



Naar een beter substraatgebruik in de champignonteelt via rassen

Een genetische analyse

Johan Baars & Anton Sonnenberg

Productschap Tuinbouw project nummer 14969



Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Plant Breeding
April 2015

Rapport 2015-2

© 2015 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, Plant Breeding.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Plant Breeding

Adres : Postbus 386, 6700 AJ Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 – 48 13 35
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.wageningenUR.nl/pri

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Inleiding	2
2.1 De voorgaande fasen	2
3. Analyse van biologische efficiëntie van substraatgebruik	3
3.1 Selectie van champignonlijnen	3
3.2 Maken van kruisingen	3
3.3 Bevestigen van een kruising	5
3.4 Uitvoering van de teeltproeven	6
3.5 Opbrengsten aan champignons	7
3.6 Opbrengsten gekoppeld aan substraatgebruik	9
3.7 Hoe ziet de diallelmatrix er uit?	12
4. Conclusies en vervolgonderzoek	15
5. Gebruikte literatuur	16

1. Samenvatting

In 2014 is een nieuwe stap gezet in het project om tot een efficiënter substraatgebruik te komen in de champignonenteelt. Deze stap heeft twee doelen:

- Het bepalen van de *breeding value* (hoe gedragen de stammen zich in kruisingen en welke waarde hebben ze dus in de veredeling)
- Welke lijnen zijn geschikt om segregerende populaties te maken. Deze populaties zullen gebruikt worden om genomische gebieden/genen te vinden die de verschillen in efficiëntie in substraat gebruik kunnen verklaren.

De kennis kan gebruikt worden voor zowel veredelen op substraatgebruik als het vinden van alternatieve grondstoffen voor het maken van substraat. Er is in 2013 een selectie gemaakt van negen wild-isolaten en één commercieel ras van de champignon. Deze stammen dekken de hele variatie van de collectie van Plant Breeding in de efficiëntie van het substraatgebruik (uitgedrukt als g droge stof aan champignons per kg verbruikte organische stof) ook wel biologische efficiëntie genoemd (BE).

De lijnen zijn in alle mogelijke combinaties met elkaar gekruist en van de succesvolle kruisingen is in 2013 en 2014 in drie teeltproeven de biologische efficiëntie bepaald. Hierbij bleek dat de vers opbrengst aan champignons van teeltproef tot teeltproef aanzienlijk kan variëren. Daarnaast bleek dat bij vergelijking van de teeltproeven ook de biologische efficiëntie flink varieert.

Dit alles heeft effect op de nauwkeurigheid waarmee voor kruisingen de biologische efficiëntie kan worden ingeschat. Statistische analyse laat een vrij grote waarde voor het kleinste betrouwbare verschil zien. Dat houdt in dat we onze onderzoeksmethode moeten verbeteren voordat we met enige kans op succes segregerende populaties kunnen gaan analyseren op biologische efficiëntie met de bedoeling om QTL's voor deze eigenschappen te vinden.

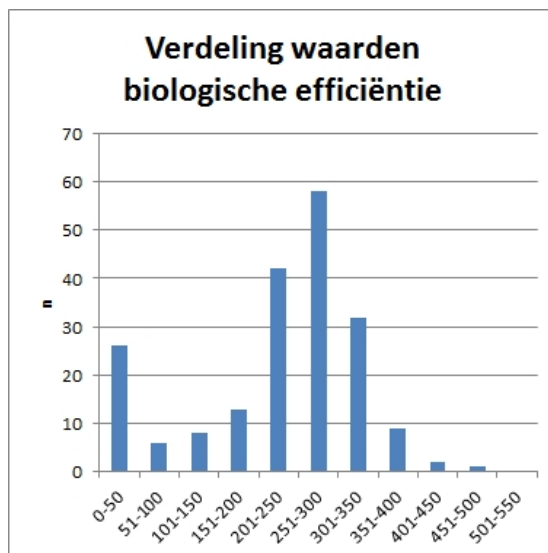
2. Inleiding

2.1 De voorgaande fasen

Vanaf 2012 is de biologische efficiëntie van het substraatverbruik van champignon bestudeerd (Baars et al, 2012. Substraatgebruik en biologische efficiëntie van champignon accessies uit de collectie Plant Breeding Wageningen UR). In teeltproef werden daarvoor, verdeeld over twee teeltruimten (cel 2 en 3), 66 genetisch onderling verschillende champignonisolaten geteeld in 6 herhalingen (3 herhalingen per teeltruimte = 198 kistjes). Deze teeltproef werd uitgevoerd in de periode medio juli tot medio september 2012 in kisten per 0.1 m² teeltoppervlak en 8 kg compost per kistje. De resultaten van deze proef lieten zien dat er grote verschillen zijn in de efficiëntie waarmee de verschillende champignonisolaten het substraat omzetten in paddenstoelen. Van een groep van 10 champignon isolaten werd duidelijk dat zij een uitzonderlijk lage champignonproductie hadden. Voor de overige 56 champignonisolaten varieerde de biologische efficiëntie tussen 129 g champignons/kilogram verbruikte organische stof (beiden op basis van drooggewicht) en 395 g champignons/kilogram verbruikte organische stof. Aangezien het asgehalte in compost niet altijd even hoog is, werd de biologische efficiëntie uitgedrukt op basis van organische stof. Dit maakt het mogelijk om resultaten op verschillende compost batches nauwkeuriger te vergelijken. Een histogram van de gevonden 198 waarden laat zien dat deze normaal verdeeld zijn als de zeer slecht producerende lijnen buiten beschouwing worden gelaten (de klasse 0-50, Figuur 1). Van deze stammen produceerde niet elke herhaling paddenstoelen.

De gevonden variatie kan in principe worden gebruikt voor veredeling op biologische efficiëntie (productie champignons per gewichtshoeveelheid substraat). Hiervoor is een selectie

gemaakt van stammen die de hele range dekken van de biologische efficiëntie zoals die is gevonden in de collectie (zie Tabel 1). De selectie is gemaakt met het doel deze lijnen in alle mogelijke combinaties met elkaar te kruisen en van elke kruising weer de biologische efficiëntie te bepalen. Net als bij planten kunnen kruisingen tussen paddenstoel-rassen/stammen alleen gemaakt worden door haploide gameten van beide rassen met elkaar te paren. Daarvoor kun je de sporen (nakomelingen) gebruiken. Er is echter een andere, meer aantrekkelijke methode voor het maken van kruisingen. Elk paddenstoel ras is diploid, dat wil zeggen, elke cel in het mycelium bevat twee genetisch verschillende haploide kernen. Deze versmelten pas vlak voordat er sporen in de paddenstoel gevormd worden. Dat biedt de mogelijkheid om de beide kernen uit het mycelium te isoleren en twee typen mycelia te produceren die elk maar één type kern bevatten. Door dat van elke lijn te doen, kunnen deze haploide mycelia (homokaryons) van elke stammen op alle mogelijke manieren met elkaar worden gekruist. Van elke kruising kan vervolgens de biologische efficiëntie bepaald worden. De resultaten kunnen gebruikt worden om de *breeding value* van elke homokaryon in te schatten en te bepalen welke combinaties van homokaryons geschikt zijn om segregerende populaties te maken. De laatste wordt gebruikt om genomische gebieden/genen te vinden die (voor een deel) een verklaring geven voor de gevonden verschillen in biologische efficiëntie tussen de verschillende stammen. De kennis kan vervolgens gebruikt worden voor veredeling en om naar alternatieve grondstoffen te zoeken voor het bereiden van compost. Door het maken van dit type kruisingen wordt van elke stam voor elk gen (allele) de invloed in combinatie met het allele van een andere lijn getest op de eigenschap biologische efficiëntie (de zogenoemde di-allel matrix). Dit rapport beschrijft het maken van de kruisingen voor de di-allel matrix en de teeltproeven die met deze heterokaryons zijn uitgevoerd om de biologische efficiëntie vast te stellen.



Figuur 1. Verdeling van de waarden voor biologische efficiëntie.

3. Analyse van biologische efficiëntie van substraatgebruik

3.1 Selectie van champignonlijnen

Op basis van de resultaten van teeltproef 162004 die is uitgevoerd in 2012, is in 2013 een selectie gemaakt van 10 isolaten met sterk uiteenlopende biologische efficiëntie (Tabel 1). De selectie was mede gebaseerd op het voorhanden zijn van één of beide ouderlijnen als homokaryons. Daarnaast is geprobeerd om een mix te vinden van twee-sporige en vier-sporige rassen. In de twee sporige rassen worden de chromosomen vrijwel als parentaal (ouder)-type overge-erfd. De vier-sporige vertonen wel een normale recombinatie. In kruisingen tussen de twee typen is de normale recombinatie dominant zodat vier-sporigen en kruisingen tussen twee- en vier-sporigen goed voor veredeling kunnen worden gebruikt.

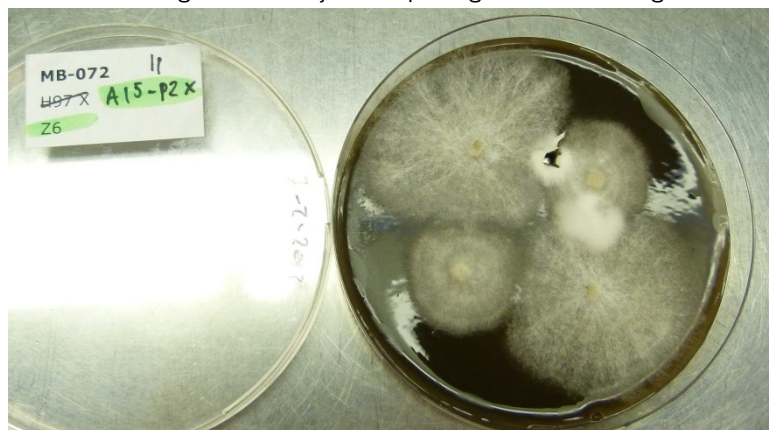
Tabel 1. Selectie van stammen met verschillen in biologische efficiëntie, zoals gemeten in proef 162004.

Isolaat	Biol. Eff. g DM / kg OM	p<0.05	Geselecteerd voor kruisingen	Aanwezige ouderlijnen
MES 01808	144.0	bc	X (tweesporig)	Z6 & Z8
MES 01675	210.8	..defgh	X (viersporig)	MES 01675-p1 (geseq'd)
MES 01575	245.1	...efghijkl	X (tweesporig)	C43/8
MES 01905	266.2ghijklmn	X (tweesporig)	Geeno
MES 01516	273.9hijklmno	X (tweesporig)	Beide? B70/05 & b70/7
Sylvan A15	317.2mnopqrs	X (tweesporig)	Beide; A15-p1 & A15-p2
MES 01497	318.8mnopqrs	X (viersporig)	Beide; B55/1 & B55/9
MES 01751	377.8st	X (viersporig)	Geen
MES 01542	395.0t	X (tweesporig)	Geen
MES 01615	Niet getest		X (viersporig)	Is geprotoplasteerd

3.2 Maken van kruisingen

De mogelijkheid om twee homokaryons met elkaar te laten kruisen wordt voor een belangrijk deel bepaald door de vraag of zij compatibele mating types bezitten. De mating types in de geselecteerde champignonstammen zijn niet bekend. Dat maakt het lastig om te voorspellen of een kruising zal gaan lukken. Een tweede probleem bij het maken van kruisingen is dat het lastig te zien is of een kruising daadwerkelijk heeft plaatsgevonden. Kruisingen worden meestal gemaakt door twee homokaryons naast elkaar op een compost-agar te enten. Als de twee homokaryons kruisen verschijnt er soms een pluizig mycelium op het punt waar de twee kolonies elkaar raken, maar ook heel vaak is dat niet te zien (Figuur 2).

Van de stammen in Tabel 1 bleek het slechts voor een aantal mogelijk om de beide ouderlijnen door protoplastering als reiculture te verkrijgen (MES 01808, Sylvan A15, MES 01497 en MES 01516). Voor deze stammen kunnen dus beide type kernen (geïsoleerd als homokaryons)



Figuur 2. Geslaagde kruising. Twee homokaryons (één in tweevoud met grote kolonie en één in tweevoud met kleine kolonie) hebben op het grensvlak een kruising gemaakt (witte toef mycelium).

3.3 Bevestigen van een kruising

Als gevolg van het probleem dat we een geslaagde kruising niet op basis van morfologie kunnen onderscheiden van een mislukte kruising, hebben we moleculaire technieken nodig om te kunnen vaststellen of een kruising geslaagd is. In onze experimenten hebben we gebruik gemaakt van SNP-markers om te kunnen vaststellen of een kruising geslaagd was. Hiervoor zijn dezelfde SNP markers gebruikt die gebruikt zijn om de collectie wildisolaten van champignon te onderscheiden (Baars et al., 2012). Zoals in Tabel 2 te zien is, zijn slechts heel weinig van de kruisingen tussen homokaryons en heterokaryons en geen van de kruisingen tussen twee heterokaryons gelukt. Ter

Tabel 3. Overzicht van de kruisingen die zijn getest op biologische efficiëntie in teeltproef 3516201113.

Behand.	kruising	ouder1	ouder2	Behand.	kruising	ouder1	ouder2
1	MB-002	MES 01497-p1	MES 01516-p2	35	MB-300	MES 01497-p1	MES 01675p1
2	MB-006	MES 01497-p1	MES 01615-p1	36	MB-301	MES 01497-p2	MES 01675p1
3	MB-009	MES 01497-p1	A15-p2	37	MB-302	MES 01516-p1	MES 01675p1
4	MB-010	MES 01497-p1	Z6	38	MB-303	MES 01516-p2	MES 01675p1
5	MB-011	MES 01497-p1	Z8	39	MB-304	MES 01675p1	MES 01575-p1
6	MB-012	MES 01497-p2	MES 01516-p1	40	MB-305	MES 01675p1	MES 01615-p1
7	MB-013	MES 01497-p2	MES 01516-p2	41	MB-306	MES 01675p1	MES 01615-p4
8	MB-016	MES 01497-p2	MES 01575-p1	42	MB-307	MES 01675p1	A15-p1
9	MB-018	MES 01497-p2	MES 01615-p4	43	MB-308	MES 01675p1	A15-p2
10	MB-020	MES 01497-p2	A15-p2	44	MB-309	MES 01675p1	Z6
11	MB-021	MES 01497-p2	Z6	45	MB-310	MES 01675p1	Z8
12	MB-022	MES 01497-p2	Z8	46	MD-074-1	MES 01497-p1	MES 01544
13	MB-025	MES 01516-p1	MES 01575-p1	47	MD-086-1	MES 01497-p1	MES 01675
14	MB-026	MES 01516-p1	MES 01615-p1	48	MD-097-4	MES 01497-p1	MES 01575
15	MB-028	MES 01516-p1	A15-p1	49	MD-098-1	MES 01497-p2	MES 01575
16	MB-029	MES 01516-p1	A15-p2	50	MD-108-1	MES 01497-p1	MES 01905
17	MB-031	MES 01516-p1	Z8	51	MD-112-1	MES 01675p1	MES 01905
18	MB-034	MES 01516-p2	MES 01575-p1	52	MD-112-2	MES 01675p1	MES 01905
19	MB-035	MES 01516-p2	MES 01615-p1	53	MD-122-1	MES 01516-p1	MES 01751
20	MB-036	MES 01516-p2	MES 01615-p4	54	MD-125-1	MES 01575-p1	MES 01751
21	MB-037	MES 01516-p2	A15-p1	55	MD-130-3	Z6	MES 01751
22	MB-038	MES 01516-p2	A15-p2	56	MD-132-1	MES 01497-p1	MES 01542
23	MB-040	MES 01516-p2	Z8	57	MD-132-2	MES 01497-p1	MES 01542
24	MB-058	MES 01575-p1	A15-p1	58	A15		
25	MB-059	MES 01575-p1	A15-p2	59	MES 01497		
26	MB-061	MES 01575-p1	Z8	60	MES 01516		
27	MB-064	MES 01615-p1	Z6	61	MES 01542		
28	MB-066	MES 01615-p4	A15-p1	62	MES 01544		
29	MB-067	MES 01615-p4	A15-p2	63	MES 01575		
30	MB-068	MES 01615-p4	Z6	64	MES 01615		
31	MB-069	MES 01615-p4	Z8	65	MES 01675		
32	MB-071	H39	Z8	66	MES 01751		
33	MB-072	H97	Z6	67	MES 01808		
34	MB-073	H97	Z8	68	MES 01905		

vergelijking Xu et al (1996) maakten twee homokaryon x heterokaryon kruisingen en drie heterokaryon x heterokaryon kruisingen en namen telkens 4 subcultures van de confrontatie-zone. Nieuwe kruisingen probeerden zij te herkennen op basis van analyse van restriction fragment lengte polymorfismen voor 18 loci in het kern DNA verdeeld over 7 koppelingsgroepen en 2 regio's in het mitochondrieel DNA. Vijf van de acht subcultures van de twee homokaryon x heterokaryon kruisingen en vijf van de twaalf subcultures van de drie heterokaryon x heterokaryon kruisingen waren recombinant. Dit werd door Xu et al. (1996) geïnterpreteerd als nieuwe kruisingen.

De enige kruisingen die met een redelijk succes konden worden gemaakt waren die tussen homokaryons onderling. Van de 66 kruisingen tussen homokaryons waren er 40 gelukt. Indien daar de 9 wildisolaten en de commerciële lijn A15 bij worden opgeteld en de homokaryon-heterokaryon kruisingen waarvoor we niet zeker weten welke kruising we precies gemaakt hebben, kunnen we ongeveer 61 kruisingen analyseren op biologische efficiëntie. Tabel 3 geeft een overzicht van de kruisingen die getest zijn op biologische efficiëntie. Naast de nieuw gemaakte kruisingen zijn ook de oorspronkelijk heterokaryons (Tabel 1) waaruit de homokaryons zijn geïsoleerd meegenomen. Op deze manier is de breeding value van de beide kerntypen in de oorspronkelijke stammen ook in te schatten. Per teeltproef zijn stammen in 3-voud getest.

3.4 Uitvoering van de teeltproeven

In 2013 en 2014 zijn teeltproeven voor bepaling van biologische efficiëntie uitgevoerd (proef 3516201113 in oct/nov 2013, proef 3506201313 in dec 2013/jan 2014 en proef 3516202114 in sept/oct 2014). Hiervoor zijn telkens kisten met 0.1 m² teeltoppervlak (40 x 30 cm, 25 cm diep) gevuld met 8 kg ge-ente compost. Voor bepaling van de samenstelling van de compost (vochtgehalte, asgehalte, NDF, ADF, ADL) m.b.v. NIR analyse zijn 3 mengmonsters genomen van de compost en ofwel ge-analyseerd door Havens, ofwel door WUR Plant Breeding met de ijklijn van Havens. Na 16 dagen compost-kolonisatie is de mate van doorgroeiing van de compost beoordeeld. Voor een aantal kruisingen (Tabel 4) bleek in proef 3516201113 dat voor geen enkele van de drie herhalingen de compost doorgroeid werd. Voor deze stammen werd in proef 3506201313 geprobeerd om alsnog een kruising te laten ontstaan door de beide monokaryotische ouders als afzonderlijke stammen in de compost te enten. Na doorgroeiing van de compost werden de kisten afgedekt met reguliere dekaarde. Na 11 dagen dekaardekolonisatie werd de kolonisatie van de dekaarde beoordeeld. De meeste stammen koloniseerden de dekaarde goed. MES 01675 gaf in alle 3 herhalingen een slechte kolonisatie van de dekaarde te zien, evenals kruising MB-028 (MES 01516-p1 x A15-p1). Beide stammen hadden de compost evenwel zeer goed gekoloniseerd. Ook bij andere stammen zoals A15, MES 01542, MES 01615, MES 01751, bisp 210, MB-028, MB-058, MB-059, MB-071, MB-302

Tabel 4. Overzicht van kruisingen die op basis van moleculaire tests als gelukt werden beschouwd, maar niet in staat bleken om compost te koloniseren.

Kruising	Ouder 1	Ouder 2
MB-006	MES 01497-p1	MES 01615-p1
MB-009	MES 01497-p1	A15-p2
MB-025	MES 01516-p1	MES 01575-p1
MB-026	MES 01516-p1	MES 01615-p1
MB-034	MES 01516-p2	MES 01575-p1
MB-037	MES 01516-p2	A15-p1
MB-303	MES 01516-p2	MES 01675p1

en MD-125-1 is in één of meerdere kisten de dekaarde slecht doorgroeid. Na 11 dagen dekaardekolonisatie is opgeruwd en na 3 dagen herstelgroei is afgeventileerd. Snel producerende stammen waren MES 01516, MES 01615, MES 01751, MB-012, MB-020, MB-021, MB-022, MB-036, MB-066, MB-067, MB-068, MB-069, MB-304, MB-305, MB-306, MB-307, MB-309 en MB-310. We hebben telkens geprobeerd om van alle stammen 2 vluchten te oogsten. Voor een aantal stammen was het vluchtpatroon echter niet altijd even duidelijk. Als gevolg daarvan hebben sommige stammen 3 vluchten geproduceerd en de meeste twee vluchten. We hebben geprobeerd om van alle kisten een droge stof gehalte te bepalen voor de champignons uit de eerste vlucht en uit de tweede vlucht. Daarnaast is van alle stammen een sporenprent verzameld. Van de stammen is de eerste plukdag vastgelegd en de

Tabel 5. Onderlinge vergelijking van opbrengsten in tot nu toe uitgevoerde teelten

Experiment	A15		MES 01808	
	Gemiddelde opbr (g FW)	Bij p=0.05	Gemiddelde opbr (g FW)	Bij p=0.05
Proef 3506201313	2192 (sd 331, n=20)	a	1842 (sd 320, n=3)	a
Proef 3516201113	2511 (sd 121, n=3)	ab	1505 (sd 597, n=3)	a
Proef 162004	2650 (sd 348, n=3)	ab	913 (sd 565, n=3)	a
Proef 3516202114	2884 (sd 106, n=3)	b	1836 (sd 36, n=3)	a

algemene indruk van de paddenstoelen. Aan het einde van de teelt is het resterende compostgewicht bepaald en zijn een mengmonsters genomen voor analyse m.b.v. NIR.

3.5 Opbrengsten aan champignons

Om biologische efficiëntie te kunnen berekenen over de gezamenlijke data van alle uitgevoerde proeven (proeven 162004, 3516201113, 3506201313 en 3516202114, is eerst gekeken of de opbrengsten aan versgewicht tussen de experimenten enigszins vergelijkbaar zijn. Stammen A15 en MES01808 zijn in alle 4 experimenten opgekweekt en kunnen dus gebruikt worden om een indruk te krijgen van de vergelijkbaarheid van de teelten. Tabel 5 geeft een overzicht van de resultaten van een vergelijking van de teelten middels ANOVA voor A15 en voor MES01808. Zoals te zien, verschillend opbrengsten aanzienlijk per proef. Aangezien de standard deviatie binnen een proef vrij hoog is, zijn de verschillen tussen experimenten meestal statistisch niet significant verschillend. Tabel 6 geeft een overzicht van opbrengsten van de diverse kruisingen en stammen in de verschillende teelten. Zoals te zien in Tabel 6, is er bij de meeste stammen in de meeste teelten sprake van een aanzienlijke standaard deviatie voor de gemiddelde versopbrengst. Met andere woorden; er zijn in elke teeltproef flinke verschillen in opbrengst tussen de 3 kisten met hetzelfde ras. Daarnaast is te zien dat in de meeste gevallen de opbrengst van een ras in proef 3516202114 hoger is dan in proef 3516201113.

Tabel 6. Overzicht van opbrengsten in de diverse teelten. Weergegeven zijn de gemiddelden \pm standaard deviatie. In alle gevallen zijn de getallen gebaseerd op 3 herhalingen, m.u.v. ^A (n=20) en ^B (n=1)). Opbrengsten die met ^C zijn gemarkeerd zijn afkomstig van teelten waarin beide ouderlijnen als aparte stammen in de compost zijn ge-ent.

Ras/kruising	Gemiddelde opbrengst per kist met 8 kg entbare compost in 2 vluchten (g)			
	Proef 3516201113	Proef 3506201313	Proef 3516202114	Proef 162004
A15	2511 \pm 121	2192 \pm 331 ^A	2884 \pm 106	2650 \pm 348
MES01497	2051 \pm 98	Niet geteeld	2386 \pm 36	2224 \pm 131
MES01516	1485 \pm 134	Niet geteeld	1944 \pm 113	1647 \pm 325
MES01542	2247 \pm 87	2160 \pm 170	Niet geteeld	2526 \pm 248
MES01544	1660 \pm 292	Niet geteeld	1892 \pm 444	1958 \pm 179
MES01575	1247 \pm 131	1453 \pm 95	Niet geteeld	1351 \pm 163
MES01615	1836 \pm 111	Niet geteeld	2205 \pm 138	Niet geteeld
MES01675	840 \pm 293	Niet geteeld	Niet geteeld	1346 \pm 129
MES01751	1735 \pm 865	Niet geteeld	2228 \pm 411	2685 \pm 583
MES01808	1505 \pm 597	1842 \pm 320	1836 \pm 36	913 \pm 565
MES01905	1348 \pm 292	Niet geteeld	Niet geteeld	1892 \pm 232
MB-001	0	608 \pm 219 ^C	2131 \pm 225	Niet geteeld
MB-002	505 \pm 344	Niet geteeld	2165 \pm 361	Niet geteeld

Tabel 6 (vervolg). Overzicht van opbrengsten in de diverse teelten. Weergegeven zijn de gemiddelden \pm standaard deviatie. In alle gevallen zijn de getallen gebaseerd op 3 herhalingen, m.u.v. ^A (n=20) en ^B (n=1). Opbrengsten die met ^C zijn gemarkeerd zijn afkomstig van teelten waarin beide ouderlijnen als aparte stammen in de compost zijn ge-ent.

Ras/kruising	Gemiddelde opbrengst per kist met 8 kg entbare compost in 2 vluchten (g)			
	Proef 3516201113	Proef 3506201313	Proef 3516202114	Proef 162004
MB-006	9	Niet geteeld	Niet geteeld	Niet geteeld
MB-007	0	2037 \pm 326 ^C	2647 \pm 265	Niet geteeld
MB-008	0	1905 \pm 118 ^C	2546 \pm 285	Niet geteeld
MB-009	0	0 ^C	Niet geteeld	Niet geteeld
MB-010	1142 \pm 246	Niet geteeld	2429 \pm 182	Niet geteeld
MB-011	2297 \pm 204	Niet geteeld	2360 \pm 151	Niet geteeld
MB-012	1501 \pm 727	Niet geteeld	2043 \pm 94	Niet geteeld
MB-013	1609 \pm 34	Niet geteeld	304 \pm 223	Niet geteeld
MB-016	1911 \pm 495	Niet geteeld	2358 \pm 78	Niet geteeld
MB-018	1537 \pm 231	Niet geteeld	2730 \pm 463	Niet geteeld
MB-019	0	2187 \pm 199 ^A	2527 \pm 191	Niet geteeld
MB-020	2537 \pm 136	Niet geteeld	2953 \pm 134	Niet geteeld
MB-021	1681 \pm 439	Niet geteeld	1842 \pm 437	Niet geteeld
MB-022	2132 \pm 302	Niet geteeld	2855 \pm 95	Niet geteeld
MB-025	0	Niet geteeld	Niet geteeld	Niet geteeld
MB-026	0	Niet geteeld	Niet geteeld	Niet geteeld
MB-027	0	56 ^C	2413 \pm 221	Niet geteeld
MB-028	132 \pm 229	Niet geteeld	2012 \pm 466	Niet geteeld
MB-029	1443 \pm 454	Niet geteeld	2300 \pm 45	Niet geteeld
MB-030	0	1359 ^{BC}	1464 \pm 78	Niet geteeld
MB-031	1145 \pm 276	Niet geteeld	1880 \pm 141	Niet geteeld
MB-034	0	Niet geteeld	Niet geteeld	Niet geteeld
MB-035	1958 \pm 87	Niet geteeld	2185 \pm 140	Niet geteeld
MB-036	2176 \pm 173	Niet geteeld	2497 \pm 237	Niet geteeld
MB-037	15 \pm 25	Niet geteeld	2028 \pm 397	Niet geteeld
MB-038	1215 \pm 399	Niet geteeld	2144 \pm 207	Niet geteeld
MB-040	1429 \pm 176	Niet geteeld	1930 \pm 285	Niet geteeld
MB-058	208 \pm 196	Niet geteeld	2282 \pm 172	Niet geteeld
MB-059	1694 \pm 465	Niet geteeld	2337 \pm 63	Niet geteeld
MB-061	1710 \pm 269	Niet geteeld	1906 \pm 184	Niet geteeld
MB-062	0	972 \pm 155 ^C	2050 \pm 127	Niet geteeld
MB-063	0	564 \pm 351 ^C	2446 \pm 160	Niet geteeld
MB-064	1314 \pm 54	Niet geteeld	1797 \pm 535	Niet geteeld
MB-065	0	148 \pm 75 ^C	2334 \pm 269	Niet geteeld
MB-066	2251 \pm 190	Niet geteeld	2765 \pm 249	Niet geteeld
MB-067	2503 \pm 199	Niet geteeld	2732 \pm 89	Niet geteeld
MB-068	2340 \pm 65	Niet geteeld	2616 \pm 32	Niet geteeld
MB-069	2082 \pm 184	Niet geteeld	2393 \pm 166	Niet geteeld

Tabel 6 (vervolg). Overzicht van opbrengsten in de diverse teelten. Weergegeven zijn de gemiddelden \pm standaard deviatie. In alle gevallen zijn de getallen gebaseerd op 3 herhalingen, m.u.v. ^A (n=20) en ^B (n=1). Opbrengsten die met ^C zijn gemarkeerd zijn afkomstig van teelten waarin beide ouderlijnen als aparte stammen in de compost zijn ge-ent.

Ras/kruising	Gemiddelde opbrengst per kist met 8 kg entbare compost in 2 vluchten (g)			
	Proef 3516201113	Proef 3506201313	Proef 3516202114	Proef 162004
MB-070	0	84 \pm 95 ^C	2016 \pm 188	Niet geteeld
MB-071	2277 \pm 179	1050 \pm 131 ^C	2606 \pm 36	Niet geteeld
MB-072	1385 \pm 111	1152 \pm 277 ^C	2236 \pm 143	Niet geteeld
MB-073	2048 \pm 152	363 \pm 212 ^C	2387 \pm 308	Niet geteeld
MB-300	1640 \pm 173	Niet geteeld	1886 \pm 115	Niet geteeld
MB-301	1775 \pm 118	Niet geteeld	2276 \pm 102	Niet geteeld
MB-302	239 \pm 223	Niet geteeld	2326 \pm 127	Niet geteeld
MB-303	0	Niet geteeld	Niet geteeld	Niet geteeld
MB-304	1839 \pm 44	Niet geteeld	1917 \pm 201	Niet geteeld
MB-305	1875 \pm 379	Niet geteeld	2140 \pm 110	Niet geteeld
MB-306	2071 \pm 322	Niet geteeld	2230 \pm 85	Niet geteeld
MB-307	2301 \pm 245	Niet geteeld	2376 \pm 109	Niet geteeld
MB-308	2468 \pm 76	Niet geteeld	2658 \pm 161	Niet geteeld
MB-309	2226 \pm 226	Niet geteeld	2154 \pm 76	Niet geteeld
MB-310	2259 \pm 287	Niet geteeld	2504 \pm 221	Niet geteeld
MD-074-1	1662 \pm 230	Niet geteeld	2192 \pm 126	Niet geteeld
MD-086-1	833 \pm 588	Niet geteeld	1585 \pm 331	Niet geteeld
MD-097-4	1391 \pm 107	Niet geteeld	1754 \pm 42	Niet geteeld
MD-098-1	1848 \pm 89	Niet geteeld	2301 \pm 97	Niet geteeld
MD-108-1	1087 \pm 406	Niet geteeld	1897 \pm 191	Niet geteeld
MD-112-1	1818 \pm 64	Niet geteeld	2128 \pm 233	Niet geteeld
MD-112-2	1693 \pm 303	Niet geteeld	2009 \pm 278	Niet geteeld
MD-122-1	1741 \pm 540	Niet geteeld	2273 \pm 274	Niet geteeld

3.6 Opbrengsten gekoppeld aan substraatgebruik

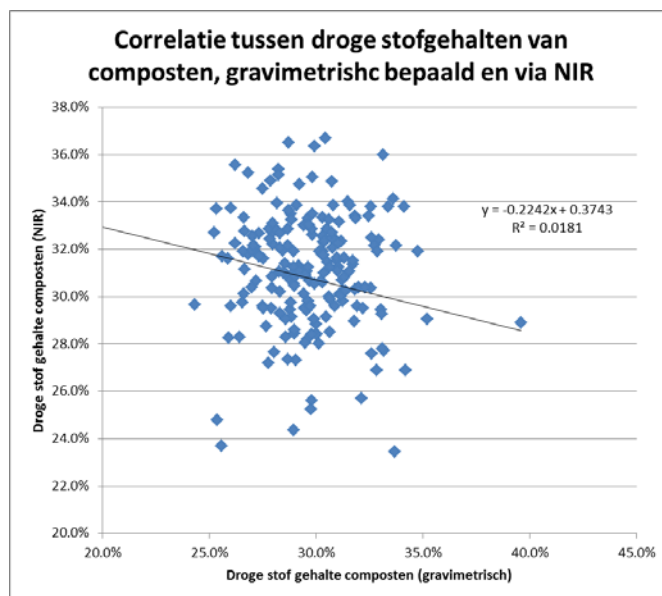
De biologische efficiëntie wordt berekend door het totale drooggewicht aan champignons dat per kist wordt geproduceerd te delen door afname in het totale drooggewicht van de compost in de kist.

Het totale drooggewicht aan champignons wordt geschat door de totale opbrengst van de eerste vlucht (gram natgewicht) te vermenigvuldigen met het drooggewicht van een monstertje champignons (genomen op de piek van de eerste vlucht) en de totale opbrengst van de tweede vlucht te vermenigvuldigen met het drooggewicht van een monstertje champignons (genomen op de piek van de tweede vlucht) en de beide waarden bij elkaar op te tellen. Indien een isolaat of kruising geen vluchtverloop vertoont, wordt de totale opbrengst van de kist vermenigvuldigd met het gemiddelde van de drooggewichten van twee monsters champignons, genomen in 2 opeenvolgende oogstweken.

Er is gekozen voor deze manier van berekenen omdat bij uitvoering van de teeltproeven is gebleken dat de droge stof gehalten van champignons per vlucht verschillen. Zo was in proef 3516202114 gemiddeld over alle stammen het droge stof gehalte van de paddenstoelen in de eerste vlucht 7.955% (st. dev. 0.722%, n = 191). Voor de tweede vlucht werd een gemiddeld droge stof gehalte van 7.242% gevonden (st. dev. 0.829, n = 151). Deze verschillen zijn statistisch significant (p < 0.001).

De geconsumeerde droge stof tijdens de teelt werd berekend door het totale drooggewicht aan compost aan begin van de teelt te schatten en aan het einde van de teelt (d.w.z. nadat twee vluchten champignons geproduceerd waren). Vervolgens werd het verschil tussen die twee berekend. Aangezien champignons slechts een kleine fractie van de mineralen in de compost opnemen, gaan we er van uit dat de afname aan droge stof in de compost tijdens de teelt vrijwel volledig organische stof betreft.

De hoeveelheid droge stof per kist bij aanvang en aan het einde van de teelt wordt geschat door de totale hoeveelheid compost (gram natgewicht) te vermenigvuldigen met het drooggewicht van een mengmonster van de compost uit die kist. Vanwege de snelheid waarmee de metingen kunnen worden uitgevoerd, werden de drooggewichten oorspronkelijk afgeleid uit een NIR meting. Aangezien er twijfel ontstond omtrent de accuratesse van deze meetmethode werd later het droge stof gehalte ook bepaald door drogen bij 105°C tot een constant gewicht. Figuur 3 geeft een indruk van het gebrek aan correlatie tussen beide bepalingen. Voor de berekeningen is daarom steeds uitgegaan van het droge stof gehalte zoals bepaald door drogen bij 105°C.



Figuur 3. Correlatie tussen twee bepalingmethoden voor het droge stof gehalte in de resterende compost aan het einde van de teelt.

Biologische efficiëntie werd in elk experiment per kist berekend. Indien een kruising in 3 teeltproeven elk in drievoud werd geteeld, waren er dus 3 waarden uit de eerste proef, 3 uit de tweede en 3 uit de derde. Op deze manier werd een dataset opgebouwd. Zoals reeds aangegeven in Tabel 6, bleek een beperkt aantal isolaten in teeltproef 3516201113 geen champignons te produceren. Wij gingen er daarbij van uit dat de kruising op petrischaal mislukt was. Om alsnog een kruising te kunnen maken is vervolgens in teeltproef 3506201313 geprobeerd om beide ouderlijnen van de kruising als homokaryons in de compost te enten. Soms is het mogelijk dat in de compost dan alsnog een kruising ontstaat. Indien op kisten waar we aldus een kruising probeerden te laten ontstaan, champignons werden geproduceerd, werd vervolgens een weefselcultuur gemaakt voor toekomstige proeven. Dergelijke weefselcultures werden vervolgens weer opgekweekt in teeltproef 3516202114.

Bij vergelijking van de opbrengsten van deze weefselcultures in teeltproef 3506201313 en teeltproef 3516202114 zien we soms echter aanzienlijke verschillen in opbrengst (Tabel 6). Zo brengt bijvoorbeeld kruising MB-070 in teeltproef 3506201313 gemiddeld over 3 kisten slechts 84 gram champignons op en teeltproef 3516202114 gemiddeld over 3 kisten maar liefst 2016 gram. Wij vermoeden dat in dergelijke gevallen sporen of doorgroeide compostdeeltjes uit naburige kisten voor een beperkt aantal champignons in teeltproef 3506201313 hebben gezorgd en dat deze champignons dus niet afkomstig zijn van de beoogde kruising. Dergelijke waarden zijn om die reden uit de dataset verwijderd.

Data uit proef 3516201113, 3506201313 en 3516202114 werden gezamenlijk geanalyseerd m.b.v. GenStat 17th edition door middel van lineaire regressie volgens een generalized linear model (kruising + proef). Op basis van deze analyse worden de biologische efficiënties zoals weergegeven in Tabel 8 voorspeld. De voorspelde biologische efficiëntie varieert van maximaal 0.43 tot 0.137. Aangezien niet voor elke kruising evenveel meetwaarden in de dataset aanwezig waren, verschilt het kleinste betrouwbare verschil voor elke twee stammen die met elkaar vergeleken worden. Grosso modo ligt het kleinste betrouwbare verschil in een orde van grootte van 0.151. Dat houdt in dat een biologische efficiëntie van 0.273 en een biologische efficiëntie van 0.430 statistisch gezien net verschillend zijn bij $p=0.05$. Hiermee is duidelijk welke rassen een hoge biologische efficiëntie en welke rassen een lage biologische efficiëntie hebben. Het is echter evenzeer duidelijk dat het onderscheidend vermogen van de gebruikte manier voor bepaling van biologische efficiëntie onvoldoende is om in een genetische analyse deze waarde voor nakomelingen nauwkeurig en betrouwbaar te meten. Er zal dus moeten worden nagedacht over

Tabel 7. Biologische efficiënties berekend op basis van meetwaarden uit proef 3516201113, 3506201313 en 3516202114.

Kruising/stam	Biologische efficiëntie	I.s.d. = ongeveer 0.151 bij P=0.05
MB-036	0.430	A
MB-059	0.386	AB
MES01542	0.380	ABC
MES01751	0.374	ABC
MB-011	0.371	ABC
A15	0.368	ABC
MB-019	0.365	ABC
MB-035	0.364	ABC
MD-074-1	0.354	ABCD
MB-069	0.350	ABCDE
MD-098-1	0.349	ABCDE
MB-012	0.346	ABCDE
MD-125-1	0.338	ABCDEF
MB-067	0.338	ABCDEF
MB-066	0.334	ABCDEF
MB-310	0.333	ABCDEF
MB-304	0.333	ABCDEF
MB-016	0.330	ABCDEF
MB-308	0.329	ABCDEF
MB-020	0.328	ABCDEF
MB-022	0.327	ABCDEF
MES01497	0.319	ABCDEFG
MB-008	0.314	ABCDEFG
MES01544	0.312	ABCDEFG
MB-007	0.311	ABCDEFG
MD-132-2	0.310	ABCDEFGH
MD-122-1	0.304	ABCDEFGH
MB-307	0.304	ABCDEFGH
MB-028	0.302	ABCDEFGH
MD-130-3	0.301	ABCDEFGH
MB-018	0.292	ABCDEFGHI
MES01516	0.292	ABCDEFGHI
MB-071	0.292	ABCDEFGHI
MD-112-1	0.292	ABCDEFGHI
MB-068	0.290	ABCDEFGHI
MES01575	0.288	ABCDEFGHIJ
MB-061	0.287	ABCDEFGHIJ
MD-132-1	0.283	ABCDEFGHIJ
MB-021	0.279	ABCDEFGHIJ
MB-306	0.273	.BCDEFGHIJ
MB-305	0.270	.BCDEFGHIJ

Tabel 7 (vervolg) Biologische efficiënties berekend op basis van meetwaarden uit proef 3516201113, 3506201313 en 3516202114.

Kruising/stam	Biologische efficiëntie	I.s.d. = ongeveer 0.151 bij P=0.05
MD-112-2	0.268	.BCDEFGHIJ
MB-301	0.266	.BCDEFGHIJ
MB-030	0.265	.BCDEFGHIJ
MES01905	0.264	.BCDEFGHIJ
MB-029	0.261	.BCDEFGHIJ
MB-038	0.256	.BCDEFGHIJ
MB-073	0.247	.BCDEFGHIJ
MB-031	0.246	.BCDEFGHIJ
MD-097-4	0.242	.BCDEFGHIJ
MES01615	0.242	.BCDEFGHIJ
MB-072	0.242	.BCDEFGHIJ
MB-010	0.240	.BCDEFGHIJ
MES01808	0.239	.BCDEFGHIJ
MB-040	0.237	.BCDEFGHIJ
MB-309	0.237	.BCDEFGHIJ
MD-086-1	0.227	..CDEFGHIJ
MES01675	0.209	...DEFGHIJ
MB-300	0.204	...DEFGHIJ
MB-064	0.199EFGHIJ
MB-002	0.189FGHIJ
MB-302	0.168GHIJ
MB-058	0.155HIJ
MB-013	0.145IJ
MB-037	0.137J
MD-108-1	-0.096	

methoden om de biologische efficiëntie nauwkeuriger te bepalen.

3.7 Hoe ziet de diallelmatrix er uit?

Tabel 8 geeft een overzicht van de biologische efficiëntie die bij de diverse kruisingen is gevonden. Aangezien een groot deel van de kruisingen niet gelukt is, kunnen we slechts voor een beperkt aantal kruisingen iets zeggen over de biologische efficiëntie. Gebaseerd op de gegevens in Tabel 8 kan een breeding value worden berekend. Voor de berekening van de breeding value is alleen gebruik gemaakt van de waarden voor ouderlijnen die we als monokaryons in de collectie hebben. Zoals uit Tabel 2 blijkt, is het niet mogelijk om heterokaryon-heterokaryon kruisingen te maken en hebben we met de heterokaryon-homokaryon kruisingen ook maar beperkte successen behaald.

Voor de statistische analyse van de breeding value is gebruik gemaakt van Genstat 17th edition. De data werden gefit middels lineaire regressie, volgens het model; Biol_eff_% = Constante + ouderlijn + Proef. De analyse gaf aan dat er statistisch significante verschillen waren tussen de verschillende teeltproeven en tussen ouderlijnen. Vervolgens hebben we het programma een voorspelling laten doen voor de biologische efficiëntie voor de verschillende ouderlijnen. Tabel 9 geeft een overzicht van de resultaten. Door de grote verschillen in biologische efficiëntie tussen de teeltproeven en de aanzienlijke variatie die binnen een teeltproef van kist tot kist werd gevonden

Tabel 8. Invulling van biologische efficiëntie in een diallel-matrix. Een groen veld betekent een succesvolle kruising, een rood veld een mislukte kruising en een paars veld het resultaat van een homokaryon-heterokaryon kruising waarbij we niet weten met welke ouder precies gekruist is. Kruisingen op groene velden met horizontale zwarte streepjes bleken uiteindelijk niet in staat om compost te koloniseren.

		MES 01808	MES 01675	MES 01575	MES 01516	Sylvan A15	MES 01497	MES 01615	
		ouder 1	ouder 2	ouder 1	ouder 2	ouder 1	ouder 2	ouder 1	ouder 2
MES 01808 Bisp 170	ouder 1		0.239	0.237			0.240	0.199	0.290
	ouder 2			0.287	0.246	0.237	0.371		0.350
MES 01675 Bisp 141/03	ouder 1			0.333	0.168	0.304	0.204	0.266	0.273
	ouder 2								
MES 01575 Bisp 103	ouder 1			0.288		0.155	0.386	0.330	
	ouder 2								
MES 01516 Bisp034	ouder 1				0.292	0.302	0.261	0.346	
	ouder 2						0.256	0.145	0.430
Sylvan A15	ouder 1					0.368		0.334	
	ouder 2						0.328		0.338
MES 01497 Bisp015	ouder 1						0.319		0.311
	ouder 2								0.292
MES 01615 Bisp119/9	ouder 1								0.242
	ouder 2								

bij een en dezelfde kruising, is het kleinste betrouwbare verschil vrij groot. Dat houdt in dat indien we nog een aantal teeltproeven zouden uitvoeren, de rangorde nog aanzienlijk zou kunnen veranderen. Met die kennis in het hoofd is het lastig om al een keuze te maken voor ouderlijnen om segregerende populaties te maken waarmee we de genetische basis voor substraatgebruik willen gaan ontrafelen.

In Tabel 8 zijn ook een aantal kruisingen te onderscheiden met een bijzondere specifieke breeding value. De kruising tussen MES 01575 ouder 1 en A15 ouder 1, heeft gemiddeld een sterk lagere biologische efficiëntie in vergelijking met de andere kruisingen met MES 01575 ouder 1 en de andere kruisingen met A15 ouder 1. In iets mindere mate is de biologische efficiëntie van de kruising tussen MES 01516 ouder 2 en MES 01497 ouder 2 een stuk lager dan de andere kruisingen met MES 01516 ouder 2 en andere kruisingen met MES 01497 ouder 2.

De kruising tussen MES 01615 ouder 2 en MES 01516 ouder 2 geeft gemiddeld een sterk hogere biologische efficiëntie in vergelijking met de andere kruisingen met MES 01615 ouder 2 en andere kruisingen met MES 01516

ouder 2. Mogelijk zijn deze kruisingen representatief voor negatieve combinaties of juist positieve combinaties van genen.

Tabel 9. Voorspelde biologische efficiëntie van de ouderlijnen van wildisolaten van champignon.

Ouderlijn	Voorspelde Biologische efficiëntie	Kleinst betrouwbare verschil bij $p=0.05$ (waarden met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend)
MES 01615 ouderlijn 2	0.307	a
A15-ouderlijn 2	0.304	a
A15 ouderlijn 1	0.304	a
MES 01497 ouderlijn 2	0.299	a
MES 01575 ouderlijn 1	0.299	a
MES 01808 ouderlijn 2	0.277	ab
MES 01516 ouderlijn 2	0.275	ab
MES 01516 ouderlijn 1	0.270	ab
MES 01615 ouderlijn 1	0.269	ab
MES 01675 ouderlijn 1	0.265	ab
MES 01497 ouderlijn 1	0.249	.b
MES 01808 ouderlijn 1	0.247	.b

4. Conclusies en vervolgonderzoek

Er is in 2013 is een selectie gemaakt uit de champignonstammen die de range in biologische efficiëntie (opbrengst champignons per gewicht compost) representeert. Kruisbare lijnen (homokaryons van een deel van deze stammen) zijn in alle mogelijke combinaties met elkaar gekruist. Van deze kruisingen is in 2013 en 2014 wederom de biologische efficiëntie bepaald. De gezamenlijke data data zijn gebruikt om voor elk homokaryon de breeding values te berekenen.

In dat proces bleek dat er binnen een teeltproef een aanzienlijk variatie was in opbrengst van de kruisingen in de verschillende herhalingen in de proef. Daarnaast vonden we aanzienlijke variaties in de gemiddelde opbrengst als we meerdere teeltproeven met elkaar vergeleken. Deze variatie heeft een grote invloed op de nauwkeurigheid waarmee we de biologische efficiëntie kunnen inschatten. In het vervolg op dit onderzoek wordt onderzocht op welke manier we m.b.t. statistiek met dit probleem kunnen omgaan.

Daarnaast heeft de nauwkeurigheid waarmee we opbrengst aan droge stof in de champignons en verlies aan droge stof in de compost kunnen schatten een grote invloed op de bepaling van de biologische efficiëntie. Voor de berekening van de biologische efficiëntie werd op basis van de natopbrengst aan champignons en het droge stof gehalte van twee monsters champignons uit twee verschillende oogstweken een schatting gemaakt van de totale opbrengst aan droge stof. Daarnaast werd op basis van het natgewicht van de compost bij aanvang en einde van de teelt en op basis van de droge stofgehalten van mengmonsters van de compost bij aanvang en aan het einde van de teelt een schatting gemaakt van het verlies aan droge stof uit de compost. Er is enige twijfel gerezen over de nauwkeurigheid waarmee we de opbrengsten aan in champignons geproduceerde droge stof kunnen schatten en aan de nauwkeurigheid waarmee we het verlies aan droge stof uit de compost kunnen schatten. In het vervolg op dit onderzoek wordt onderzocht of we de nauwkeurigheid waarmee we de opbrengsten en verliezen aan droge stof kunnen verbeteren.

Het werk aan het verbeteren van onze onderzoeksmethode is noodzakelijk. Verdere stappen behelzen het maken van segregerende populaties en het schatting van de biologische efficiëntie van elke lid van deze populatie. Teneinde QTL's voor biologische efficiëntie nauwkeurig te kunnen bepalen, moet de biologische efficiëntie een stuk nauwkeuriger worden bepaald dan we nu kunnen.

5. Gebruikte literatuur

Baars J, Hendrickx P. & Sonnenberg A. (2012) Exploring our collection of wild *Agaricus bisporus* strains. Rapport 2012-10.

Xu et al. (1996) Somatic recombination in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Mycol. Res. 100 (2): 188-192.