen in stand te houden. Alle stammen die niet worden gebruikt voor projecten worden bewaard in de vloeibare stikstof. In de vloeibare stikstof degenereren de stammen niet omdat bij -196°C de processen in de cellen stilstaan en overëntingen overbodig zijn. Het voordeel van deze methode is dat er minder arbeid nodig is om deze collectie in stand te houden. Het meeste werk gaat dan zitten in het inbrengen in de stikstof en het er weer uithalen. Om die reden is het niet interessant om stammen die vaak gebruikt worden alleen in de stikstof te bewaren. Dergelijke stammen worden daarom ook in een werkcollectie bewaard. De werkcollectie bestaat uit twee buizen mycelium per stam en dient elk jaar overgeënt te worden om te voorkomen dat de buizen uitdrogen.

In 2002 was de werkcollectie nog erg groot. Dit kwam vooral door de problemen bij invriezen in de vloeibare stikstof. De werkcollectie in 2002 bestond nog uit ruim 6000 stammen. Hiervan werden ongeveer

3100 stammen gebruikt voor projecten en de resterende stammen moesten nog in de stikstofcollectie of konden verwijderd worden omdat ze niet meer nodig zijn voor onderzoek.

Zoals in voorgaande jaarlijkse verslagen is gemeld bestaat de collectie voor een belangrijk gedeelte ook uit giften. Vaak krijgen we stammen waarbij wordt vermeld wat de soort waarschijnlijk is. Een collectie heeft pas waarde als ook precies bekend is wat er in zit. Daarvoor moet een stam correct op soortnaam geïdentificeerd zijn. Daarnaast is het belangrijk om te weten wat de genetische variatie is van stammen binnen één soort is. PPO heeft daarvoor methoden ontwikkeld (zie voorgaande verslagen en paragraaf 4.1 in dit verslag). We zijn op dit moment nog bezig om de achterstand van de identificatie van oudere stammen weg te werken.

De werkcollectie in 2004 bestaat nog uit 4500 stammen waarvan 3800 stammen nodig zijn voor projecten. De resterende 700 stammen moeten nog in de vloeibare stikstof. Dit is een continu proces omdat er ook steeds weer nieuwe stammen bijkomen (de laatste twee jaar b.v. 700 nieuwe stammen).

De werkcollectie is in afgelopen jaren sterk verkleind maar er is nog steeds een behoorlijke achterstand. Het overenten van de werkcollectie gebeurt ten laste van de projecten waarvoor deze collectie nodig is. De basisvoorzieningen (materialen), optimaliseren van methoden en het ontsluiten en beschikbaar stellen van gegevens zijn algemene zaken die wij onder het huidige project willen blijven doen. Deze zaken komen ook andere projecten ten goede. PPO streeft naar een zo klein mogelijke werkcollectie. Een reductie met 1000 stammen per jaar is haalbaar. Op deze wijze kunnen de projectkosten gedrukt worden.

De problemen die in 2002 zijn opgetreden bij het inbrengen van stammen in de vloeibare stikstof hebben gezorgd voor een achterstand van het overbrengen van stammen van de werkcollectie naar de vloeibare stikstof. Deze problemen zijn voor de meest gangbare soorten opgelost in 2003. Daarna is begonnen met het wegwerken van de achterstand. In 2004 is dat voor een gedeelte gedaan en in 2005 moet dit voor een groot gedeelte gerealiseerd zijn (met wellicht een staartje nog in 2006).

In vorig en afgelopen jaar zijn er standaardmethodieken ontwikkeld voor het invriezen van alle soorten voor de vloeibare stikstofcollectie. PPO heeft een methodiek overgenomen van CCBAS (de collectie basidiomyceten van het Instituut voor Microbiologie, Praag, Tsjechië) die gebruikt maakt van perliet als drager voor het mycelium. Dr. Ladislav Homolka rapporteerde hiermee goede resultaten voor moeilijk instand te houden schimmels zoals *Volvariella spp.* Perliet is een vulkanisch aluminiumsilicaat mineraal dat in staat is om vloeistof te absorberen en wanneer nodig weer vrijgeven. De perlietkorrels worden geweekt in vloeibaar medium met een vriesbeschermend middel. Schimmels kunnen goed groeien op het ruwe oppervlak van perliet. Het kweken van de schimmel op de perlietkorrels vindt plaats in een klein buisje met schroefdeksel. Het buisje wordt ingevroren en opgeslagen in de vloeibare stikstof.

Stammen uit de collectie halen wordt eenvoudiger omdat er gewoon één van de vele perlietkorreltjes uit het buisje genomen kan worden. Het resterende wordt teruggezet in de stikstof. Bij de huidige methode wordt een rietje (met agarponsjes die mycelium bevatten) volledig gebruikt. Hierdoor moet de voorraad steeds weer worden aangevuld. Bij perlietmethode kunnen een paar korreltjes uit een buisje worden genomen en de rest gaat weer in de vloeibare stikstof. Aangezien er veel korreltjes in een buisje gaan is aanvulling nauwelijks nodig en dat spaart tijd. Bijkomend voordeel is dat de voorbereidingen voor het invriezen van perliet twee maal zo snel gaan als de voorbereidingen benodigd voor de rietjesmethode.

Samengevat biedt de perlietmethode een kans om recalcitrante stammen in te vriezen en is efficiënter bij zowel het in de collectie opnemen als het uit de collectie halen. De overgang naar de perlietmethode zou PPO in staat stellen om de achterstand in 2005 vrijwel volledig weg te werken aangezien de tijdswinst groot is bij de 700 nog in te voeren stammen (enkele honderden uren).

Toekomstvisie is dat het invriezen m.b.v. perliet zo efficiënt kan dat PPO met een zeer kleine werkcollectie uit de voeten kan. Nu worden stammen in de werkcollectie aangehouden wanneer de kans bestaat dat ze volgend jaar nodig zijn of tot het einde van het project. Dat is dan niet altijd meer nodig.

Een nadeel is dat de stikstofvaten er niet op gemaakt zijn om deze buisjes op te slaan. Uitbreiding in toekomst was al noodzakelijk dus de nieuwe uitbreiding wordt meteen geschikt gemaakt voor dit systeem.

De perlietmethode is voor een groot aantal schimmels geoptimaliseerd (Tabel 1). Voor optimalisatie zijn verschillende voorgroei en uitgroeimedia getest omdat in voorgaand onderzoek gebleken is dat dit van grote invloed is op de overleving van mycelium en verschilt van soort tot soort.

Er is niet zoals afgesproken in het vorige rapport dat deze optimalisatie wordt uitgevoerd voor alle soorten.

Omdat vele soorten al in de stikstof zaten leek het een betere tijdsinvestering om de achterstand weg te werken dan om eerst stammen uit de stikstof te halen om ze er vervolgens weer in te zetten.

Soort	Nederlandse naam	Voorgroeimedum	Uitgroeimedum
<i>Agaricus bisporus</i>	Champignon	A	A/B/C
<i>Agaricus Blazei</i>	Amandelchampignon	A	B
<i>Pleurotus oestreatus</i>	Oesterzwam	B	B
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	A/B/C	A/B
<i>Lepista nuda</i>	Paarse schijnridderzwam	A	C
<i>Coprinus comatus</i>	Geschubde inktzwam	A/B	A
<i>Psilocybe sp.</i>		A/B/C	A/B
<i>Ganoderma sp.</i>	Lakzwam	B	A/C
<i>Volvariella volvacea</i>	Stropaddestoel of Tropische beurszwam	A/B/C	A/B/C
<i>Agrocybes aegrita</i>	Populierleemhoed (piopino)	A/B/C	A/B/C
<i>Hypsizygyus tessulatus</i>	Beukenzwam	A/B/C	A/B/C
<i>Grifola frondosa</i>	Maitake	A/B/C	A/B/C
<i>Pholiota nameko</i>	Bundelzwam	A/B/C	A/B/C
<i>Stropharia sp.</i>	Stropharia	A/B/C	A/B/C
<i>Auricularia sp.</i>	Judasoor	A/B/C	A/B/C
<i>Termitomyces sp.</i>		B	A/B/C
<i>Xylaria sp.</i>	Geweizwam	A/B/C	A/B/C
<i>A: gedefinieerd medium</i>	<i>B: Mout Pepton</i>	<i>C: Mout</i>	

**Tabel 1:** Media waarop de genoemde soorten bij voorkeur voorgetroeid dan wel weer opgekweekt moeten worden wanneer opgeslagen in vloeibare stikstof.

## 2 Samenstelling collectie en nieuwe aanwinsten.

De collectie met soorten die wereldwijd gecultiveerd worden wordt steeds completer. Door de sector is aangegeven dat nieuwe markt/product combinaties nodig zijn voor het voortbestaan van de paddestoelsector in Nederland. Daarvoor is het belangrijk om een collectie te hebben van soorten die elders in de wereld van groot economisch belang zijn.

De collectie heeft dan ook met name voor andere paddestoelen in 2004 een forse uitbreiding ondergaan. Hiervoor wordt o.a. gebruik gemaakt van een LNV project dat PPO samen met een Indonesisch instituut uitvoert. Ook de contacten met China leveren veel nieuwe stammen op. Het is verbazingwekkend hoe goed enkele van deze stammen produceren onder eenvoudige condities die in die landen worden toegepast voor de teelt. Deze kennis is zeker nuttig voor de Nederlandse sector.

Ook voor de meer gangbare soorten zoals *Pleurotus* en *Agaricus* zijn het laatste jaar nieuwe stammen opgenomen. Dit waren voornamelijk commerciële rassen die wij nog niet in de collectie hadden.

In tabel 2 geeft een overzicht over de nieuw opgenomen stammen. Hierbij is geen rekening gehouden met alle kruisingen en eensporencultures die worden gegenereerd in de veredelingsprojecten omdat die niet binnen dit project horen. De 25 nog niet geïdentificeerde soorten behoren grotendeels tot het geslacht *Pleurotus*.

Latijnse naam	Gebruiksnaam	Nieuwe aanwinsten	Totaal in collectie
<i>Agaricus bisporus</i>	Champignon	1	4195

<i>Agaricus blazei</i>	Amandel champignon	1	12
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Amandel champignon	2	2
<i>Auricularia auricula</i>	Judas oor	3	5
<i>Pleurotus cystidiosis</i>		4	8
<i>Pleurotus flabellatus</i>		1	1
<i>Pleurotus nebrodensis</i>		1	1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Gewone oesterzwam	24	684
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	12	57
<i>Volvariella volvacea</i>	rijststropaddestoel	1	4
<i>Termitomyces</i>		45	45
<i>Niet geïdentificeerd</i>		25	
<i>Mycogone cervina</i>		1	1
<i>Mycogone perniciososa</i>	Veroorzaker natte mollen	3	23
<i>Mycogone calospora</i>		1	1
<i>Mycogone rosea</i>		1	1
<i>Trichoderma sp.</i>	Veroorzaker groene schimmel	10	170
<i>Verticillium sp.</i>	Veroorzaker droge mollen	24	99

**Tabel 2:** Lijst met nieuwe stammen die in 2004 in de collectie zijn opgenomen.

## 3 Identificatie van soorten en stammen.

### 3.1 Identificatie van soorten

De collectie van PPO bestaat momenteel uit 6600 stammen. Het grootste deel wordt gevormd door champignonstammen (*Agaricus bisporus*) en deze zijn allen correct geïdentificeerd.

De tweede grote groep wordt gevormd door het geslacht *Pleurotus* waarvan weer het grootste gedeelte wordt gevormd door de soort *P. ostreatus*, ofwel de gewone oesterzwam. Hiervan is een groot gedeelte wel meegenomen in de identificatie. Het gedeelte dat niet meegenomen is zijn producten uit de veredeling waarvan we zeker weten dat deze tot de soort *P. ostreatus* behoren.

Het doel van PPO is om alle resterende stammen te identificeren. Het gaat hierbij om 1750 stammen verdeeld over vermoedelijk 150 soorten.

Zoals al eerder vermeld zitten er nog veel stammen in de collectie uit eerdere jaren die nog niet geïdentificeerd zijn (ca. 900). Deze zitten voornamelijk in de stikstofcollectie en moeten er dus eerst uitgehaald worden, geïdentificeerd en er dan weer ingestopt. Dat is een aanzienlijke hoeveelheid werk en dat hebben we niet kunnen afronden in 2004. Deze nog niet geïdentificeerde soorten behoren voornamelijk tot het geslacht *Agaricus*. We zijn van plan om deze stammen pas te identificeren wanneer ze opnieuw ingevroren kunnen worden volgens de nieuwe perlietmethode.

Afgelopen jaar zijn alle stammen uit de werkcollectie waarvan we enige twijfel hadden over de correcte soortnaam geïdentificeerd met de ITS-RFLP methode. Deze is ook toegepast op ca. 100 stammen die alleen in de stikstof zaten. Met de ITS-RFLP methode bestuderen we een klein gebiedje (ITS-regio) op het DNA dat bij de meeste levende wezens ongeveer dezelfde volgorde van bouwstenen heeft (DNA-sequentie). Dit gebiedje op het DNA is zo belangrijk voor de schimmel dat elk foutje hierin kan leiden tot fatale gevolgen. Tijdens de evolutie is deze sequentie dan ook goed geconserveerd gebleven binnen één soort. Tussen de soorten zijn wel enige verschillen te vinden. Hoe de methode wordt toegepast is uitgelegd in het verslag van vorig jaar. Hier hebben we laten zien dat het een snelle methode is om betrouwbaar stammen



op soortnaam in te delen. Het bandenpatroon van een analyse wordt ook wel een genetische fingerprint genoemd en wordt opgeslagen in een database.

In het totaal zijn er ruim 800 stammen op deze manier gecontroleerd. Met behulp van software zijn ze vervolgens op soort ingedeeld.

Voor nieuwe soorten waarvoor we nog geen referentiestam in huis hebben wordt voor het ITS stuk DNA eerst de sequentie bepaald en vergeleken met bestaande sequenties die via internet beschikbaar zijn. Als bekend is om welke soort het gaat wordt de ITS-RFLP methode toegepast. Het patroon dient vervolgens weer als referentie voor nieuwe aanwinsten waarvoor dan alleen de ITS-RFLP methode hoeft te worden toegepast.

De oude collectie is ingedeeld in soorten waarbij voor elke soort een aparte tabel is gereserveerd in de papieren database. Zoals al aangegeven zitten hier foute benamingen in en stammen zijn dus soms ingedeeld in de verkeerde tabel. We willen van deze indeling af en naar een systeem toe dat ook in andere collecties wordt gehandhaafd (o.a. bij het CBS en de ATCC). Hier worden stammen gecodeerd bij binnenkomst. Daarna pas wordt de stam geïdentificeerd en worden gegevens verzameld. Digitale databases hebben het voordeel dat snel een indeling gemaakt kan worden op allerlei kenmerken, dus ook op soort. Een indeling op dit criterium is dus niet nodig. We zijn nu al begonnen met het gebruik van deze nieuwe nummering bij binnenkomst van nieuwe stammen en zullen ook bestaande stammen voorzien van een nieuw nummer. Op deze manier kunnen we ook beter gebruik gaan maken van bestaande databases van andere collecties.

## 3.2 Identificatie van stammen

Wanneer de soortnamen bekend zijn is het van belang om de genetische variatie binnen de soorten te kennen. Het heeft namelijk geen zin om al te veel kopieën in stand te houden. Dat geldt in ieder geval voor uitgangsmateriaal voor de veredeling (de wildcollectie). Voor commerciële rassen ligt dat iets anders. Commerciële rassen zijn vaak ontstaan door verdere veredeling van bestaande rassen en dus lijken de "nieuwe" producten erg op elkaar. Toch kunnen er belangrijke nieuwe eigenschappen inzitten die niet altijd in de genetische fingerprint te zien is. PPO heeft vrijwel alle commerciële rassen van de champignon en de gewone oesterzwam in de collectie. De eerste rassen in de collectie dateren van de jaren '60. Voor zover bekend is er geen andere collectie die een dergelijke unieke verzameling heeft. In tegenstelling tot de huidige rassen zitten er tussen de oude rassen wel genetische variatie. Men kan dus bij nieuwe ziekten of wensen voor nieuwe eigenschappen teruggrijpen op deze collectie, o.a. voor veredelingsdoeleinden. Vooral door het verdwijnen van veel broedfirma's in de laatste 20 jaar is deze collectie uniek geworden.

Variatie binnen een soort kan worden bestudeerd met ISSR, een methode die gebruikt maakt van kleine repeterende DNA sequenties. De gebieden tussen deze elementen worden met een cyclische reactie (PCR) vermenigvuldigd. Omdat dit type repeterende gebieden niet van essentieel belang zijn voor het organisme worden veranderingen (mutaties) niet uitgeselecteerd. De verschillen die zo zijn ontstaan in de loop van de tijd kunnen goed gebruikt worden om genetische verschillen binnen één soort te bepalen.

Van *Lentinus edodes* (correcte naam eigenlijk: *Lentinula edodes*) hebben we bijvoorbeeld ongeveer 80 rassen in huis. Met een ISSR-fingerprint zijn de rassen bekeken en deze zijn onderverdeeld in ca. 20 groepen. Daarbij geldt het criterium dat de verschillen binnen een groep kleiner moet zijn dan tussen de groepen. Zo kan onderscheid gemaakt worden tussen donkere en lichte soorten op grond van de fingerprint.

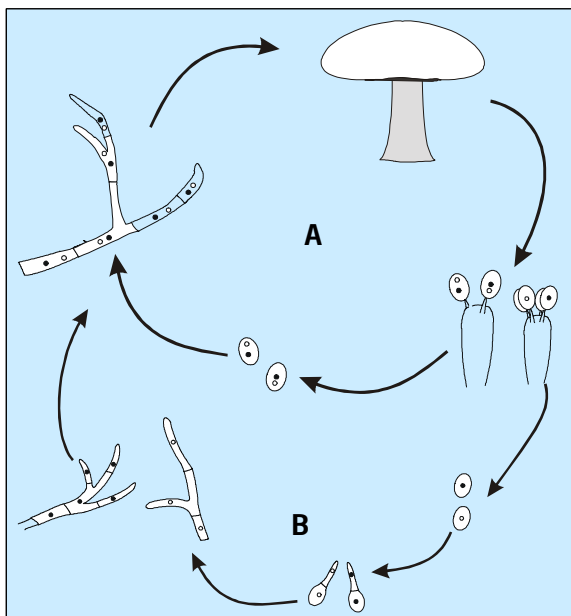
Voor de gewone oesterzwam is de screening nog niet helemaal klaar. We hebben het laatste jaar ook nog een aantal wildisolaten binnen gekregen die nog getypeerd moeten worden.

Voor de amandelchampignon hebben we 8 rassen in huis. Over de naamgeving bestaat nogal wat verwarring. Zo is de naam *Agaricus blazei* de meest gebruikte naam. Ook wordt de naam *A. brasiliensis* gebruikt en bestaat het vermoeden dat de *A. subrufescens* wel eens hetzelfde kon zijn als *A. blazei*. Uit de fingerprints die we nu gemaakt hebben van *A. blazei* en *A. subrufescens* blijkt dat het zéér waarschijnlijk om dezelfde soort gaat. Inmiddels is uit betrouwbare bron vernomen dat de twee soorten te kruisen zijn. Dat betekent dat het hier vrijwel zeker om één soort gaat. Dat is op zich weer interessant omdat dan alle

stammen gebruikt kunnen worden voor een eventuele veredeling.

### 3.3 Identificatie van commerciële champignonrassen

De eerste commerciële hybride van de champignon, Horst U1 en Horst U3, zijn in 1980 op de markt gebracht. Deze grote, respectievelijke tussenhybride zijn binnen een kort tijdsbestek erg populair geworden. Vooral Horst U1 heeft een zéér groot deel van de wereldmarkt veroverd. Enkele maanden na de introductie beide rassen kwamen meer hybriden op de markt. Uit teeltvergelijk bleek dat deze nieuwe hybriden wel erg veel leken op U1 en U3. Champignons hebben, vergeleken met planten, echter weinig uiterlijke kenmerken. De weinige kenmerken waarmee rassen kunnen worden onderscheiden variëren ook nog eens van teelt tot teelt. Alleen door de genetische samenstelling van rassen te vergelijken is het mogelijk om met meer zekerheid te zeggen of rassen identiek zijn of verschillend. Stukjes DNA die in meerdere kopieën in het erfelijk materiaal voorkomen zijn hiervoor erg geschikt. De genetische *fingerprints* die hiermee te maken zijn laten zien dat de hybriden die na Horst U1 en U3 op de markt zijn gebracht inderdaad identiek of erg nauw verwant zijn aan U1 en U3. Het is echter niet mogelijk om met deze methode een onderscheid te maken tussen identiek en nauw verwant. De oorzaak hiervoor ligt in de typische levenscyclus van de champignon. In het mycelium van champignons komen in elke cel twee type kernen voor. Beide kernen moeten in ieder geval in één van de genen verschillen om paddestoelen te



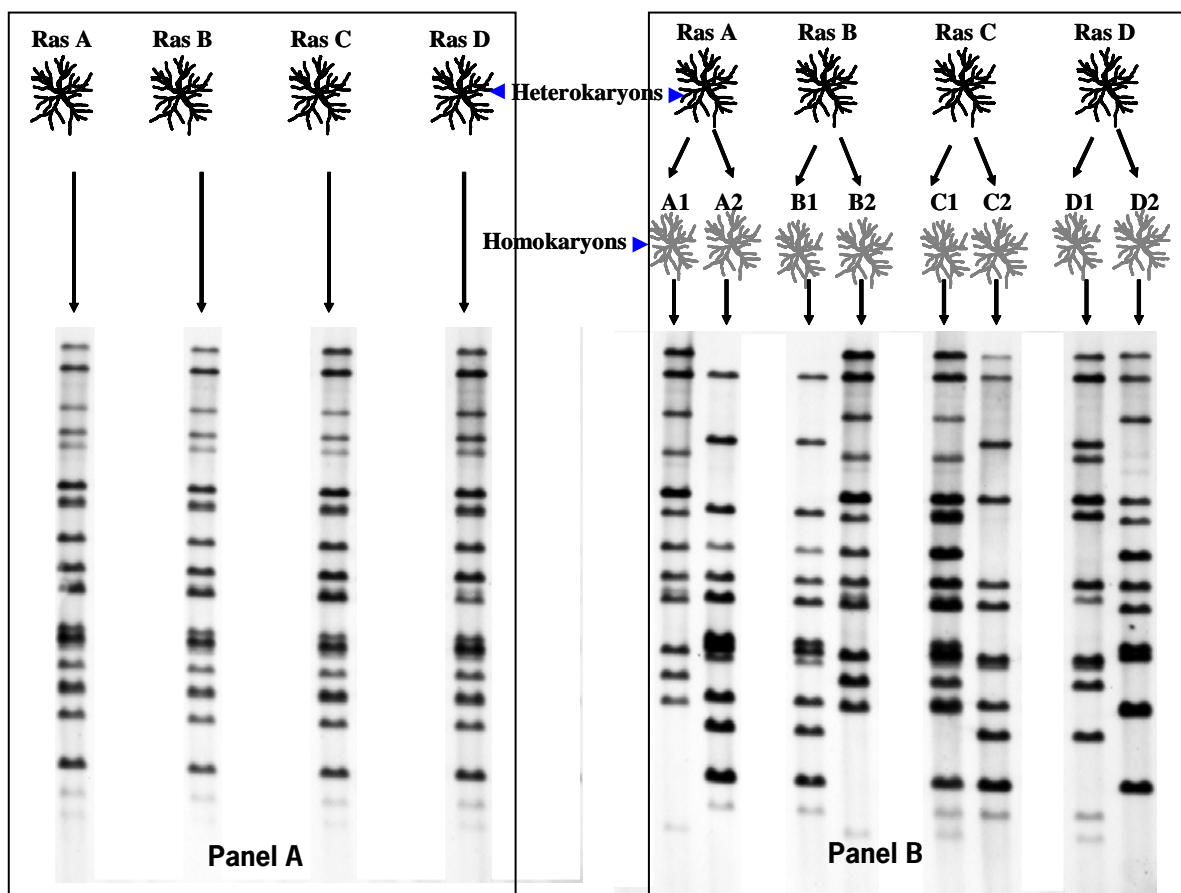
Figuur 1. De levenscyclus van commerciële champignonrassen. In het mycelium zitten twee type kernen met verschillend *mating type*. Dit type mycelium kan paddestoelen vormen. In de basidia op de lamellen versmelten de kernen en vind er uitwisseling van genetisch materiaal plaats tussen de kernen. Na twee delingen worden de 4 kernen meestal over twee sporen verdeeld (A) en in een klein percentage over 4 sporen (B).

kunnen maken. Dit gen wordt ook wel het geslachtsgen of *mating type* gen genoemd. Mycelium dat twee type kernen heeft en paddestoelen kan vormen wordt *heterokaryon* genoemd. Op het moment dat de sporen gevormd worden versmelten de twee kernen met elkaar in gespecialiseerde cellen (basidia) waarop de sporen worden gevormd. Hierbij wordt genetisch materiaal tussen de kernen uitgewisseld. Daarna vinden er twee delingen plaats en de vier kernen die zo ontstaan worden verdeeld over de sporen. Bij commerciële champignonrassen vormt slechts een klein percentage van de basidia 4 sporen. In dat geval krijgt elke spore één kern. Na kieming kan dit mycelium geen paddestoelen vormen omdat de beide *mating types* niet in één mycelium aanwezig zijn. Alleen na een kruising (versmelting van twee homokaryons kan weer een heterokaryon ontstaan (levencyclus B in figuur 1). Mycelium met maar één type kern wordt homokaryon genoemd. Bij champignons van commerciële rassen worden per basidium meestal maar twee sporen gevormd. Elke spore krijgt twee kernen. De verdeling is zodanig dat in elke spore twee kernen zitten die verschillen in *mating type*. Dat betekent dat elke spore na kieming een heterokaryon is en mycelium vormt dat weer paddestoelen kan maken. Levenscyclus A in figuur 1). De uitwisseling van genetisch materiaal tussen de kernen verloopt zodanig dat de optelsom

weer ongeveer hetzelfde is als in de oorspronkelijke kernen. Het nageslacht krijgt dus het merendeel van het erfelijk materiaal beide ouders mee. Door de uitwisseling tussen de kernen is het genetisch materiaal

wel anders verdeeld tussen de kernen. Als je een genetische *fingerprint* maakt van heterokaryotische eensporecultures afkomstig van één ras dan vind je nauwelijks verschillen in bandenpatronen. Dat komt omdat beide type kernen in het mycelium zitten en je dus een bandenpatroon krijgt dat een optelsom is van beide kernen. Het is dus moeilijk na te gaan of een "nieuw" ras een kopie is van een bestaand ras of afgeleid van een bestaand ras. Een afgeleid ras is makkelijk te maken door eensporecultures te isoleren van een ras en deze te testen op teelteigenschappen. Dit laatste wordt vaak gedaan. Eensporecultures lijken in eigenschappen ook erg sterk op het ras waar ze van afkomstig zijn en op deze manier kun je snel en zonder veel kosten een nieuw ras maken.

Alleen door van elk ras beide type kernen van elkaar te scheiden kun je zien of een ras identiek is of niet. Dat kan door een bepaalde truck toe te passen. Van mycelium met twee type kernen kunnen twee afzonderlijke cultures gemaakt worden die elk maar één type kern hebben, of de ene of de andere kern. Op de techniek gaan we nu niet in. Als je nu de twee typen mycelia van elk ras met elkaar vergelijkt kun je zien of rassen kopieën van elkaar zijn of afgeleiden. Figuur 3 laat een voorbeeld zien. Ras A is Horst U1. Ras B heeft in de beide type kernen hetzelfde patroon als U1 en is dus een kopie. De andere rassen hebben een iets ander patroon en zijn dus afgeleid. Opgeteld hebben al deze rassen echter hetzelfde patroon. We hebben dus een manier om de huidige rassen uit elkaar te houden maar deze is wel een beetje omslachtig. We denken dat een snelle test op het mycelium van de rassen in principe wel mogelijk is maar dat kunnen we uit efficiency overwegingen beter uit besteden.



Figuur 2. Met behulp van genetische fingerprints wordt duidelijk of rassen nauw aan elkaar verwant zijn. A: de 4 rassen (waarin elk twee verschillende type kernen zitten) geven identieke bandenpatronen. Ras A is het eerste hybride ras, Horst U1. De identieke patronen geven aan dat de rassen B, C en D zéér nauw verwant zijn aan Horst U1. Of de rassen zijn gekopieerd of verkregen via een eensporecultuur kan pas duidelijk worden gemaakt als de twee verschillende type kernen uit elk ras (heterokaryon) gescheiden worden en de zo ontstane homokaryons apart bekeken. In panel B is te zien dat de eerste twee rassen identieke homokaryons hebben (A1=B2 en A2=B1). De *fingerprints* van C1, C2, D1 en D2 zijn wel verschillend. Hoewel de optelsom voor elk ras hetzelfde is (panel A) is op deze manier te zien dat de rassen A en B kopieën van elkaar zijn en dat de rassen C en D direct zijn afgeleid van Horst U1.

## Bijlage 1. Overzicht stammen in collectie PPO Paddestoelen.

<i>Agaricus</i>	Handelsrassen	Weefselcultures	Kruisingen	Protoklonen	Eensporecultures	Wild	Totaal
<i>bisporus</i>	249	785	1261	124	1663	483	4195
<i>Pleurotus</i>	168		108	48	220 (520)	55	897
<i>ostreatus</i>							

Tabel 4. Collectie champignon- en oesterzwamstammen. Wat opvalt is dat vooral de collectie oesterzwam met 26 % is ingekrompen. Dit heeft alles te maken met het aflopen van het veredelingsproject Sporeloze oesterzwam.

### Collectie pathogenen

Bacteriën	Aantal stammen	Herkomst
Antagonisten	30	Werken remmend op pathogene bacteriën
<i>Pseudomonas agarici</i>	3	Uit kurkvoetjes
<i>Flavobacterium</i> sp.	1	Uit kurkvoetjes
<i>Pseudomonas putida</i>	5	Uit diverse teelten
<i>Pseudomonas reactans</i>		„
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	27	„
<i>Pseudomonas gingeri</i>	2	„
Pathogene schimmels		
<i>Mycogone perniciosa</i>	23	„
<i>Mycogone</i> sp.	3	„
<i>Trichoderma</i> sp.	170	„
<i>Verticillium</i> sp.	99	„
Andere dan <i>Trich</i> of <i>Vert</i>	94	„

Tabel 5. Overzicht collectie pathogene organismen.

Eetbare paddestoelen	# stammen	Eetbare paddestoelen	# stammen
<b>Agaricus soorten</b>		<b>Andere paddestoelen</b>	
<i>Agaricus abruptibulbus</i>	16	<i>Auricularia auricula</i>	5
<i>Agaricus arvensis</i>	388(62)	<i>Agarocybe chaxingu</i>	1
<i>Agaricus augustus</i>	2	<i>Agrocybe aegerita</i>	15
<i>Agaricus blazei</i>	12	<i>Armillaria mellea</i>	1
<i>Agaricus bitorquis</i>	396(30)	<i>Boletus edulis</i>	2
<i>Agaricus brasiliënsis</i>	2	<i>Calvatia gigantea</i>	1
<i>Agaricus campestris</i>	5	<i>Calvatia gigantea</i>	1
<i>Agaricus chionodermus</i>	1	<i>Cantharellus cibarius</i>	78(50)
<i>Agaricus excellens</i>	5	<i>Coprinus comatus</i>	123(41)
<i>Agaricus fissuratus</i>	8	<i>Cordiceps sinensis</i>	1
<i>Agaricus macrocarpus</i>	8	<i>Cordyceps militaris</i>	1
<i>Agaricus macrosporus</i>	20	<i>Craterellus cornucopiodes</i>	1
<i>Agaricus nivescens</i>	41	<i>Fistulina hepatica</i>	7
<i>Agaricus osceanus</i>	1	<i>Flammulina velutipes</i>	4
<i>Agaricus perrarus</i>	2	<i>Ganoderma lucidum</i>	9
<i>Agaricus porphyron</i>	4	<i>Grifola frondosa</i>	7
<i>Agaricus silvaticus</i>	1	<i>Hebeloma ?</i>	2
<i>Agaricus silvicola</i>	1	<i>Hericium erinaceus</i>	3
<i>Agaricus silvicolus</i>	4	<i>Hohenbuehelia serotina</i>	4
<i>Agaricus subfloccosus</i>	1	<i>Hypsizygus marmoreum</i>	1
<i>Agaricus subrufescens</i>	2	<i>Lencoagaricus nauesius</i>	1
<i>Agaricus villaticus</i>	1	<i>Lentinus edodes</i>	57(45)
		<i>Lentinus sajor caju</i>	9
		<i>Lepista nuda</i>	95(23)
		<i>Macrolepiota procera</i>	13
		<i>Macrolepiota rhacodes</i>	1
<b>Pleurotus soorten</b>		<i>Morchella augusticeps</i>	2
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	17	<i>Morchella elata</i>	16
<i>Pleurotus eryngii</i>	6	<i>Morchella esculenta</i>	9 (12)
<i>Pleurotus abalone</i>	2	<i>Phellinus linteus</i>	4
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	8	<i>Psilocybe cubensis</i>	6
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	6	<i>Stropharia rugoso annulata</i>	11
<i>Pleurotus citrinopilleatus</i>	1	<i>Trametes versicolor</i>	1
<i>Pleurotus flabellatus</i>	1	<i>Tricholoma?</i>	1
<i>Pleurotus sapidus</i>	3	<i>Tyromyces?</i>	1
<i>(ostreatus/pulmonarius???)</i>		<i>Volvariella volvacea</i>	4
		<i>diversen</i>	±70

Thermofiele schimmels waaronder  
*Scytalidium thermophilum*

118 (voornamelijk in vloeibare  
stikstof)

Tabel 6. Overzicht van stammen die PPO in de collectie heeft. Een groot gedeelte van de stammen (met name "andere paddestoelen" zitten alleen in de vloeibare stikstof. Sommige stammen dateren van vóór 1970. De soorten bij *Pleurotus* omkaderd zijn behoren tot dezelfde soort (intersteriliteitsgroep).