

Kwaliteitsdiagnostiek Champignons

Eindverslag fase 1

datum 05 maart 2009

Jurriaan Mes
Shanna Bastiaan-Net
Ed Hendrix
Jos Amsing
Anton Sonnenberg

Report 1024

Content

Samenvatting	3
1. Inleiding	4
2. Monsters uit de praktijk	6
3. De champignon microarray	12
Ter herinnering nog even de achtergrond van de microarray. De microarray bestaat uit stukjes DNA die we uit champignons hebben gehaald die kleine verschillen in bruin verkleuring lieten zien. Deze beide DNA pools afkomstig van witte en iets verkleurde champignons zijn van elkaar afgetrokken om de meest verschillend tot expressie komende genen te selecteren. Van deze genen is vervolgens de DNA volgorde bepaald en zijn er zoveel mogelijk unieke genen geselecteerd om op de array te plaatsten. Omdat er nog ruimte over was zijn er ook nog een aantal niet gesequencde DNA fragmenten aan de array toegevoegd. Deze zouden kunnen overlappen met andere genen op de array waar we de sequentie wel van kennen maar dat is dus onbekend. Naast deze eigen nieuwe sequenties zijn er een aantal DNA sequenties uit de publieke database gehaald waarvan verwacht wordt dat ze mogelijk een rol spelen bij houdbaarheid van champignons. Deze DNAs zijn vervolgens allemaal vermeerderd, opgezuiverd en gespot op een klein microscoopglasje, de microarray. Dit is gedaan in 2003, de array zijn intussen al weer meer dan 4 jaar oud. Het is onbekend of deze lange bewaring van de microarrays effect kan hebben op de kwaliteit van de arrays omdat elke array die specifiek gemaakt wordt weer andere eigenschappen kan hebben. We zijn daarom bij de nieuwe experimenten met deze arrays weer even gaan optimaliseren voor de juiste hybridisatie condities. Daarbij wordt eerst het RNA geïsoleerd uit het ingevroren weefsel, gekwantificeerd en wordt vervolgens hetzelfde RNA in twee gelijke hoeveelheden verdeeld. Het ene gedeelte wordt vervolgens van een rood fluorescerend stofje voorzien, het andere van een groen label. Wanneer nu beide bij de arrays gelijk gehybridiseerd worden zou op elke spot even veel groen als rood signaal moeten ontstaan wat wordt omgezet door de analyse software in en gele spot. Zijn er veel spots te groen of alle spots te rood dan gaat er iets met de labeling van een van de kleurstoffen niet goed. Zijn er echter weinig spots, zijn de spots onregelmatig van grootte of zijn er andere problemen zoals dat er weinig signaal te zien is of ook naast de spots veel achtergrond signaal is kan dat komen door de kwaliteit van de array of door de hybridisatie condities.	12
4. Op weg naar een assay voor de praktijk	20
5. Conclusies	22
1. Vervolgtraject	23

Samenvatting

Het doel is een toets te ontwikkelen waarmee het kwaliteitsverloop van champignons in de versketens voorspeld kan worden. Om de keten zo efficiënt mogelijk te benutten is gekozen voor een analyse van het product groeiend op het bed vanaf een dag voor de oogst en tevens op de dag van oogsten. Een toets in deze fase zou dus al vanaf de oogst het type verpakking, de optimale keten keuze en tenminste houdbaar tot datum kunnen ondersteunen.

Van 39 partijen zijn de monsters verzameld voor gen expressie analyse en zijn er champignons geanalyseerd op kwaliteitsverloop middels Computer Beeld Analyse en visuele waarnemingen. Daarnaast zijn van deze partijen de teelt gegevens verzameld.

Wederom is gebleken dat het kwaliteitsverloop van partijen variabel en niet te voorspellen is. Daarbij zijn geen teelt factoren gevonden die kwaliteitsverloop zouden kunnen voorspellen.

Uit de samples zijn 9 partijen geselecteerd die verdeeld werden in goed houdbare en slecht houdbare partijen. Ook bij deze partijen waren geen aanwijsbare teelt factoren die correleren met de kwaliteitklassen.

De microarrays zijn uitgevoerd aan vers geoogst product op het gemiddelde oogst moment voor de middenmaat 50mm champignons. Microarrays, die waren ontwikkeld in een eerder project, waren wel enigszins in kwaliteit achteruit gegaan, er is extra moeite gedaan de experimenten te optimaliseren. Het resultaat van de hybridisatie experimenten was dat op 1 partij na de partijen op basis van verschillen in genexpressie verdeeld konden worden in dezelfde goede en slechte kwaliteitsklasse indeling. Dit heeft geleid tot een selectie van meest potentiële indicator genen waarvan ook, kijkend naar de mogelijke biologische functie, bij veel genen aannemelijk is dat ze een rol kunnen spelen in bruinverkleuring

Dit onderzoek heeft een basis gelegd voor het verder ontwikkelen van de test; er ligt een mooie verzameling aan materiaal om de toets op te ijken en we kunnen een selectie maken van rond de 30 genen waaruit de belangrijkste indicator genen geselecteerd kunnen worden. Voor een toets zullen deze eerst in een Real Time PCR omgezet moeten worden en de expressie in de verzamelde partijen geanalyseerd.

1. Inleiding

De champignonsector staat continue onder druk vanuit de retail, de kosten moeten laag blijven, ze willen een garantie van levering en de kwaliteit moet hoog zijn. Dat betekent mooie witte champignons die lang houdbaar, liefst voorbij de 'THT' datum zodat ze niet vroegtijdig uit de schappen verwijderd hoeven te worden. Deze derving is namelijk een grote kostenpost voor de retail die daar geen genoeg meer mee nemen. Ook in de verwerkende industrie wordt het steeds belangrijker de kwaliteit en rendement na verwerking vooraf te kunnen voorspellen om daarmee een kosten besparende efficiëntie slag te kunnen maken. Kortom er is een algemene trend te signaleren 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, de voorspelbare kwaliteit, zou een betrouwbare en makkelijk inzetbare methode voor kwaliteitsmonitoren en – voorspellen, in een vroeg stadium van de keten, een beslissing kunnen ondersteunen over de afzetmarkt. Dit kan uitval in de keten verminderen. Tevens kan een dergelijke methode gebruikt worden in de teeltsturing; telers kunnen directer met hun kwaliteit geconfronteerd worden wat op den duur moet leiden tot verbeterde teelt protocollen en daarmee champignons van optimale kwaliteit.

Recent ontwikkelde technologieën, gebaseerd op genexpressie (de werking van erfelijk materiaal), bieden een goede mogelijkheid om een kwaliteitstest te realiseren. Dit project gaat verder op de ingezette onderzoeksrouten om te zoeken naar stukken erfelijk materiaal (genen) die direct of indirect betrokken zijn bij kleur en verkleuring, een groot probleem voor de naaogstkwaliteit 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.

In het eerder uitgevoerde project 'Kwaliteitsgenomics Champignon' zijn monsters verzameld bij de handel, het kwaliteitsverloop bepaald en samples geselecteerd voor gen expressie studies. Deze gen expressie studies zijn uitgevoerd aan microarrays (microscoop glaasje met daarop geprint duizend genen van champignon) die binnen dat betreffende project zijn ontwikkeld. De analyses wezen toen uit dat er op gen expressie meer aan een product te meten valt dan op basis van uiterlijke kenmerken. Tevens konden partijen die in twee verschillende kwaliteitsklassen verdeeld werden op basis van verkleuring (na 7 dagen) al onderscheiden worden aan het begin van de bewaarperiode op basis van gen expressie. Voor een optimale benutting van de kwaliteitvoorspelling zou de toets echter al eerder uitgevoerd moeten worden.

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. Dit kan uiteindelijk leiden tot een labtoets of mogelijk zelfs naar een eenvoudig 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. Hiervoor is binnen het vorige project een eerste generatie cDNA microarray ontwikkeld. Hierop bevinden zich vele DNA spotjes van genen afkomstig van champignon die actief zijn in vruchtlichamen rond en net na de oogst. Deze microarrays zullen gebruikt worden met de nieuwe monsters die binnen dit project verzameld zijn om daarna correlaties te leggen tussen de expressie van sommige genen en de houdbaarheid van de champignons.

Het project is uitgevoerd door een consortium van WUR waarbij PRI voornamelijk de sample name en opname van teelt variabele hebben uitgevoerd en A&F het moleculaire werk hebben uitgevoerd.

2. Monsters uit de praktijk

Zoals gezegd willen we binnen dit project proberen of de voorspelling op het moment van oogsten of een dag voor oogsten uitgevoerd kan worden. Het onderzoek naar de genen die het beste gebruikt kunnen worden bij deze voorspelling kunnen het efficiëntst bepaald worden op basis van materiaal dat oogstbaar is of een dag voor de oogst al van het bed is verzameld. Omdat onderzoek naar voorspellers het beste uitgevoerd kan worden met partijen van redelijke extreme goede en slechte bewaarkwaliteit is er aan Greenery, Banken en PrimeChamp gevraagd een lijstje van bedrijven samen te stellen met telers met vlakke (goede) kwaliteit, wisselde kwaliteit en zeer wisselende kwaliteit. Uit deze telers is vervolgens een keuze gemaakt op basis van locatie en of ze aan het onderzoek willen meewerken.

Voor de sampling is er een keuze gemaakt voor champignons die zich midden in vlucht 2 bevinden, die op moment van oogst 50 mm zijn en dan op de dag voor de oogst 35 mm hoed diameter hebben (zie figuur 1). Deze monsters zijn midden op een bed in de cel genomen op 2 opeenvolgende dagen. Er zijn ook foto's genomen zodat mogelijk afwijkingen ook nog via foto's mogelijk te herleiden zijn. Monsters zijn niet van verdacht champignons genomen maar van de gemiddeld goede champignons die terplekke op het bed stonden en aan de eerder genoemde omschrijven voldeden. Op beide opeenvolgende dagen is op dezelfde plaats in de kas materiaal verzameld.

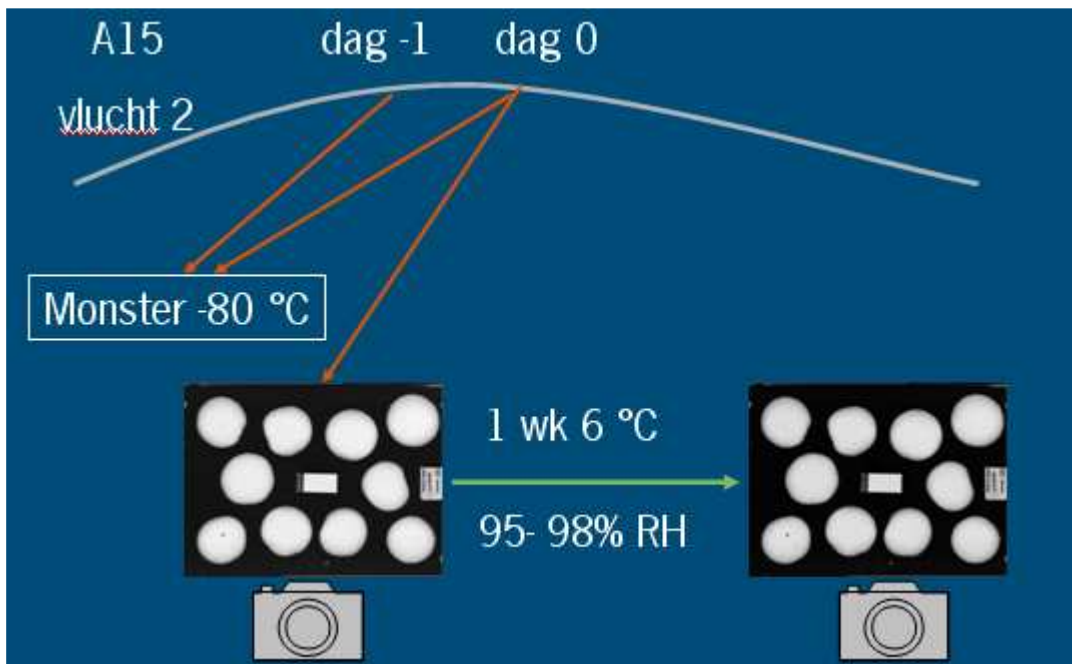


Fig 1. Overzicht van het bemonster, invries en bewaarkwaliteit analyse.

De 35 mm dag -1 samples zijn in zijn geheel in stukjes gesneden en ter plaatsen in vloeibaarstikstof ingevroren en vervolgens in koelboxen naar A&F vervoerd waar ze in vriezers bij -80 graden zijn bewaard. Van de 50 mm dag 0 samples zijn de kapjes van de hoed genomen en ingevroren in wederom vloeibaarstikstof. Door alleen het kapje te nemen beperk je het weefsel tot het weefsel wat later ook het verschil in verkleuring en witheid geeft en beperk je de actieve genen ook zoveel mogelijk tot de meest relevante (genen actief in lamellen zijn bv minder interessant voor dit doeleinde). Van dezelfde dag 0 samples zijn vervolgens 2 trays, met 10 champignons ieder, verzameld en in koelboxen met koelelementen (temperatuur tussen 2 en 5 graden) naar A&F vervoerd. Daar zijn direct bij aankomst van de champignons, onder standaard condities, Computer Beeld Analyses (CBA) gemaakt en zijn er waarnemingen gedaan waaronder schubbigheid, ontwikkelingsstadium en verkleuring van snijvlak. Vervolgens zijn de trays met champignons zonder verdere aanraking in vochtige bakken geplaatst met slechts enkele kieren voor ontluchting (vochtigheid 96-98%) en zijn de bakken met champignons 7 dagen bij 6 graden bewaard. Deze condities zijn gekozen op basis van het bijna gelijk lopende 'buffering in de keten' project waar verschillende bewaarcondities waren getest. Na deze periode zijn wederom CBA analyses gemaakt en zijn de uiterlijke kenmerken bepaald.

Uit de praktijk zijn er soms verhalen dat houdbaarheid direct koppelt aan compost of behandelingen op het bed zoals watergifte of CaCl₂ behandelingen. Om dit te onderzoeken en tevens om er zeker van te zijn dat partijen die goede of slechte bewaarkwaliteit tonen niet ook correleren met dergelijke andere factoren zijn bij de bedrijven teeltgegevens verzameld. Middels interviews, verzamelde data uit klimaatcomputers en opbrengsten gegevens zijn deze variabele in kaart gebracht. Deze gegevens hebben geleid tot een grote tabel die te vinden is in de bijlage waarbij de telers anoniem zijn gemaakt. Een schematische weergave van enkele teeltgegevens zijn ook te zien in figuur 2.

Nadat alle CBA analyses van de 40 partijen, en de daaraan gekoppelde teeltgegevens, waren verzameld is er gekeken naar correlaties tussen teeltachtergronden en bewaarkwaliteit. Die zijn er niet gevonden, er kan dus niet een bepaalde teeltfactor aangewezen worden die voor een groot deel bijdraagt aan de houdbaarheid van een partij. Deze gegevens zullen later nog van pas komen wanneer correlaties met genen gelegd gaan worden en er mogelijk partijen zijn die zich afwijkend gedragen. In zo'n geval kan gekeken worden of een teelt factor aangedragen kan worden die samen met de genen een betere voorspeling geven.

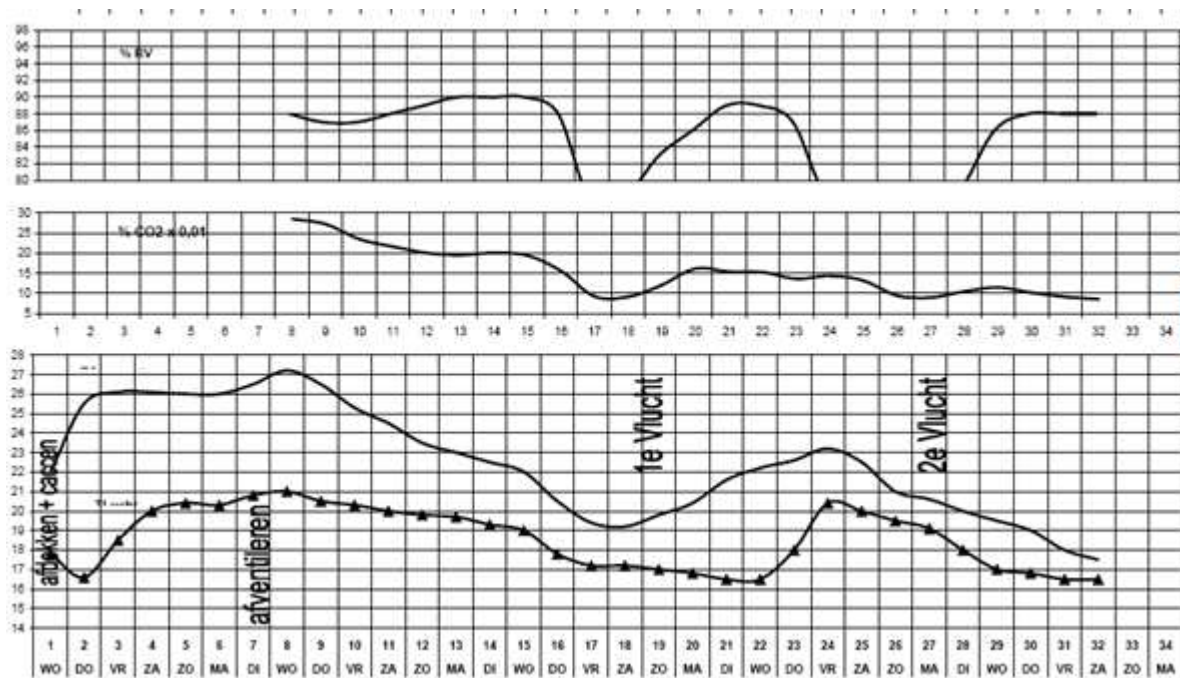


Fig 2. Een voorbeeld van de verzamelde klimaat condities. Bovenste blok %RV, middelste blok CO2 percentages, onderste blok lucht en compost temperatuur.

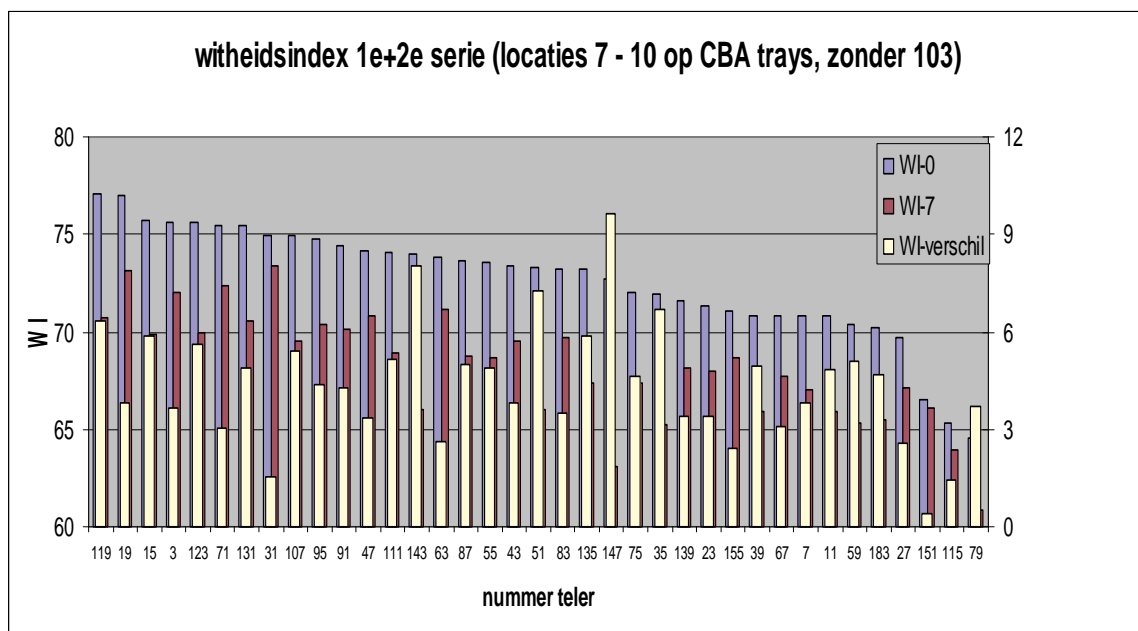


Fig 3. Witheidindex van de verzamelde monsters. De WI op dag 0 en dag 7 uitleesbaar op de linker as, het verschil tussen beide waarden uitleesbaar op de rechter as. De monsters zijn gerangschikt naar WI op dag van oogst.

Een overzicht van de CBA gegevens, witheidindex en %verkleuring, van de bemonsterde partijen is te zien in figuren 3 en 4. Daaraan is af te lezen dat er een aantal partijen al laag begonnen in WI en lichtelijk afwijken van de andere partijen. Deze partijen zijn daarom niet geselecteerd voor verdere analyse omdat deze op het oog al slechter zijn en keurmeesters dit soort partijen er wel uithalen. De uitdaging ligt in de partijen die op het moment van oogst nog gelijk zijn maar na 7 dagen een duidelijk verschil in kwaliteit laten zien. Voorbeelden van dergelijke interessante partijen zijn 143 in negatieve zin en 7 in positieve zin.

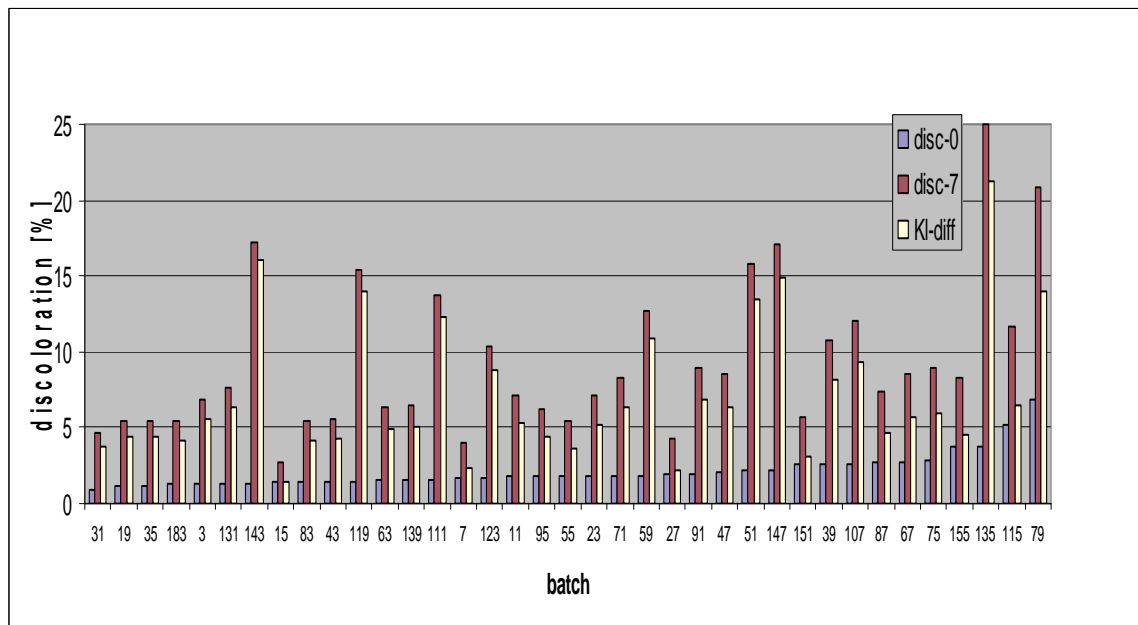


Fig 4. Verkleuring (%) van de bemonsterde samples. De monsters zijn gesorteerd op volgorde van %verkleuring op moment van oogst.

Beide beginnen met een nagenoeg gelijke WI maar eindigen na 7 dagen bij 6 graden met een verschil in WI. De gelijke partijen zijn vervolgens allemaal geanalyseerd op WI en % verkleuring op dag 0 en verschillende WI en % verkleuring na 7 dagen en tevens rekening houdend met uitmiddelen van diverse andere parameters zoals ontwikkelingsstadium, schubbigheid en snijvlak verkleuring (zie figuur 4). Tevens zijn teelt variabele over beide groepen meegewogen. Alles meewegend is er een keuze gemaakt voor partijen waarvan wij denken dat ze het beste de verschillende te voorspellen kwaliteitsklassen representeren. Een aantal partijen die bij oogst niet in kwaliteit zijn te onderscheiden maar na bewaring wel duidelijk verschillend zijn in kwaliteit. Met deze partijen zijn vervolgens microarray experimenten uitgevoerd om te onderzoeken welke genen mogelijke indicator genen zijn en dus het beste gebruikt zouden kunnen worden om deze bewaarpotentie te voorspellen.

Tabel 1. Overzicht van de geselecteerde partijen voor verdere analyse.

sampel	WI 0	WI 7	WI ver	% verkl		
				0	7 ver	
82	73.2	69.7	3.5	1.4	5.5	4.1
62	73.8	71.2	2.6	1.5	6.4	4.9
138	71.6	68.2	3.4	1.5	6.5	5.0
Gem	72.9	69.7	3.2	1.5	6.1	4.7
146	72.6	63.1	9.5	2.2	17.1	14.9
110	74.1	68.9	5.2	1.5	13.8	12.3
106	74.9	69.5	5.4	2.6	12.0	9.4
122	75.6	70.0	5.6	1.6	10.4	8.8
Gem	74.3	67.9	6.4	2.0	13.3	11.3

Tabel 1 geeft de geselecteerde monsters weer. Ook deze selectie is nader bestudeerd met de teeltgegevens erbij om er zeker van te zijn dat er tussen de goede en slechte klassen ook geen andere teelt factoren volledig uitsplitsen. Wederom is dat niet het geval. Wel kunnen we een aantal opmerkingen maken bij de geselecteerde partijen en in het algemeen:

- Bij de goede groep is iets meer compost in de bedden gebruikt maar dit had geen effect op lucht-composttemperatuur.
- Bij de goede groep is iets minder bijvoedmiddel gebruikt en daarmee kan een iets lagere compost activiteit verwacht worden. In de goede teelt 83 is de activiteit van het compost zeer gering wat echter niet een zwakke maar in dat geval een goede champignon opleverde.
- Watergeven tijdens de vlucht wordt als een risico gezien voor de kwaliteit. In 3 van de 5 slechte teelten is inderdaad water gegeven tijdens de tweede vlucht, echter ook in een goede teelt is water gegeven. Hieruit kan dus niet concluderen dat water geven tijdens de oogstperiode niet goed is.
- In 4 van de 5 slechte teelten is de relatieve luchtvochtigheid gedurende een aantal dagen aan het begin van de tweede vlucht laag. Het is niet bekend of lage RV, dus flinke verdamping, een relatie kan hebben met het kwaliteitsverloop.
- 1 teler met een slecht resultaat (nummer 143) heeft tijdens de tweede vlucht gechloreerd sproeiwater op de knoppen gesproeid. Van chloor is bekend dat het de champignons kan verkleuren. De champignons zagen er bij de pluk mooi wit uit.
- Er zijn tussen beide groepen geen opvallende verschillen in klimaatinstellingen (lucht en composttemperatuur, CO2 en RV) en teelt duur. Alle tweede vluchten eindigen rond 30 en 33 dagen na vullen. Verder zijn er geen verschillen tussen de slechte en goede teler in substraatgebruik, watergiften, bestrijdingsmiddelen.
- De beoordeling bij oogst door Ed en Jos correleren niet met verwachte kwaliteitverloop. Van de nu geselecteerde 5 goede telers was hun beoordeling: 2 matig en 3 goed. Bij teelt 63 werd opgemerkt dat te veel stuks op de bedden stonden, deze teelt viel toch in de

goede klasse. Van de 5 slechte telers was hun beoordeling: 1 matig en 4 goed (1 zelfs zeer goed). Als de analyse methoden dus kloppen zoals de manier van meten en de relevantie van % verkleuring dan blijkt het dus zelfs voor ervaren personen dit slecht te kwantificeren en voorspellen.

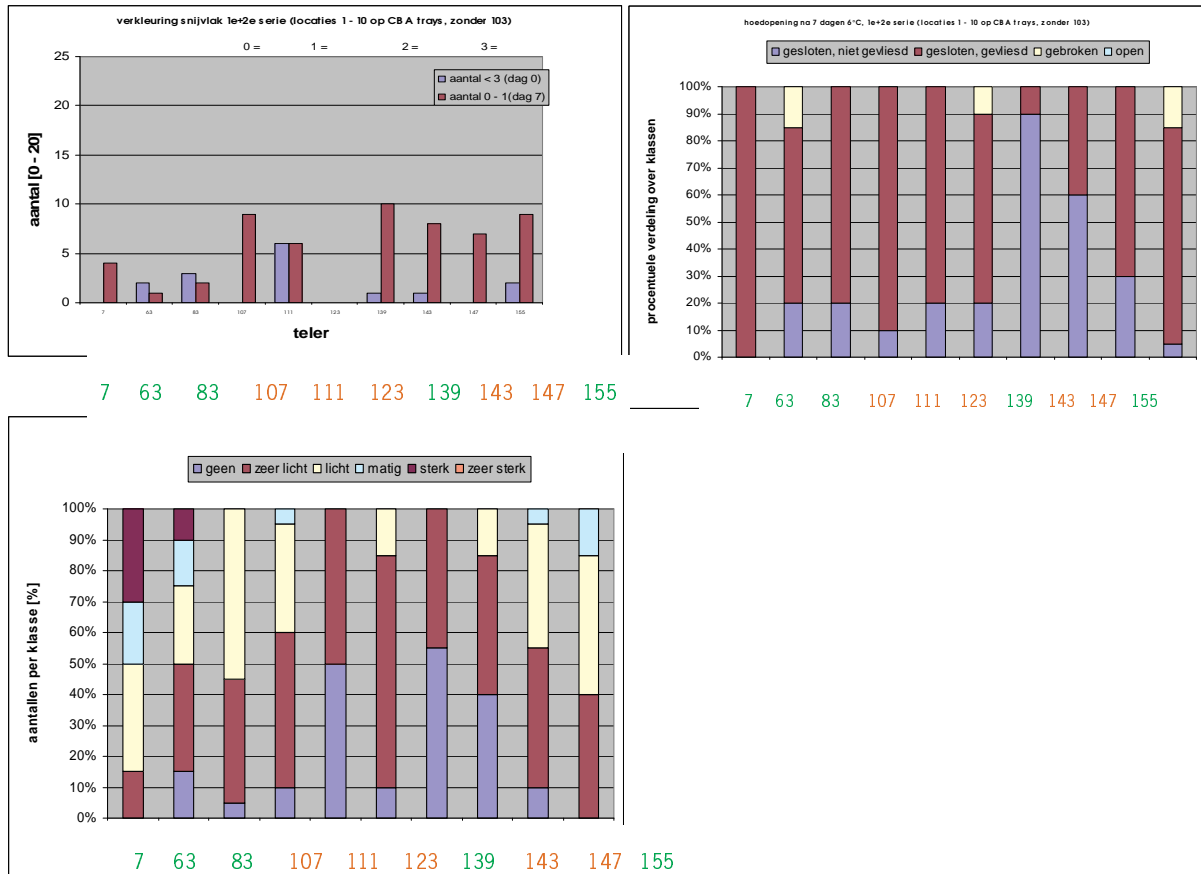


Fig 5. Overzicht van de geselecteerde partijen op basis van andere kwaliteitsparameters. Linksbovenste pannel is de weergave van snijvlak verkleuring, rechtsboven de ontwikkelingsstadia in klassen en linksonder de schubbigheid gescoord in klassen van schubbigheid en weergegevens als percentages van het totaal.

3. De champignon microarray

Ter herinnering nog even de achtergrond van de microarray. De microarray bestaat uit stukjes DNA die we uit champignons hebben gehaald die kleine verschillen in bruin verkleuring lieten zien. Deze beide DNA pools afkomstig van witte en iets verkleurde champignons zijn van elkaar afgetrokken om de meest verschillend tot expressie komende genen te selecteren. Van deze genen is vervolgens de DNA volgorde bepaald en zijn er zoveel mogelijk unieke genen geselecteerd om op de array te plaatsten. Omdat er nog ruimte over was zijn er ook nog een aantal niet gesequencde DNA fragmenten aan de array toegevoegd. Deze zouden kunnen overlappen met andere genen op de array waar we de sequentie wel van kennen maar dat is dus onbekend. Naast deze eigen nieuwe sequenties zijn er een aantal DNA sequenties uit de publieke database gehaald waarvan verwacht wordt dat ze mogelijk een rol spelen bij houdbaarheid van champignons. Deze DNAs zijn vervolgens allemaal vermeerderd, opgezuiverd en gespot op een klein microscoopglasje, de microarray. Dit is gedaan in 2003, de array zijn intussen al weer meer dan 4 jaar oud. Het is onbekend of deze lange bewaring van de microarrays effect kan hebben op de kwaliteit van de arrays omdat elke array die specifiek gemaakt wordt weer andere eigenschappen kan hebben. We zijn daarom bij de nieuwe experimenten met deze arrays weer even gaan optimaliseren voor de juiste hybridisatie condities. Daarbij wordt eerst het RNA geïsoleerd uit het ingevroren weefsel, gekwantificeerd en wordt vervolgens hetzelfde RNA in twee gelijke hoeveelheden verdeeld. Het ene gedeelte wordt vervolgens van een rood fluorescerend stofje voorzien, het andere van een groen label. Wanneer nu beide bij de arrays gelijk gehybridiseerd worden zou op elke spot even veel groen als rood signaal moeten ontstaan wat wordt omgezet door de analyse software in een gele spot. Zijn er veel spots te groen of alle spots te rood dan gaat er iets met de labeling van een van de kleurstoffen niet goed. Zijn er echter weinig spots, zijn de spots onregelmatig van grootte of zijn er andere problemen zoals dat er weinig signaal te zien is of ook naast de spots veel achtergrond signaal is kan dat komen door de kwaliteit van de array of door de hybridisatie condities.

Dit laatste was dus het geval. Weinig spots, veel onregelmatige achtergrond signaal, onregelmatige gevormde spots. Dit is enerzijds te verklaren doordat dit de eerste generatie cDNA arrays zijn terwijl er nu meer gewerkt wordt met geheel synthetisch gemaakte arrays, maar anderzijds ook met de huidige kwaliteit of hybridisatie condities te maken hebben omdat eerdere arrays veel meer spots en een betere spot kwaliteit lieten zien. Daarom zijn er een aantal experimenten uitgevoerd om de hybridisatie condities te verbeteren.

Met het geoptimaliseerde protocol zijn vervolgens de geselecteerde partijen geanalyseerd op de array. Dit is gedaan met RNA dat gelijktijdig is geïsoleerd, gelijktijdig is gelabeld en ook de hybridisaties zijn uitgevoerd op dezelfde dag om zo min mogelijke variaties te introduceren.

Selectie van partijen

Zoals eerder vermeld werd er een selectie gemaakt van de partijen champignons afkomstig van verschillende telers die op de dag van oogst 50mm waren en waarbij er een verschil was na 7 dagen koude bewaring. Bij de selectie is rekening gehouden met de mate en het verschil in hoedopening. Hieronder in tabel 2 nogmaals het detail overzicht van de gebruikte partijen.

Tabel 2. Overzicht van de voor de microarray geselecteerde partijen.

Goed	Teler	-80 nummer		traynr	Opmerking	Witheid			Verkleuring		
		dag -1	dag 0			dag0	dag 7	verschil	dag0	dag 7	verschil
RONDE 1	Teler 2	5	6	7, 8	OK	70.8	67.0	3.8	1.6	4.0	2.4
RONDE 2	Teler 17	81	82	83, 84	OK	73.2	69.7	3.5	1.4	5.5	4.1
RONDE 2	Teler 6	153	154	155, 156	OK	71.1	68.7	2.4	3.8	8.3	4.5
RONDE 1	Teler 16	61	62	63, 64	OK	73.8	71.2	2.6	1.5	6.4	4.9
RONDE 2	Teler 16	137	138	139, 140	*	71.6	68.2	3.4	1.5	6.5	5.0
					Gem.	72.1	69.0	3.1	2.0	6.1	4.2
Slecht											
RONDE 2	Teler 3	141	142	143, 144	OK	74.0	66.0	8.0	1.3	17.3	16.0
RONDE 2	Teler 2	145	146	147, 148	OK	72.7	63.1	9.6	2.3	17.1	14.9
RONDE 2	Teler 13	109	110	111, 112	OK	74.1	68.9	5.2	1.5	13.8	12.3
RONDE 2	Teler 12	105	106	107, 108	OK	74.9	69.5	5.4	2.6	12.0	9.4
RONDE 2	Teler 10	121	122	123, 124	OK	75.6	70.0	5.6	1.6	10.4	8.8
					Gem.	74.3	67.5	6.8	1.9	14.1	12.3

* beetje extreem in hoedopening pos.

Tabel 3. Overzicht RNA isolatie.

Sample	RNA na precipitatie 29 ul			Totaal	H2O
	ng/ul	OD260/280	OD260/230	ug/ul	5 ug/ul
6	970.9	2.13	2.63	281.56	56.31
62	875.0	2.25	2.44	253.75	50.75
82	809.8	2.09	2.63	234.84	46.97
106	637.2	2.08	2.62	184.79	36.96
110	786.4	2.09	2.63	228.06	45.61
122	791.7	2.11	2.59	229.59	45.92
138	770.7	2.09	2.62	223.50	44.70
142	740.8	2.08	2.62	214.83	42.97
146	1017.8	2.11	2.59	295.16	59.03
154	917.9	2.1	2.63	266.19	53.24

Van de samples is vervolgens RNA geïsoleerd voor analyse in het microarray experiment. RNA is geïsoleerd met behulp van de RNeasy minikit van QIAGEN, waarna samples zijn gepoold en vervolgens met DNase I behandeld (omdat DNA stoort bij de analyse van RNA). Daarna zijn ze opnieuw gezuiverd via een Chloroform:IAA extractie. Via een isopropanol precipitatie-stap is het gezuiverde RNA teruggebracht tot een eindconcentratie van 5 µg/µl (Tabel 3.).

Goede en slechte champignonpartijen zijn via het ‘two color referent-design’ op een specifieke champignon cDNA array met elkaar vergeleken. Hierbij is het referentie materiaal (pool van RNAs waarin alle tot expressie komende genen aanwezig zijn) samengesteld volgens Tabel 4.

:
Tabel 4. Samenstelling van RNA referent.

Sample	Referent
6	25 µl = 125 µg
62	20 µl = 100 µg
82	20 µl = 100 µg
106	10 µl = 50 µg
110	25 µl = 125 µg
122	25 µl = 125 µg
138	20 µl = 100 µg
142	20 µl = 100 µg
146	25 µl = 125 µg
154	20 µl = 100 µg

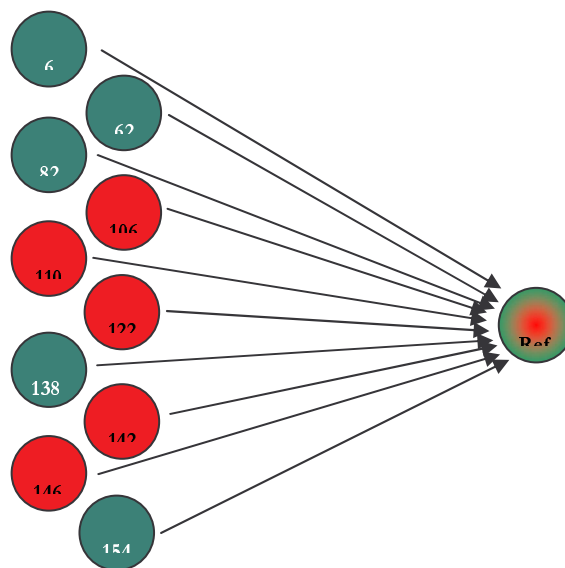


Fig 5. Overzicht van het twee-kleur referentie design van de microarray hybridisatie.

De RNA samples van de monsters en de referent zijn via een indirecte labeling gekoppeld met Cy5-dye (rood) en referent materiaal met Cy3-dye (groen, zie appendix 3). In een aantal gevallen verliep de koppeling niet met dezelfde efficiëntie en vond er meer Cy3 koppeling plaats dan Cy5 koppeling (zie onderstaande tabel). Hiervoor wordt via software matige rekenmethoden gecorrigeerd (genormaliseerd). Sommige slides hadden echter wasvlekken door onvoldoende wegwassen van los (niet specifiek gehybridiseerd) label. Daarom zijn enkele slides extra gewassen (en wanneer nog steeds onvoldoende) opnieuw uitgevoerd. De duplo spots op de arrays zijn apart ingelezen om later de replicerbaarheid van de spotintensiteit te kunnen volgen.

Data analyse met locale achtergrond correctie

Alle spots die voldeden aan de criteria SNR>2 zijn ingelezen in het programma GeneMath waarbij sample en referent in twee lagen worden gescheiden. Informatie als diameter en flags zijn in een aparte laag meegenomen om later bias als gevolg van wasvlekken of spotgrootte terug te

kunnen traceren. De achtergrond wordt via een normale subtractie gecorrigeerd en beide lagen zijn vervolgens log₂ getransformeerd. Vervolgens is de ratio target/referent genomen.

De intensiteit verschillen tussen het Cy5 signaal en het Cy3 signaal waren niet normaal verdeeld.

Dit zou kunnen komen omdat er maar weinig spots op een array actief zijn en heel specifiek materiaal gebruikt is (kapje van hoed), in tegenstelling tot eerdere experimenten waarbij de hele hoed, inclusief plaatjes werd gebruikt.

Vervolgens zijn de expressie data per slide geclusterd. Slide #22 groept samen in één cluster met slide #21, #19 en #25. Slide #20 en #23, die ook slechte partijen vertegenwoordigen clusteren echter apart van deze cluster. De ‘goede partijen’, met uitzondering van #22, clusteren wel mooi samen.

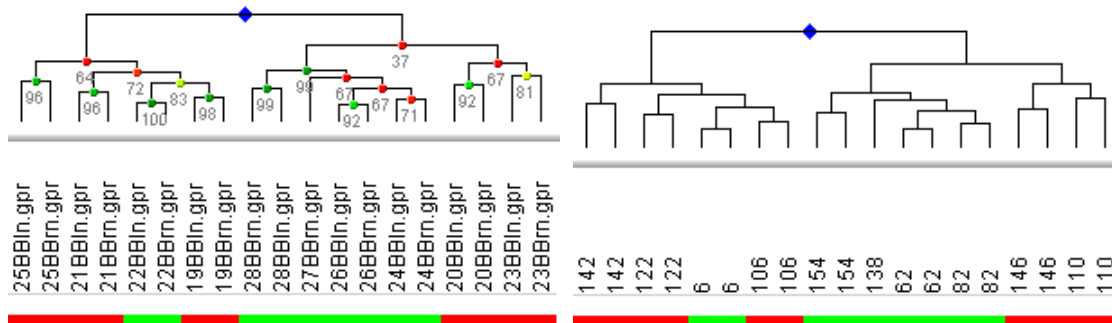
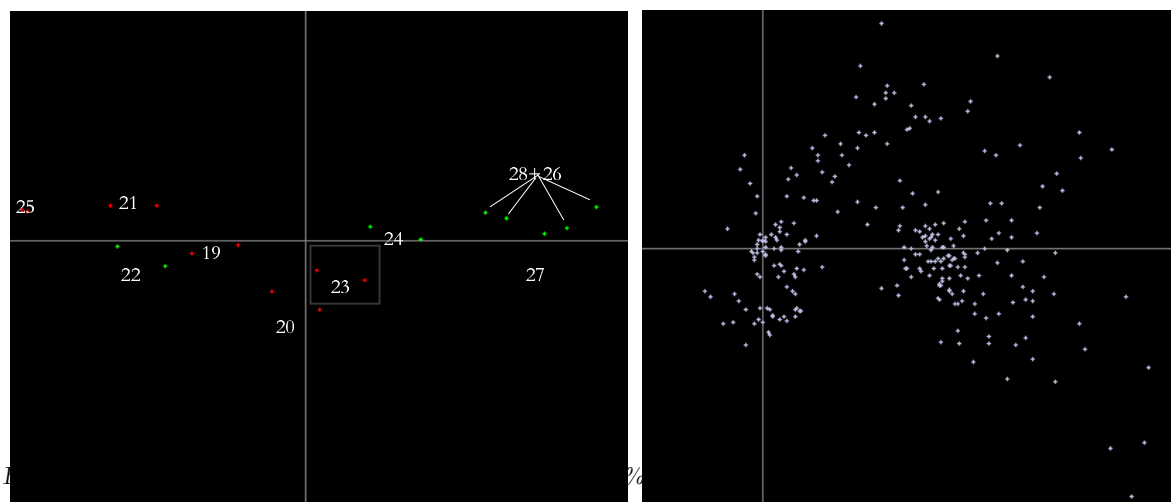


Fig 6. Clusteranalyse met pearson correlatie en bootstrap analyse. Links; slide nummers. Rechts; sample nummers.

Een Principal Component Analyse (PCA) geeft hetzelfde weer als de clusteranalyse over de arrays (zie figuur 7). De samples worden vrij goed uit elkaar getrokken, met de duplo's dicht bij elkaar maar de goede partijen en de slechte partijen zijn voornamelijk met alleen de X-component te onderscheiden en liggen dus niet ver van elkaar. De genen zijn weergegeven als twee aparte wolken, wat te verwachten is van een niet normale verdeling.



Om diverse redenen van betrouwbaarheid van de arrays wordt er alleen verder gegaan met de slides van de partijen 62, 82 en 138 voor de goede partijen en 146, 110, 106 en 122 voor de slechte partijen. Een clusteranalyse tussen de 7 geselecteerde partijen levert een betere scheiding op tussen de goede en slechte partijen, met een ondercluster in de slechte partijen. Door middel van 'pattern matching' wordt de verkleuring op dag 7 vergeleken met het verloop in genexpressie. Door een criterium van $p < 0.7$ aan te houden kan een selectie van genen gemaakt worden die het verloop van de verkleuring op dag 7 redelijk volgen.

Een principal component analyse levert bij deze selectie van partijen een redelijke scheiding op, met een 43,7% verklarende X-component, een 13,9% verklarende Y-component en 9,7% voor de Z-component. Bij een PCA analyse worden vectoren berekend, die de variatie in de genexpressie het meest kunnen verklaren. Dit betekent dat een target niet in een bepaalde cluster of vlak gedwongen wordt. Dit is niet het geval bij een Discriminant Analyse. Hierbij bepaal je van te voren in welke groep een target, eventueel gedwongen, wordt ingedeeld. Tussen de PCA analyse en de Discriminant Analyse komen gedeeltelijk dezelfde kwaliteitindicatorgenen naar voren (fig 8).

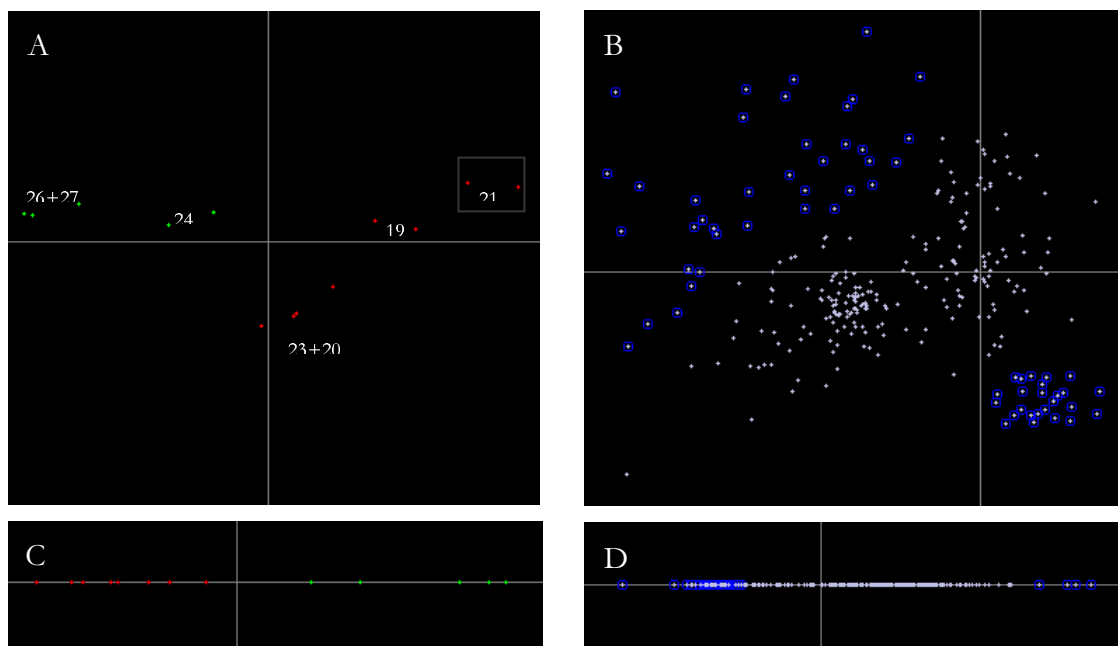


Fig 8. PCA (A & B) en Discriminant Analyse (C & D) voor de 7 geselecteerde partijen.

De hele procedure van analyse is nogmaals herhaald waarbij de eerste correcties/normalisaties op een andere manier zijn uitgevoerd, namelijk door gebruik te maken van de lege spots op de array. De gedachte achter deze achtergrond correctie is dat in deze lege spots de hybridisatie condities hetzelfde is als voor de rest van de spots en dat het signaal van deze lege negatieve spots een betere benadering voor de achtergrond zijn dan de lokale achtergrond om een spot heen.

Een PCA-analyse geeft hetzelfde beeld weer als de clusteranalyse, waarbij slide #22 bij de slechte partijen samen groepeerd. Dit was ook het geval bij de analyse met lokale achtergrond correctie.

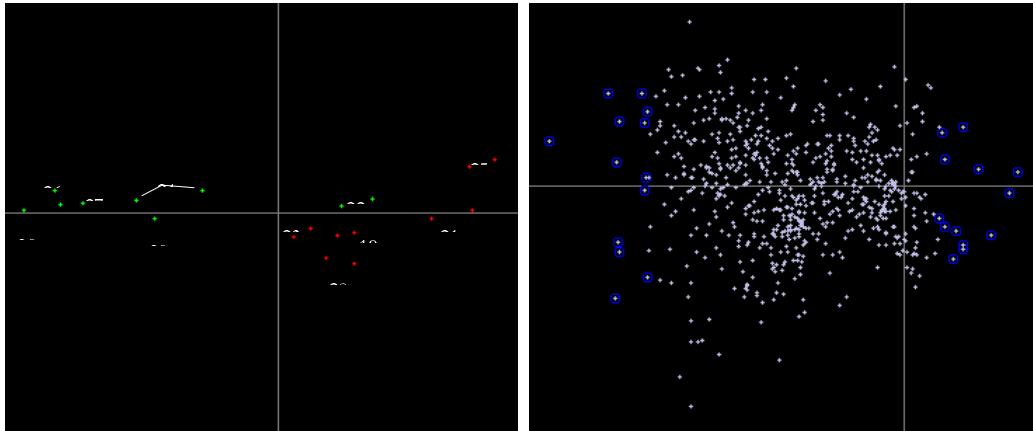


Fig 9. PCA analyse over alle arrays. X-component verklaart 47,9% van de variatie, de Y-component 8,4% en de Z-component 5,4%.

Een PCA en Discriminant analyse laten een duidelijke scheiding zien tussen goede partijen en slechte partijen. De genenwolk die de PCA verklaart is erg breed en verspreid waardoor een selectie van goede indicatorgenen bemoeilijkt wordt. Genen die het meest aan de rand liggen zijn met de hand geselecteerd in de hoop dat dit de meest verklarende componenten zijn.

Een 'pattern matching' analyse levert nu wel indicatorgenen op die redelijk het kwaliteitsverloop volgen. Er is zowel een positieve als een negatieve vergelijking uitgevoerd (toename of afname van expressieprofiel) met als voorwaarde $p < 0,7$.

Herhaling van Microarray experiment in enkelvoud

Om zeker te zijn van de verkregen resultaten is er gekozen voor een herhaling van het hele voorgaande experiment. Dit keer zijn de samples in enkelvoud getest omdat het aantal nog resterende microarray slides onvoldoende was voor een heel experiment in duplo.

Op basis van nanodrop metingen was te concluderen dat de dye koppelingen dit keer beter waren verlopen. Het aantal spots dat een $SNR > 2$ bevat was echter lager dan de vorige keer. Een van de oorzaken hiervoor is de meer stringente wasstappen na hybridisatie. Dit is gedaan om achtergrond signaal te reduceren. De slides zijn inderdaad veel schoner.

Een selectie van genen die 80% of minder missing values bezitten zijn overgebracht naar een aparte subset en lege plekken zijn ingevuld via een K-nearest neighbour (euclidian distance).

Wanneer een PCA analyse wordt uitgevoerd, worden de slechte partijen champignons gescheiden van de goede partijen. Met de 'lasso-techniek' zijn de uiterst links en rechts liggende genen geselecteerd.

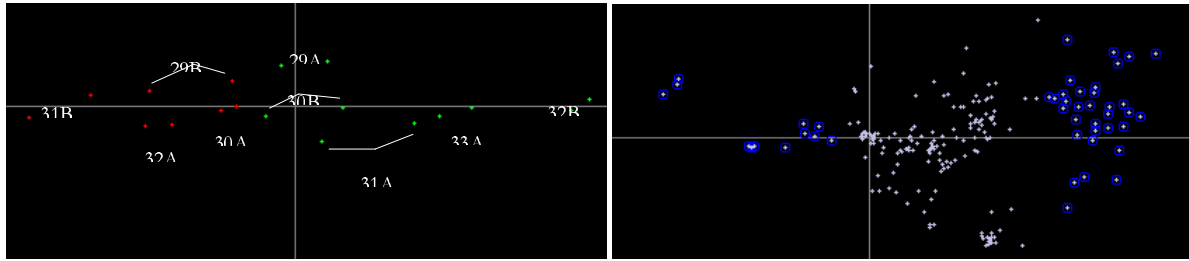


Fig 10. PCA analyse. X-component verklaart 61,4% van de variatie, de Y-component 8,2% en de Z-component 5,4%.

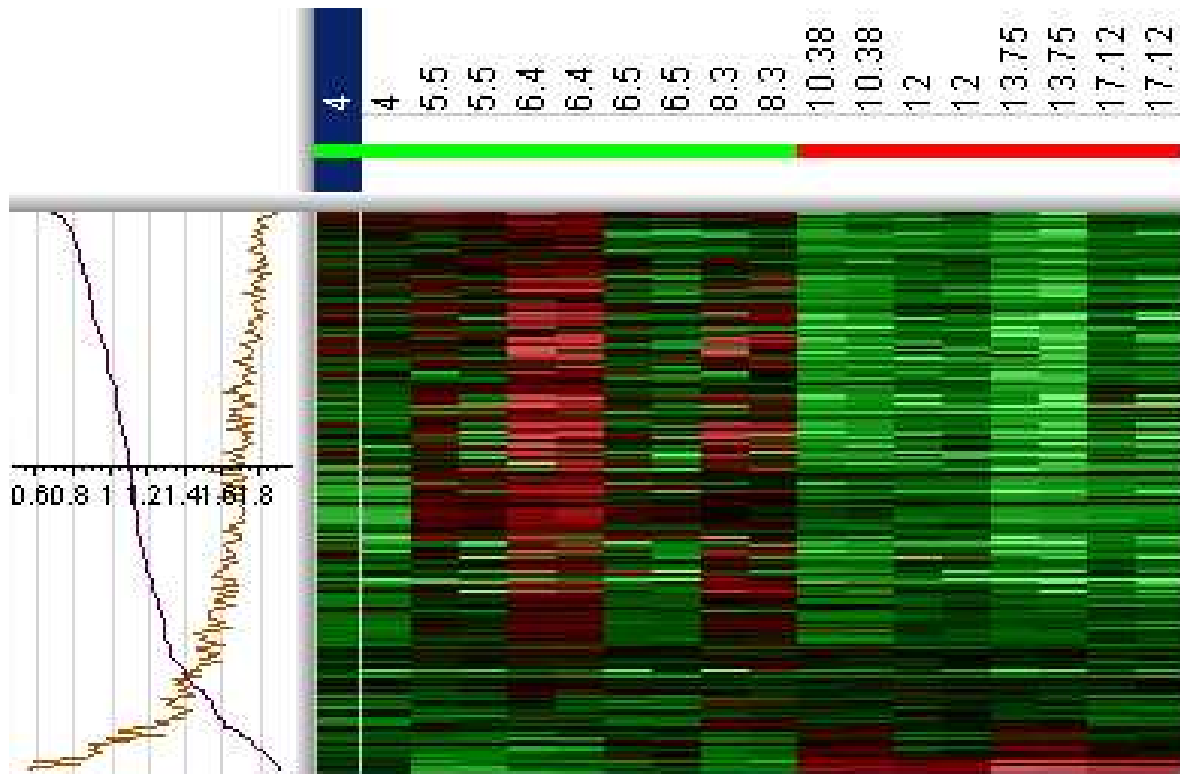


Fig 11. Pattern matching analysis.

Pattern matching levert in totaal maar 5 genen op wanneer een criterium van $p < 0.7$ aangehouden wordt. Opmerkelijk is dat vier van deze genen potentiële tyrosinase genen zijn..

Hoewel de kwaliteit van de slides minder optimaal waren, waarschijnlijk door de tijd tussen printen en gebruik, was het toch mogelijk om een reeks van potentiële indicatorgenen te selecteren. Dit is gedaan door de genen van de verschillende software matige benaderingen te rangordenen en genen te selecteren die in meerdere analyses een hoge waarschijnlijkheid van betrokkenheid met de eigenschap tentoonstellen. De betrouwbaarheid van deze genenlijst moet natuurlijk verder geëvalueerd worden omdat het niet te voorspellen is hoeveel bias er veroorzaakt is door de hoge achtergrond signalen aanwezig in het microarray-experiment. De bruikbaarheid van de gevonden genen voor voorspelling van kwaliteit kan alleen getoetst worden met een

uitgebreide validatie van de gevonden indicatorgenen door middel van qPCR. Belangrijk hierbij is dat er voldoende goede en slechte kwaliteit samples gebruikt worden om de correlatie tussen het genexpressie- en kwaliteitsverloop optimaal te testen.

4. Op weg naar een assay voor de praktijk

Voor de praktijk is het natuurlijk belangrijk hoe een uiteindelijke assay eruit komt te zien en wat daar voor nodig is. Allereerst heb je de indicator genen nodig waaraan de voorspelling straks is af te lezen. Hoe de expressie gegevens straks in een bepaald advies vertaald zal worden zal in overleg gaan in de implementatie fase met de bedrijven die de test wensen te gebruiken en voor hun product en keten willen afstemmen. Maar naast de genen en de classificatie is er meer nodig. De array zoals gebruikt in deze studie is namelijk te duur om routinematig te gebruiken. Hiervoor moeten de geselecteerde genen omgezet worden in een andere expressie analyse methode namelijk Real Time PCR of qPCR (kwantitatieve PCR). In het vorige onderzoek is er al ervaring op gedaan met het vertalen van gen expressie op de array naar genen met Real Time PCR. We hebben toen laten zien dat voor 5 van de 6 genen deze vertaalslag heel goed ging maar dat 1 gen juist een heel ander beeld liet zien met Real Time PCR dan we dachten te vinden op basis van microarray gegevens. Dit komt vaker voor door allerlei mogelijkheden. Maar 5 uit de 6 die goed gingen is een mooie score die vertrouwen geeft dat de meeste van de 30 genen die we nu zouden selecteren wel efficiënt over te zetten zijn naar een Real Time PCR test.

Dan de sampling. Het zou te duur zijn als een analyse service laboratorium alle bedrijven langs zou moeten (met bv vloeibaar stikstof) om monsters op te halen. Bij andere toetsen is dit opgelost met een monsterkit die is samengesteld door Nsure, het spin-off bedrijf van WUR dat degelijke testen op een routinematige basis aanbieden. De kit bestaat uit een zakje, een druppelaar en een kaartje. Het is de bedoeling dat de champignon of een steekproef van materiaal in het zakje gestopt wordt met wat water. Vervolgens het champignon weefsel goed vermalen wordt en dan een druppeltje vloeistof met de druppelaar op het kaartje wordt gedruppeld. Zodra deze druppel is ingedroogd kan het kaartje met de post opgestuurd worden naar het onderzoekslaboratorium. Daar wordt een stukje uit het kaartje gesneden waaruit het RNA wordt geïsoleerd. De opbrengst aan RNA is dan niet veel maar genoeg voor het uitvoeren van de Real Time PCR testen.

Deze methode hebben we ook voor champignon getest. Indien er geen water aan de champignons werd toegevoegd bij het malen bleek het RNA van slechte kwaliteit en brak het af tijdens het isoleren van de kaartjes. Bij het malen in water ging het al beter. Er werd een vergelijk gemaakt met de methode waarbij het materiaal ingevroren werd in vloeibaar stikstof, onze standaard methode. Van de 3 genen die vervolgens geanalyseerd werden met Real Time PCR gaven 2 een vergelijkbaar resultaat, echter een gen week af tussen beide methoden. Het kan dus zijn dat onstabiele RNA moleculen nog niet genoeg gebufferd worden tijdens het malen en fixeren op de kaartjes. Daarom zou dit protocol nog iets verder geoptimaliseerd moeten worden zodat alle RNA's die gebruikt zullen worden voor de kwaliteitsdiagnostiek gestabiliseerd worden. Te denken is aan oxidase inhibitors omdat we verwachten dat deze oxiderende enzymen en metabolieten schade kunnen aanbrengen aan de RNAs.

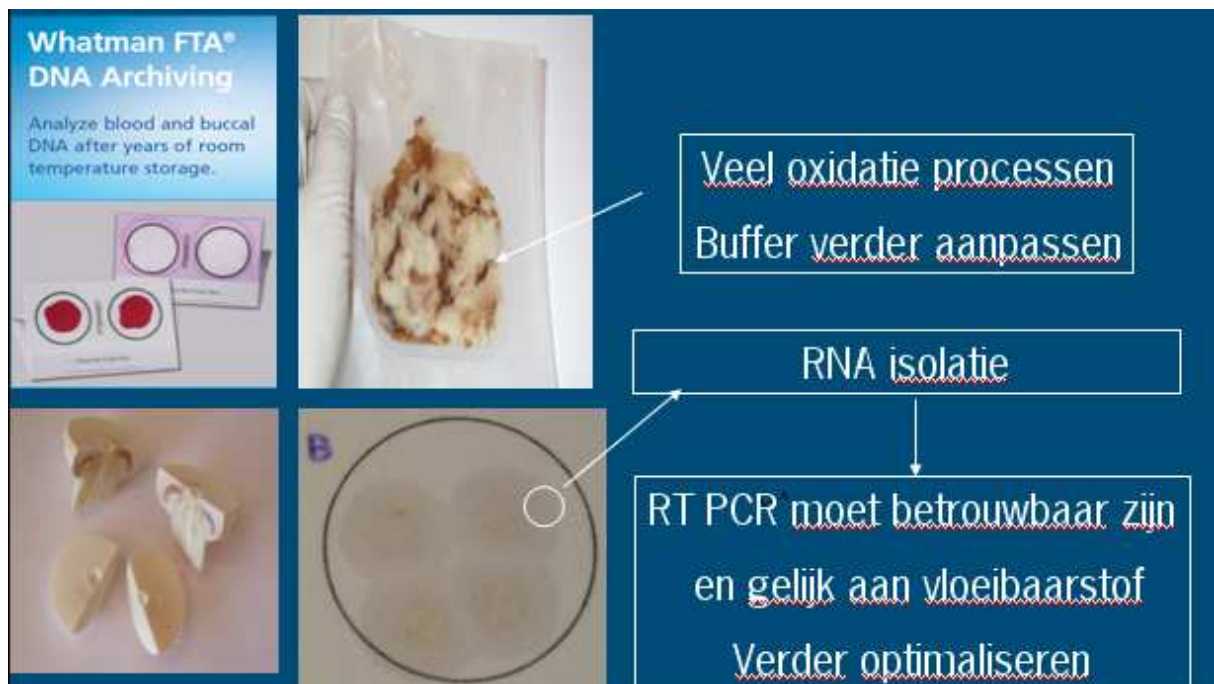


Fig 12. Overzicht van het kaartje en methode die gebruikt wordt voor het routinematig bemonsteren.

5. Conclusies

- Wederom is gebleken dat het kwaliteitsverloop van partijen variabel en met huidige visuele tools en productkennis niet te voorspellen is.
- Er zijn geen teelt factoren gevonden die kwaliteitsverloop zouden kunnen voorspellen.
- Uit de samples zijn 9 partijen geselecteerd die verdeeld werden in goed houdbare en slecht houdbare partijen. De meest extremen partijen zijn hier niet in opgenomen.
- De microarrays zijn uitgevoerd met dag 0 samples die eigenhandig van het bed waren geoogst.
- Microarrays leken wel enigszins in kwaliteit achteruit gegaan, er is extra moeite gedaan de experimenten te optimaliseren.
- Op een enkele partij na (en afhankelijk van de analyse) konden de partijen op basis van verschillen in genexpressie verdeeld worden in dezelfde klasse indeling die gevormd was op basis van bewaarbaarheid 7 dagen bij 6 graden..
- De microarrays hebben geleid tot een selectie van genen die het vaakst voorkomen als indicator genen in de verschillende analyses.
- Binnen de selectie genen waarvan een mogelijke biologische functie bekend is zitten veel genen waarvan aannemelijk is dat ze een rol kunnen spelen in bruinverkleuring
- Kleine optimalisaties aan de routinematige bemonstering methode, de FTA scorecard, zullen nodig zijn voor betrouwbare implementatie in de praktijk
- Dit onderzoek legt een goede basis voor het verder ontwikkelen van de test; er ligt een mooie verzameling aan materiaal om de toets op te ijken en we kunnen een selectie maken van rond de 30 genen waarbinnen de belangrijkste indicator genen geselecteerd kunnen worden. Voor een toets zullen deze eerst in een Real Time PCR omgezet moeten worden.

1. Vervolgtraject

Nu er een selectie uit de honderden mogelijke genen gemaakt kan worden en er een grote verzameling aan dag 0 en dag -1 samples in de vriezer liggen waaraan het kwaliteitsverloop bekend is kan met weinig inspanning de volgende stap gezet worden. Daarvoor zouden de genen omgezet moeten worden in Real Time PCR en moet vervolgens van zoveel mogelijk partijen de gen expressie bepaald worden. Daarna zal blijken of we ook op een grote reeks aan monsters tot een goede kwaliteitsvoorspelling in staat zijn en welke genen, van de 30, dat het best kunnen. We hopen met zo min mogelijke genen een zo groot mogelijk betrouwbaarheid in kwaliteitsvoorspelling te bereiken.

Hierna volgt een go/no go moment.

Bij een Go zal de volgende stap zijn om de sample methode verder te optimaliseren. Daarna volgt een fase waarbij gezamenlijk met geïnteresseerde bedrijven de methode in de praktijk geëvalueerd en geïmplementeerd wordt. Hierbij zal ook het spin-off bedrijf van WUR, Nsure betrokken worden en een belangrijke rol spelen.

- Tijdens de begeleidingscommissie vergadering is afgesproken dat een A4tje geschreven zal worden om geïnteresseerde te kunnen voorlichten over de methode, de mogelijkheden en de stand van zaken.
- Deze zal voorgelegd worden aan de PAC (via Jan Vink), de provincie (Anton Sonnenberg) en zoveel mogelijk organisaties in de versketens (Greenery, Banken, Primchamp etc) dit kan zowel via A&F, DLV, PT en PRI. ieder zal daarom deze A4tje toegezonden krijgen.
- Het zal ook bij de PAC van januari ingebracht en besproken worden om te overleggen of PT daar zich ook financieel aan gaat verbinden in samenwerking met andere bedrijven.
- Tevens zal aan Nsure voorgesteld worden hoe deze in dergelijke vervolg onderzoek kan participeren en eventueel financieel bijdragen