

OKEE

Optimalisatie van Ketten Efficiëntie via Expressieprofielering

Eindrapportage januari 2003 – januari 2006
2003T1269 /juni 2006

Openbaar

Consortium
Agrotechnology and Food Science Group
Plant Research International BV
KeyGene NV
Productschap Tuinbouw

Projectleider/contactpersoon
Dr. Jurriaan Mes (AFSG)
0317-477586
Jurriaan.mes@wur.nl

Report 679

Colofon

Het project is uitgevoerd met subsidie van het Programma E.E.T. (Economie, Ecologie en Technologie) een gezamenlijk initiatief van de Ministeries van Economische Zaken, Onderwijs, Cultuur en Wetenschappen en Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu. Het programma wordt uitgevoerd door het Programmabureau E.E.T., een samenwerkingsverband van Senter en Novem. Overige financierders van dit project zijn Productschap Tuinbouw en de individuele partners binnen dit consortium.

economieecologietechnologie

Productschap  Tuinbouw



Titel	OKEE Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofiëring
Auteur(s)	Consortium
A&F nummer	679
ISBN-nummer	-
Publicatiedatum	Juni 2006
Vertrouwelijk	Vertrouwelijk
Project code.	1330002000

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

© Agrotechnology & Food Innovations B.V.

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

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

Een copy van dit projectrapport is opvraagbaar bij J. Mes, AFSG, Bornsesteeg 5, 6708 PD, Wageningen tegen betaling van € per exemplaar.



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

Samenvatting

Ondanks een steeds hogere efficiëntie in distributieketens van groente, fruit en siergewassen, gaat er toch nog steeds relatief veel product verloren bij het transport. Substantiële verdere verbetering is feitelijk alleen mogelijk als het lukt om de kwaliteit van de producten al aan het begin van de logistieke keten te bepalen. Dit project heeft zich gericht op de ontwikkeling van een hiervoor benodigde technologie die gebaseerd is op ‘genexpressie’. We verwachten dat de genexpressie van specifieke indicator genen als voorspellers kunnen dienen over hoe lang een agrarisch product houdbaar is en hoe lang het vervoer dus mag duren.

In het project is getracht de nieuwe, ‘genomic-based’, meetmethode te ontwikkelen voor twee modelproducten: tomaat en roos. Dit zijn economisch gezien zeer grote gewassen. Dit project was een eerste ‘proof of concept’ en daarom is gewerkt aan één kwaliteitskenmerk: de stevigheid bij de tomaat en grauwe schimmel (botrytis) bij de roos. Beide kenmerken bepalen in de praktijk zeer sterk de beoordeling van consumenten.

Van zowel de tomaat als de roos zijn vele partijen geanalyseerd op kwaliteitverloop. Met een gelijke begin kwaliteit bleken partijen, onder gelijke bewaar- of uitstalcondities, zeer sterk te variëren de benoemde kenmerken. Bij tomaat wordt gevonden dat er tussen de best en slechts bewaarbare tomaten bijna 40 dagen zaten. Witte rozen werden in vazen uitgesteld en onderzocht op schimmel aantasting. Ook daar was de variatie in aantastingpercentages van de bloemen uit verschillende partijen zeer groot. Deze aantasting was op geen enkele manier te voorspellen vlak na de oogst. Deze proeven onderbouwde dus het uitgangshypothese van het project dat een voorspellende toets veel kan bijdrage aan een betere productgebaseerde logistiek.

De geanalyseerd partijen zijn gebruikt om materiaal te verzamelen voor het maken van een ‘micro array’, een glasglaasje met honderden spotjes met relevante genen voor de kwaliteitskenmerken. Vervolgens zijn deze glasglaasjes gebruikt om te onderzoeken welke genen ‘aan’ en ‘uit’ stonden in deze partijen en hoe deze genexpressie correleerde met de latere kwaliteitskenmerken van de partij. Bij tomaat bleken de resultaten niet eenvoudig te interpreteren. Mogelijk dat afwijkende groei omstandigheden of virus aantasting (Pepino Mozaiek) de genexpressie van sommige partijen ontregelt hebben en daardoor geen algemene correlatie gevonden worden met de stevigheid. Met een betere voorselectie van partijen verwachten we toch dat een aantal belangrijke indicator genen zijn geselecteerd. Bij roos is gebleken dat met een beperkte set genen partijen zijn te verdelen in 2 klassen, een die bij gelijke condities weinig schimmel aantasting zal krijgen en een groep waarin met grote waarschijnlijkheid wel problemen met schimmelaantasting zal optreden. Aan het eind van het project konden twee belangrijke indicator genen met tegengestelde gen expressie geïdentificeerd worden die bij de meeste geanalyseerde partijen een goede voorspelling over de Botrytis aantasting kon geven.

De multiplextoets methode die ontwikkeld werd voor de kwantitatieve bepaling van genexpressie heeft aangetoond een potentieel interessante methode te zijn die mogelijk snel tot een toepasbaar toetsplatform kan leiden. De laatste verbeteringen aan de methode hebben geleid tot een detectie

methode die de gen expressie van 14 genen tegelijk kon kwantificeren waarbij de expressie genormaliseerd wordt met behulp van 10 huishoud genen.

In het project werken twee onderzoeksinstituten, een bedrijf en de Nederlandse tuinbouwsector succesvol samen. We hopen dat deze eerste succesvolle 'proof of principle' zal leiden tot snelle, goedkope en betrouwbare testen toepasbaar in alle schakels van de distributieketens waar logistieke beslissingen afhankelijk zijn van productkwaliteit.

Afkortingen en trefwoordenlijst

ATO – Agrotechnologisch Onderzoek (later opgegaan in A &F)

A&F – Agrotechnology & Foodinnovations (fusie van ATO en IMAG)

AFSG – Agrotechnology Food Science Group (naamsverandering van A&F)

WUR – Wageningen University and Research Center (waar PRI en AFSG ondervallen)

Microarray – glasplaatje met geprinte stukjes DNA afkomstig van genen wat gebruikt wordt om snel vele honderden genen te analyseren

DNA – Deoxyribo Nucleic Acid is de drager van erfelijk materiaal

PCR – Poly chain reactie, het vermeerderen van stukjes DNA

Real Time PCR – is het online volgen van de vermeerdering van stukjes (copy)DNA en wordt gebruikt om kwantitatieve verschillen in hoeveelheden RNA aan te tonen

cDNA – Copy- of complement DNA is DNA dat door reverse transcriptie uit RNA is verkregen

RNA –Ribo Nucleic Acid, tussenstap van DNA naar de aanmaak van eiwitten die processen in de cel uitvoeren

Content

Samenvatting	3
Afkortingen en trefwoordenlijst	5
Content	6
1 Project gegevens	7
1.1 Achtergrond	7
1.2 Doel	8
2 Eindresultaten in relatie tot de planning	9
2.1 Eindresultaat per taak en belangrijkste deliverables	11
2.2 Problemen en oplossingen	29
2.3 Wijzigingen in het projectplan	30
2.4 Samenwerking partners	30
3 Kosten overzicht	32
4 Stand van zaken	33
4.1 Patent octrooi aanvragen	33
4.2 Markt en vervolgplannen	33
4.3 Kennis overdracht	33
5 Eindconclusies	35

1 Project gegevens

Projectcategorie:	EET project
Titel:	Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofieling (OKEE) Reductie van energieverbruik en uitval in de distributieketens van verse producten door innovatieve toepassing van genomics technologie.
Projectnummer:	EETK01122
Verslagperiode:	1 januari 2003 tot 1 januari 2006
Penvoerder:	Dr. J.J. Mes, Agrotechnology and Food Innovations BV

1.1 Achtergrond

Ondanks een sterk verbeterde efficiëntie in de Nederlandse distributieketens van groente, fruit en siergewassen gaan er nog steeds grote hoeveelheden product verloren. Het reduceren van deze uitval is vanuit zowel economisch als ecologisch perspectief van belang. Een belangrijke oorzaak van het verlies is een gebrek aan goede instrumenten om voorspellingen te doen over kwaliteit en houdbaarheid. Dit project beoogt het ontwikkelen van een beslissingsondersteunend instrument dat inzicht geeft in de conditie van het product en waarmee voorspellingen gedaan kunnen worden over het verloop daarvan in de verdere keten. Geschat wordt dat hiermee de helft van de uitval van verse producten te voorkomen is.

De technologie is toepasbaar in alle schakels van de distributieketens voor groente, fruit en siergewassen en kan op elk punt waar beslissingen afhankelijk zijn van productkwaliteit een bijdrage leveren aan het verhogen van de efficiëntie en het verminderen van uitval. Ecologische producten vormen een belangrijke target voor de nieuwe technologie omdat vooral in deze productgroep de uitval relatief hoog is. Daarnaast kan de technologie ingezet worden voor het terugdringen van preventieve behandelingen en houdbaarheidsverlengende verpakkingen, zoals krimpfolie om komkommers, door een betrouwbare indicering van de noodzaak ervan. Een derde ecologisch winstpunt ligt in het ondersteunen van minder milieubelastend transport. Voldoende zekerheid over het kwaliteitsverloop van een product maakt het voor exporteurs mogelijk vaker voor scheepstransport te kiezen i.p.v. vervoer per vliegtuig.

Voor de ontwikkelingsfase is gekozen voor drie modelgewassen: champignon, roos en komkommer (deze producten laten staan? Champignon en komkommer komen nergens meer terug, roos noemen?)die, zowel vanuit economisch als energetisch perspectief bezien, omvangrijke productstromen vertegenwoordigen. De in dit project voorziene reductie van de uitval met 50% komt voor de binnenlandse handel overeen met ruim 30 miljoen € op jaarbasis en een forse besparing op het gebied van energie (ruim 42 miljoen m³ gas) en grondstoffen. Extrapolatie naar de gehele vershandel, uitgaand van conservatieve aannames levert een jaarlijks besparingspotentieel van 103 miljoen € voor de binnenlandse handel en 131 miljoen € voor de export. Op het gebied van minder milieubelastend transport wordt verwacht dat alleen al op het traject Amsterdam New York een energiebesparing van 1350 PJ/jaar gerealiseerd kan worden.

De basis voor de innovatie ligt in de recent ontwikkelde genomics technologie. Complexe genexpressie patronen reflecteren de historie van een vers product en bevatten gedetailleerde informatie over de conditie ervan. Uit die informatie kunnen indicatoren worden gedestilleerd die in eenvoudige praktijktoetsen snel inzicht geven in de op dat moment relevante parameters. Gebruikt als input in kwaliteitsverloopmodellen maakt de hoge informatiedichtheid van expressiegegevens een nauwkeurige inschatting van de toekomstige kwaliteit mogelijk.

1.2 Doel

Uiteindelijk is het doel het ontwikkelen van een geïntegreerd product-monitorsysteem, inclusief beslissingsondersteunende software, dat optimalisatie van ketenefficiency en minimalisatie van energiegebruik en uitval mogelijk maakt.

2 Eindresultaten in relatie tot de planning

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

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

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

De eerste helft van het tweede jaar is vervolgens gebruikt om de microarray hybridisatie protocollen voor roos en tomaat te optimaliseren. Na de eerste verkennende experimenten op ontwikkelingsreeksen van tomaat en roos zijn vervolgens de batches geanalyseerd waarbij genexpressie vlak na oogst gecorreleerd moet worden met kwaliteitsdata van dezelfde producten na een afzetsimulatie. Bij tomaat gaat het hier om stevigheidwaarnemingen uitgedrukt in het aantal dagen na de pluk totdat de stevigheidsgrens 5 behaald wordt terwijl bij roos het om Botrytis besmetting van de bloemen gaat uitgedrukt in % besmette bloemen 8 dagen na de oogst. De resultaten van de microarray analyse bleken minder eenvoudig te interpreteren dan gehoopt. Door gebruik te maken van verschillende statistische bewerkingen en analysemethoden zijn we echter in staat gebleken genen te selecteren die mogelijk gebruikt kunnen worden als kwaliteitvoorspellers. Ook hebben de gevonden genen geleid tot speculaties en nieuwe hypothesen over het hoe en waarom batches variëren in kwaliteit. Voordat er echter van echte indicatoren sprake is dienen genexpressies eerst met andere methoden geverifieerd te worden en

gekoppeld te worden aan kwaliteitsdata. Tevens kunnen deze verificatie studies gebruikt worden om de in ontwikkeling zijnde multiplex assay mee te valideren.

Dezelfde monsters die gebruikt zijn voor de microarray zijn vervolgens geanalyseerd met gen specifieke Real Time PCR analyses. Het opzetten van deze Real Time PCRs heeft veel tijd gekost maar uiteindelijk hebben we bij roos de 12 geselecteerde partijen geanalyseerd op de expressie van 34 genen. Hieruit bleek dat op basis van slechts 2 genen een indeling te maken was in partijen die weinig aantasting door Botrytis krijgen (onder de 30% geïnfecteerde bloemen) en partijen waar zich veel Botrytis in ontwikkeld (meer dan 30% geïnfecteerde bloemen). Bij uitbreiding van deze reeks naar 24 partijen bleek deze indeling op basis van ratio van gene expressie nog steeds stand te houden. Hiermee kan worden gesteld dat het 'proof of principle' zoals als doel gesteld binnen dit project bereikt is. De merkers zullen nu verder in de praktijk geëvalueerd dienen te worden om te zien hoe deze indicatoren in de praktijk werken en hoe betrouwbaar een assay zal zijn gebaseerd op deze genen.

Ook bij tomaat zijn de op basis van microarray analyse geselecteerde genen omgezet in Real Time PCR analyse. Het bleek moeilijk eenduidige conclusies te trekken uit de gehele set van microarray analyses, omdat resultaten van een vroeg oogsttijdstip (waar grote, en waarschijnlijk economisch relevante, verschillen in kwaliteitsverloop optraden duidelijk afweken van resultaten van latere experimenten. Er is daarom voor gekozen twee sets van potentiële indicatorgenen (die gedeeltelijk overlappen) verder te analyseren met behulp van RT-PCR. Na aanvankelijk de selectie van ongeveer 20 genen te hebben verbreed tot 30 om eventuele tegenslagen bij de RT-PCR op te vangen, is RT-PCR analyse voor validatie van microarray resultaten uitgevoerd. Vergelijking van microarray en RT-PCR resultaten voor de geselecteerde genen slechts een gedeeltelijk overtuigende correlatie tussen de twee datasets op. De oorzaak hiervan was waarschijnlijk de aanwezigheid van een subset van data waarbij array en RT-resultaten sterk afweken. Een relatief kleine set indicatorgenen lijkt gevalideerd en met het inzicht in de oorzaken van afwijkende resultaten lijkt de kans groot dat deze set verder uitgebreid kan worden, voor gebruik in een werkbare toets.

Het biotechnologie bedrijf KeyGene heeft gewerkt aan de multiplex toetsontwikkeling. Vanuit de eerste verkennende experimenten met bekende sequenties van tomaat, optimalisatie van de OLA-PCR probes en detectie op cDNA en RNA is de methode doorontwikkeld tot een betrouwbaar systeem waarbij op basis van een snelle mRNA isolatie, first-strand cDNA synthese, OLA hybridisatie en ligatie en PCR, genexpressie gedetecteerd kan worden. Op basis van de expressie van enkele roos genen is aangetoond dat de methode veel potentie heeft, zeker in combinatie met een bufferende reeks aan constante genen. Daarna is gewerkt aan het opzetten en detecteren van de kandidaat indicator genen van roos en het detecteren van de genexpressie in dezelfde monsters als gebruikt voor microarray analyse en Real Time PCR.

De OLA-PCR methode is in de afgelopen periode verder geoptimaliseerd met als uitkomst een substantiële eliminatie van achtergrond invloeden resulterend in een duidelijk te scoren profiel op zowel radioactieve gelen als met capillaire electroforese. Met deze geoptimaliseerde methodiek bleken acht constitutief tot expressie komende genen goed te volgen en is ook daadwerkelijk geverifieerd dat hun expressie profielen constitutief zijn en niet noemenswaardig veranderen onder invloed van Botrytis infectie. Naast deze constitutieve genen zijn drie genen gevonden die indicatief zijn voor botrytis besmetting, waarbij de expressie profielen goed correleren met de

mate van de Botrytis besmetting. Hiermee is ook voor de multiplex toets methode ‘proof of principle’ binnen dit project bereikt. Om de betrouwbaarheid van de toets verder te verbeteren moeten nu meerdere potentiële indicator genen getest worden. Verder zal om tot statistisch verantwoorde kwaliteitsparameters voor de toets te kunnen komen, en de toepasbaarheid van de toets in de praktijk te valideren een groot aantal roos monsters moeten worden geanalyseerd.

2.1 Eindresultaat per taak en belangrijkste deliverables

De uitvoering van dit project viel in een aantal taken uiteen die deels parallel uitgevoerd werden.).

TAAK 1 - Ketenganalyse

Een constante interactie met de praktijk (telers, handelaren, begeleidingscommissie) is onderhouden om mogelijke veranderingen in de knelpunten en logistieke problemen die invloed hebben op dit project in een vroegtijdig stadium op te merken en mee te kunnen nemen in besluitvorming en richting te geven aan het onderzoek. Resultaten van de kwaliteitsverloopproeven zijn teruggekoppeld met de praktijk om de knelpunten te evalueren en te toetsen of we op het goede spoor blijven. Dit heeft er onder andere toe geleid dat in een laat stadium van het project accenten verschoven zijn naar de roos toets ten koste van de tomaten toets omdat de praktijk problemen met stevigheid bij tomaat ziet verminderen door verbeterde rassen.

Een student van de hogeschool Larenstein heeft onder begeleiding van AFSG een marktverkenningonderzoek uitgevoerd naar kwaliteitsproblemen in de praktijk en de wens van betere diagnose van verse agro-producten. Veel geïnterviewden blijken zeer geïnteresseerd in de diagnostische testen. Zeker in de rozenbranche is Botrytis een groot probleem en men wacht op een goede oplossing. Ieder onderzoek in deze richting is welkom. Uit de enquêtes blijkt vaak dat meningen binnen een productsector gedeeld werden. Als meningen verschillen heeft dit een goede reden. Zeker als het de kosten en benodigde tijd betrof zijn meningen per sector vergelijkbaar.

Uit de interviews blijkt dat de keten interesse heeft in het toepassen van een diagnostische toets. Men is tevens bereid hiervoor te betalen wanneer hij zich daarmee kan onderscheiden in de markt. Men denkt vooral de kosten te kunnen terughalen door vermindering van de uitval door gebruik te maken van een product gebaseerde logistiek, meer flexibiliteit in de keten en meer garanties naar de afnemer.

De grootste potentie zit in de rozensector. Zowel in Nederland waar dit mogelijkheden biedt tot het aanbieden van exclusieve (lang houdbare of bijna Botrytis vrije) rozen tot de importeurs die veel vrachtkosten kunnen besparen met selectie van goede partijen uit productie landen uit Afrika en Zuid Amerika. Ook de tomatensector ziet mogelijkheden, hier is vooral selectie van partijen geschikt voor de export naar de VS interessant, maar ook de import vanuit de mediterrane landen vormt een potentiële markt. De appelsector ziet de minste mogelijkheden, de marges zijn te klein om de investering van het uitvoeren van de toets terug te verdienen. De interesse in deze sector lijkt daardoor vrij beperkt.

Op basis van de informatie verkregen door middel van de interviews is het zeer moeilijk een kosten-baten analyse te berekenen, daar het nog niet bekend is hoeveel de test zal gaan kosten en ook niet wat de individuele mogelijkheden zijn van de verschillende marktpelers in het afzetten van partijen en de daarmee gepaard gaande winstmarges.

Het is wel mogelijk gebleken om ongeveer inzicht te krijgen wat de verschillende sectoren willen uitgeven, maar dit is op een macro niveau. Verder onderzoek zou gedaan moeten worden om een nauwkeuriger idee van de kosten vast te stellen.

Naar aanleiding van dit onderzoek krijgen we steeds meer vragen binnen over de mogelijkheden bij andere gewassen. Zo is Botrytis ook een groot probleem bij Gerbera en Lisianthus en zou de praktijk graag een toets ontwikkeld zien voor kwaliteitvoorspelling voor paprika en diverse bladgroenten.

Deliverables

- Overzicht van problemen in de praktijk
- Inzicht per sector over bereidbaarheid van toepassing diagnostisch onderzoek
- Markt informatie over interesse vanuit de sector

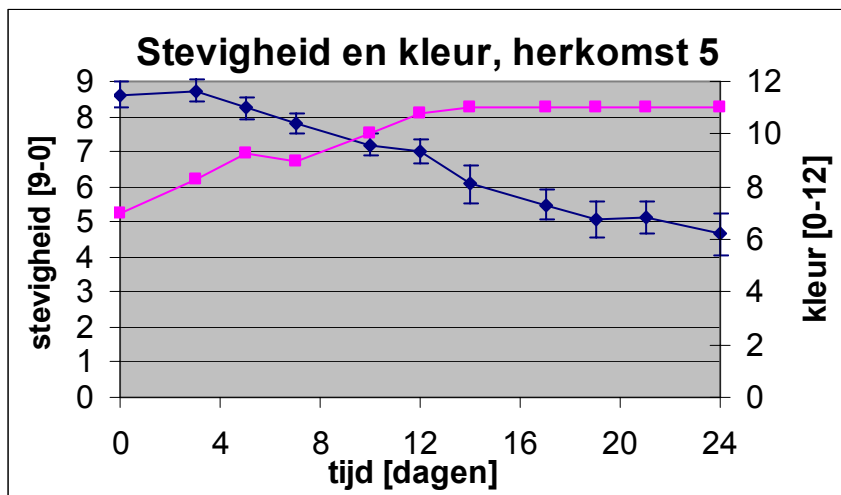
TAAK 2 - Ontwikkelen kwaliteitsverloop modellen

Op basis van kennis en expertise van het product is een proefopzet ontwikkeld voor zowel roos als tomaat waarin het kwaliteitsverloop efficiënt is te bepalen en te meten.

Kwaliteitsverloopproeven zijn gebruikt om een goed oordeel te geven over de kwaliteitsverschillen tussen verschillende geteste batches resulterend in een klasse indeling. Deze klassenindeling is gebruikt om tot een keuze van de monsters voor genexpressie analyse te komen. Voor tomaat zijn hiervoor in de afgelopen jaren 48 partijen Aromata geanalyseerd. Aromata is gekozen omdat dit ras last heeft van een snelle afname in stevigheid tijdens distributie.

Het doel van de experimenten is om materiaal te verkrijgen met een verschillend verloop in kwaliteit bij gelijke behandeling. Ook is het hierbij van belang dat de verschillende partijen voor het ingaan van het experiment geen kwalitatieve verschillen qua kleur of stevigheid laten zien. In overleg met veredelaar RijkZwaan zijn in 2003 een aantal telers geselecteerd waarvan bekend is dat deze een goede of juist minder goede kwaliteit afleveren. Als behandeling wordt het product 3 tot 4 weken opgeslagen in een geconditioneerde ruimte bij 18°C en 75% relatieve luchtvochtigheid. Deze condities zijn gekozen om een afname in kwaliteit te zien binnen afzienbare kwaliteit, voldoende tijd te hebben om metingen te kunnen doen en om eventuele van temperatuurschommelingen die optreden in de keten geen rol te laten spelen.

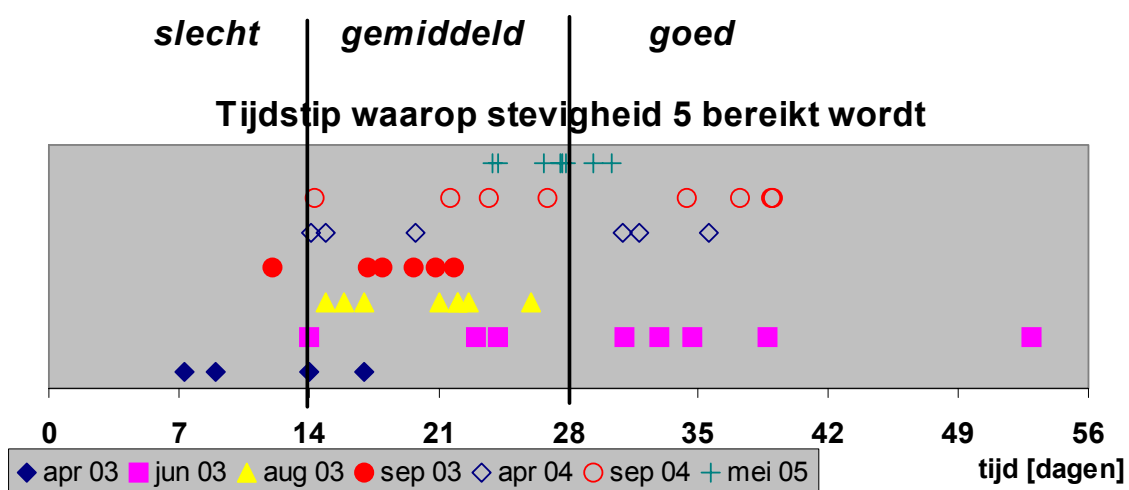
Op de dag van oogst (dag 0), waarbij het product kleurstadium 6 à 7 mocht hebben, wordt het product bij de 8 telers opgehaald en in het experiment ingezet. Per teler worden op dag 0 ook monsters genomen voor eventuele latere genanalyses. Voor een aantal batches is deze bemonstering herhaald op dag 2 à 3 en dag 5. Eens per 2 à 3 dagen tijdens de proefperiode wordt het product door experts beoordeeld op kleur (1 (groen) – 12 (rood)) en stevigheid (9 (hard) – 0 (zacht)). Figuur 1 laat een typisch stevigheids- en kleurverloop zien van een batch uit september 2003. De metingen van de overige batches zijn te vinden in de voortgangsrapporten.



Figuur 1. Stevigheid en kleur van de Aromata partij van teler 5 uit september 2003. De error bars komen overeen met de standaarddeviatie.

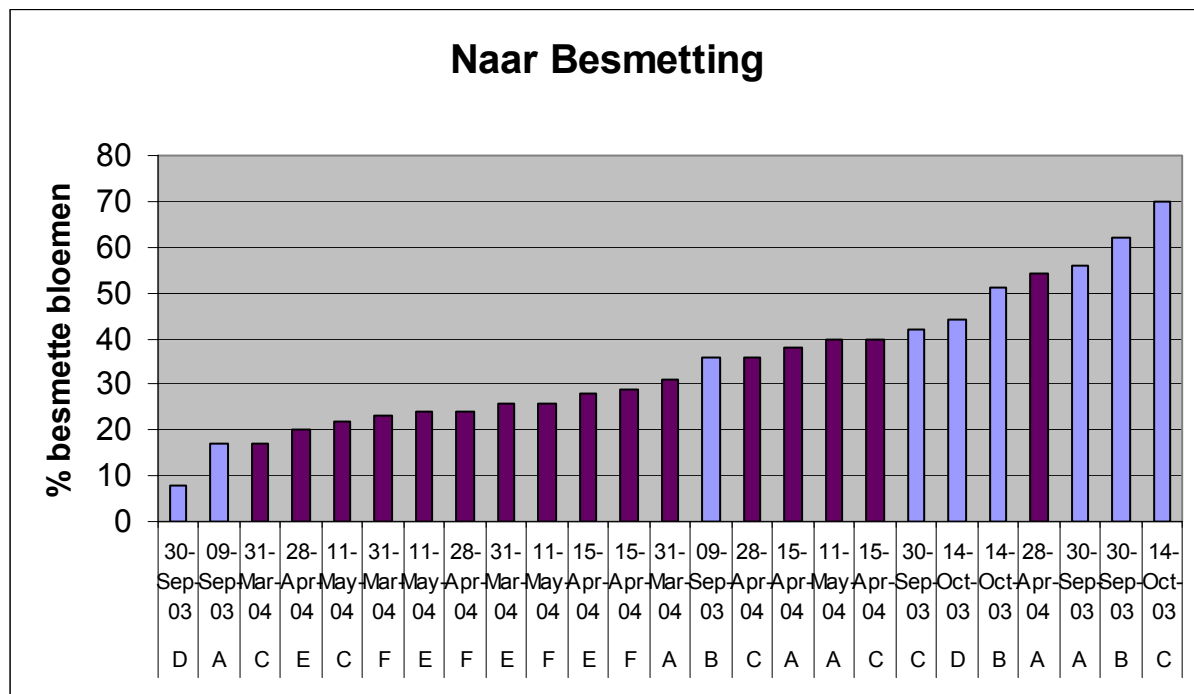
De proef is herhaald gedurende het seizoen en in 2004 en 2005. Helaas hebben niet altijd dezelfde telers deel kunnen nemen. Al met al hebben 17 verschillende telers meegedaan en zijn er 48 partijen bemonsterd en beoordeeld.

Voor aankoop van tomaten is stevigheid 5 de ondergrens. Op basis van de metingen en lineaire extrapolatie zijn de partijen op dit aspect te rangschikken. Figuur 2 illustreert deze rangschikking waarbij ieder symbool een batch van een teler vertegenwoordigt. Variaties tijdens het seizoen, de jaren en tussen telers zijn duidelijk zichtbaar en motiveren de ontwikkeling van een genetische toets. Op basis van de rangschikking is een klasse indeling te maken, zoals aangegeven in Figuur 2. De klasse indeling is gebruikt bij de selectie van batches voor genanalyse.



Figuur 2. Tijdstip in dagen waarop stevigheid 5 bereikt wordt voor alle Aromata batches. De zwarte lijnen komen overeen met een mogelijke klasse indeling.

Bij roos zijn volgens vaste protocollen zowel bij AFSG als bij het TestCentrum Aalsmeer monsters getest op het voorkomen van Botrytis aantasting na een week uitbloei of afzetsimulatie. AFSG heeft zich in de eerste periode gefocust op Bianca rozen, bij het TestCentrum zijn meerdere cultivars onderzocht. Beide sets van rozen batches leverde dezelfde conclusies; aantasting van Botrytis in de na-oogst fase is niet te zien door inspectie van de bloemen op de aanwezigheid van eerste Botrytis symptomen. In een enkel geval bij zeer zware besmetting is Botrytis aantasting 1-2 dagen na de oogst zichtbaar maar in de meeste gevallen slaat Botrytis dus zeer onvoorspelbaar toe. De infectie van de partij kan oplopen tot boven de 70% van de bloemen. De Bianca batches (figuur 3) zijn gebruikt om tot een indeling te komen van drie kwaliteitsklassen: goed, matig en slecht. Op basis van deze indeling, die ook statistisch onderbouwd is, zijn er uit elke kwaliteitsklasse 4 partijen geselecteerd voor microarray analyse.



Figuur 3. Overzicht van de Botrytis besmetting van batches Bianca rozen geordend naar besmettingsgraad. Samples zijn aangegeven als datum van het experiment en herkomst van geteeld product.

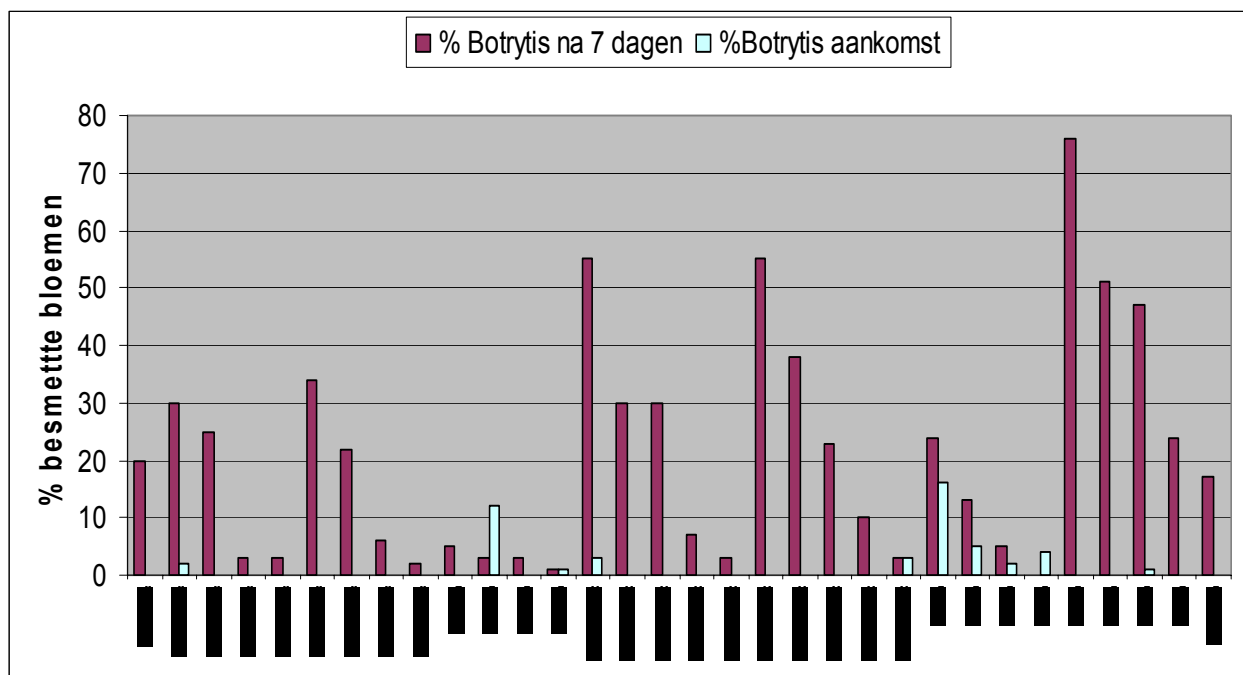
Daarbij is naast de variatie in Botrytis aantasting die de kwaliteitsklasse bepaalt, ook gekeken naar een evenwichtige verdeling van andere parameters per klasse zoals herkomst, jaargetij van experiment en bloemstadium van de bloemen op dag van bemonsteren. Aangezien Botrytis aantasting in verschillende parameters is uit te drukken, met en zonder het meewegen van de hevigheid van de aantasting, kunnen classificaties op verschillende manieren gemaakt worden. In deze fase zijn beide manieren van analyse meegenomen omdat niet bekend is wat de beste manier zou zijn en beste correlaties zullen opleveren. Voor de praktijk zal voornamelijk het aantal

bloemen (of %) die Botrytis symptomen geven de doorslag geven zoals ook in breed geaccepteerde houdbaarheidproeven gebruikt wordt.

Na de experimenten aan Bianca rozen bij AFSG is samengewerkt met het TestCentrum Aalsmeer om een breder assortiment, waaronder Bianca, te bemonsteren en te analyseren op Botrytis. Op de dag van veiling zijn deze partijen bemonsterd (ingevroren) en een gedeelte is gebruikt voor een afzetsimulatie en uitbloei om daarna Botrytis aantasting te scoren volgens standaarden van het TestCentrum. Dezelfde trend als bij Bianca is zichtbaar bij de variatie van Botrytis besmetting van andere cultivars zoals Avalanche, Grand Prix en Milva (zie figuur 4). Op een enkele partij na, zijn deze partijen niet moleculair geanalyseerd. Het zijn echter wel partijen die zeer interessant zijn om de betrouwbaarheid en brede toepassing van de moleculaire merkers te testen.

Deliverables:

- Inventarisatie aantasting in de praktijk
- Onderbouwing van het onvoorspelbare karakter van Botrytis aantasting in de praktijk
- Rozen samples op verschillende dagen na oogst, verschillende cultivars, verschillende herkomsten, in verschillende kwaliteitsklassen
- Uitgangsmateriaal voor microarray analyse en Real Time verificatie experimenten en bredere validatie proeven



Figuur 4 . Botrytis aantasting van verschillende batches rozen van verschillende cultivars geanalyseerd op drie tijdstippen in najaar 2005.

TAAK 3 - Analyse en definitie expressieprofielen

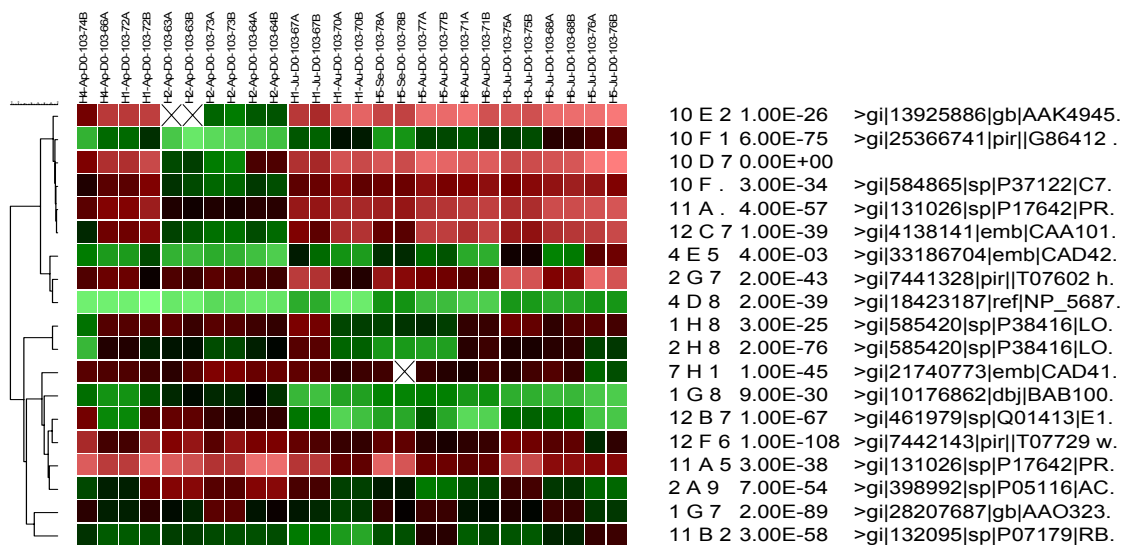
Voor de analyse van genexpressie in tomaat zijn een vijftal cDNA banken geproduceerd met de SSH (suppression subtractive hybridization) methode. Deze methode beoogt de verrijken voor

cDNA's afgeleid van genen die verschillen in expressie nivo's tussen twee partijen biologisch materiaal. Daarvoor werd gekozen voor partijen die in de eerste kwaliteitsverloopproeven duidelijk van elkaar verschilden, en voor twee tijdstippen na de oogst. Daarnaast werd een bank geproduceerd die meer specifiek was voor de groene delen van de tomatentros, om de te produceren array ook bruikbaar te maken voor genexpressie analyse in die delen. Er zijn uit totaal 5 verschillende banken 1924 elementen gesequenced, waarvan 1639 er een bruikbare sequentie opleverden. Na onderlinge vergelijking bleek er sprake van 910 unieke, verschillende sequenties. Al deze, inclusief enkele duplicaties van sequenties die meerdere keren voorkwamen (totaal: 974) en controle-elementen voor kwaliteitsanalyse, zijn opgewerkt voor het maken van de microarray. In het tweede jaar van het project is tegen de verwachtingen in, relatief veel tijd nodig geweest voor het optimaliseren van de verschillende componenten van de genexpressie analyse met microarrays: RNA isolatie, cDNA productie, labelling en array hybridisatie. Na deze optimalisatie werd een groot aantal hybridisaties uitgevoerd met samples van diverse herkomsten en oogsttijdstippen. Hierbij is aanvankelijk gekeken naar veranderingen in genexpressie tot 10 dagen na de oogst, teneinde zo genen te identificeren waarvan de expressie gecorreleerd is met het zachter worden van de vrucht. "Principal component analyse" (PCA) is de voornaamste analysemethode geweest die voor de tomaatarray resultaten is gebruikt, met de daarvan afgeleide "Linear discriminant analysis" (LDA) als middel voor selectie van genen die het meest onderscheidend waren voor twee te vergelijken partijen (verschillende herkomsten en/of kwaliteitsverloop. De analyse van genexpressie in de tijd na de oogst leverde een aantal genen op waarvan expressie duidelijk gecorreleerd was met de tijd, en dus mogelijk met het zachter worden van de vrucht. Echter, teneinde op basis van genexpressie in de vrucht een toets te kunnen ontwikkelen voor het voorspellen van het kwaliteitsverloop op of vlak na het moment van oogst, kan er niet zonder meer van worden uitgegaan dat daarvoor dezelfde set genen bruikbaar is. Er werd daarom een groot aantal hybridisaties uitgevoerd met monsters van verschillende herkomsten en oogsttijdstippen, waar bij alle monsters van direct na de oogst (dag 0) waren. Als maat voor de snelheid van kwaliteitsverloop (zacht worden) werd nu het aantal dagen, nodig om stevigheidsniveau 5 (variërend van 7 tot 53 dagen over verschillende oogstmomenten) te halen, genomen. Vervolgens is geprobeerd met o.a. PCA correlatie tussen genexpressie en "aantal dagen tot stevigheid 5" te detecteren. Er bleek geen eenduidige correlatie geldig voor alle oogstmomenten, vooral omdat de experimenten van april 2003 (met het snelste kwaliteitsverloop en waarvan ook de cDNA banken afgeleid zijn) duidelijk andere "indicatorgenen" opleverde dan de experimenten van andere oogstdata, met slechts kleine overlap. Daarom werd besloten een set potentiële indicatorgenen voor validatie te kiezen, die bestond uit, door PCA aangewezen, de 4% van de microarray spots met de grootste expressieverschillen voor de 2 subsets van experimenten en voor beide subsets gecombineerd. Deze spots, met het resultaat van de Blast-analyse voor homologie met databasegenen, worden in Tabel 1 getoond.

Tabel 1. Lijst van uit microarray-experimenten geselecteerde spots als potentiële indicatorgenen. De eerste 3 kolommen geven aan op basis van welke analyse de spot is geselecteerd: All, alle data; A/J, augustus/juni; AP, April 2003.

All	A/J	AP	ID	Kloon nummer	E 1e hit	Omschrijving 1e hit	Cont nr
X			1C2	1Fnr027	3.00E-17	>gij19209 emb CAA28479.1 unnamed protein product [Lycopersicon	23
	X		1G2	1Fnr093	2.00E-04	>gij4827253 dbj BAA77603.1 plastidic aldolase [Nicotiana paniculata]	65
X		X	1G 8	1Fnr103	9.00E-30	>gij10176862 dbj BAB10068.1 emb CAB80929.1~gene_id:MRO11.1~similar	73
	X	X	2A9	1Fnr139	7.00E-54	>gij398992 sp P05116 ACC1_LYCES 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxi	14
	X		2H8	1Fnr262	2.00E-76	>gij585420 sp P38416 LOXB_LYCES Lipoxygenase B	176
		X	3C7	1Fnr337	2.00E-36	>gij585420 sp P38416 LOXB_LYCES Lipoxygenase B	208
X	X		3D1	1Fnr352	8.00E-57	>gij15223975 ref NP_177875.1 protein disulfide isomerase, putative [Arabido	214
X	X		4E5	3Fnr171	4.00E-03	>gij33186704 emb CAD42938.2 manganese superoxide dismutase [Antrodia	327
	X	X	6H12	7Rnr107	0.00E+00	Geen hit	67
		X	7E4	7Rnr188	5.00E-24	>gij22531416 emb CAD30274.1 IAA16 protein [Gossypium hirsutum]	548
X	X		7H1	7Rnr250	1.00E-45	>gij21740773 emb CAD41250.1 OSJNBa0067K08.14 [Oryza sativa (japonica	601
		X	7H10	7Rnr265	1.00E-43	>gij30696056 ref NP_849818.1 elongation factor -related [Arabidopsis thalian	610
		X	9D7	7Rnr491	1.00E-21	>gij15235450 ref NP_193004.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	734
X		X	10B2	7Rnr558	1.00E-23	>gij6467935 gb AAF13234.1 AF197601_1 ATPase beta subunit [Triglochin	113
	X	X	10D7	9Fnr023	0.00E+00	Geen hit	788
X	X	X	10D9	9Fnr028	8.00E-15	>gij18146829 dbj BAB82473.1 chitinase 3 [Triticum aestivum]	474
X		X	10E2	9Fnr041	1.00E-26	>gij13925886 gb AAK49456.1 AF307145_1 glutamine-dependent asparagine	792
X		X	10E5	9Fnr046	0.00E+00	Geen hit	794
X	X	X	10F1	9Fnr061	6.00E-75	>gij25366741 pir G86412 F28N24.24 protein - Arabidopsis thaliana	799
		X	10F3	9Fnr063	1.00E-24	>gij7489029 pir T07161 late-embryogenesis protein homolog - tomato	801
X		X	10F10	9Fnr079	3.00E-16	>gij30844172 gb AAP35271.1 chitinase [Euonymus europaeus]	113
X		X	11A7	9Fnr109	2.00E-17	>gij6164588 gb AAF04454.1 AF000966_1 chitinase [Poa pratensis]	807
		X	11A10	9Fnr113	4.00E-57	>gij131026 sp P17642 PRS2_SOLTU Pathogenesis-related protein STH-2	818
X		X	11B8	9Fnr134	2.00E-17	>gij6164588 gb AAF04454.1 AF000966_1 chitinase [Poa pratensis]	113
X		X	12A1	9Fnr244	2.00E-83	>gij131026 sp P17642 PRS2_SOLTU Pathogenesis-related protein STH-2	818
X	X		12B7	9Fnr289	1.00E-67	>gij461979 sp Q01413 E13B_LYCES Glucan endo-1,3-beta-glucosidase B precursor ((1->3)-beta-glucan endohydrolase B)	846
X	X	X	12 B 8	9Fnr293	0.00E+00	Geen hit	807
X		X	12C9	9Fnr323	2.00E-17	>gij6164588 gb AAF04454.1 AF000966_1 chitinase [Poa pratensis]	113
X	X		12D12	9Fnr349	2.90E+00	>gij18309513 ref NP_561447.1 two-component sensor histidine kinase	857

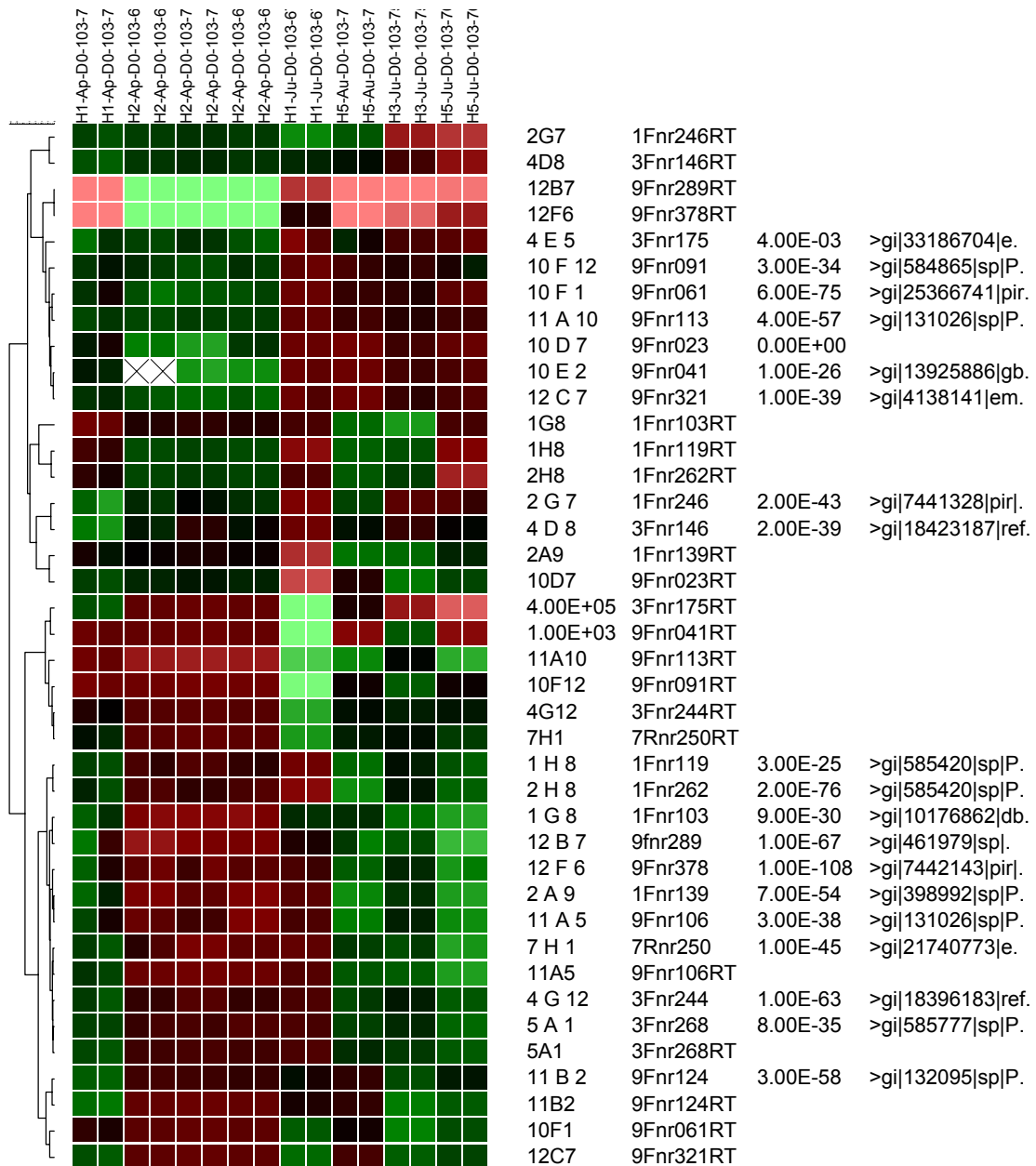
De 29 gekozen spots werden, omdat enkele spots hetzelfde gen vertegenwoordigden, aangevuld tot 30 werkelijk verschillende potentiële indicatorgenen. Hierin inbegrepen waren 2 genen die over alle experimenten slechts geringe expressievariatie vertoonden, en 1 onafhankelijk gekozen gen, om te dienen als interne referentie in RT-PCR experimenten. Vervolgens werden voor deze 30 genen primers voor RT-PCR ontworpen en getest. Na initiële testen op detectie van RT-PCR producten en reproduceerbaarheid bleven 20 primerparen bruikbaar voor gedetailleerde analyse van genexpressie met RT-PCR ter vergelijking met en ter bevestiging van de microarray resultaten. De microarray resultaten voor deze spots zijn te zien in figuur 5. De resultaten van de verschillende spots zijn geclusterd volgens de Pearson methode, welke resultaten clusterd naar gelijkende trends over alle experimenten. Daar de spots zijn geselecteerd voor variatie van laag naar hoog of andersom, is een duidelijke verdeling in twee clusters te zien: bovenste cluster van laag naar hoog, onderste cluster andersom. In figuur 5 is ook duidelijk te zien dat de experimenten in twee groepen zijn in te delen, nl. de experimenten met materiaal van April 2003 (eerste 10 kolommen) en die van juni, augustus en september (de rest). Clustering van de experimenten (kolommen) in figuur 5 levert ook twee duidelijke clusters op basis van dit verschil (niet getoond). Dit was de basis voor twee aparte selecties van spots.



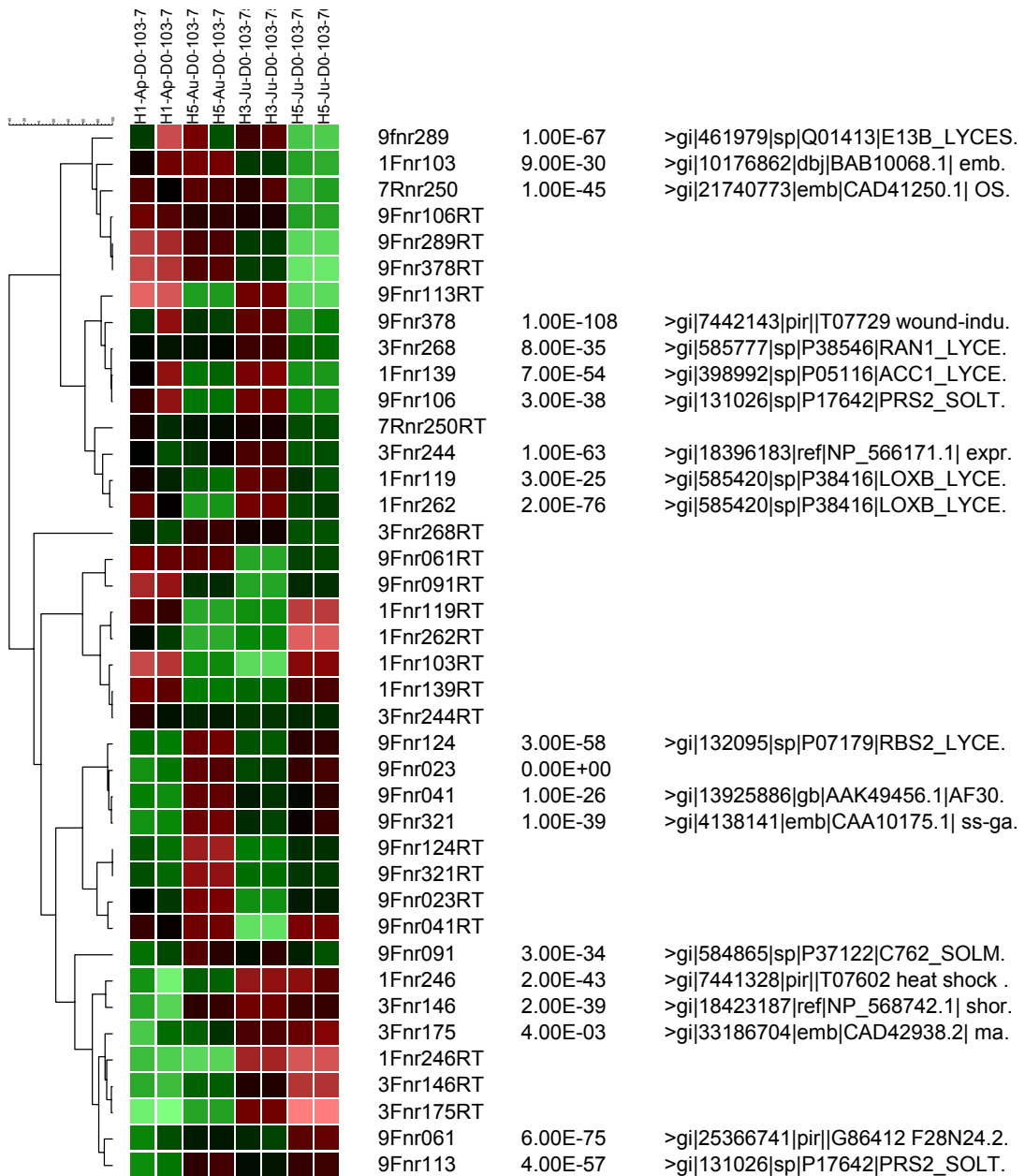
Figuur 5. Genexpressie van 19 spots (horizontale rijen), die geselecteerd werden voor bevestiging met RT-PCR (referentiespots, die geen variatie in genexpressie vertonen, zijn weggelaten). Genexpressie in experimenten (kolommen) met van links naar rechts oplopende tijden tot stevigheid 5. Genexpressie als ratio (2log) t.o.v. een algemeen referentie sample is weergegeven in kleurcode: groen is lager dan de referentie, rood is hoger; zwart is gelijk aan referentie. Hoe intenser de kleur, hoe groter het verschil met de referentie.

Van 6 van de herkomst/oogstmoment-combinaties is materiaal getest met RT-PCR om de uitkomsten te vergelijken met die van microarray hybridisaties van hetzelfde materiaal. Daar kwantitatieve data van microarrays en RT-PCR niet makkelijk direct met elkaar te vergelijken zijn, is gekozen voor Pearson clustering in een gezamenlijke datamatrix voor microarray en RT-PCR resultaten, na standaardisatie van de getallen (ratios). Met Pearson clustering kan gecontroleerd worden of array- en RT-data dezelfde trend vertonen over verschillende experimenten, herkomsten en oogstmomenten. Wanneer alle experimenten waarvan zowel array als RT-data voorhanden zijn worden gebruikt, levert Pearson clustering een uitkomst als getoond in figuur 6.. Wanneer beide typen data voor een kloon bij elkaar clusteren is er dus een grote gelijkheid in de algemene trend, met andere woorden de RT-PCR data ondersteunen de keuze als indicatorgenen op basis van de microarray data. Een snelle analyse van figuur 6 leert dat dit voor een matrix van alle data zelden het geval is. In dit geval clusteren vooral veel RT-PCR datarijen samen, i.p.v. dat de RT-rij van een kloon clusteren met de array-rij van dezelfde kloon. Dit lijkt met name veroorzaakt door relatief extreme variaties in twee RT-PCR rijen (12B7 en 12F6) en door de eerder genoemde tweedeling in de experimentele data voor de meeste spots (oogstmoment april 2003 versus de rest). Wanneer een subset van de data, zonder de meeste data van april 2003, op dezelfde manier wordt geanalyseerd, blijkt de clustering van array en RT-PCR voor een groter deel van de spots op te gaan (figuur 7). Hiermee kan een aantal potentiële indicatorgenen worden geïdentificeerd, waarvan de expressie positief of negatief gecorreleerd is met tijd tot stevigheid 5 én dezelfde trend wordt bevestigd door de RT-PCR data. Deze zijn 1F246, 3F146, 3F175 (onderaan figuur 7) en 9F289 (bovenaan). Tevens is er een groep (9F124-9F321) waarvan array en RT-data wel goed gecorreleerd zijn, maar die in deze subset geen goed indicatorgenen lijken (geen duidelijk opwaartse of neerwaartse trend).

Een zelfde analyse van de data van april 2003 laat geen enkele correlatie zien tussen data van de array en van RT-PCR, daarmee bevestigend dat deze data verantwoordelijk zijn voor de relatief slechte correlatie in de gehele dataset (figuur 6). Samenvattend kan voorzichtig geconcludeerd worden dat van de eerder genoemde twee subsets van data, waarvan elk een aantal potentiële indicatorgenen is geselecteerd, de subset van april 2003 niet reproduceerbaar is met RT-PCR. dat De selectie van indicatorgenen op basis van resultaten met die subset is daarom waarschijnlijk van weinig waarde, terwijl de indicatorgenen op basis van de andere subset de meeste kans hebben uiteindelijk gevalideerd te worden. Een nieuwe, grotere selectie van potentiële indicatorgenen uit de data met uitsluiting van de april 2003 subset, in combinatie met bevestiging door RT-PCR zou meer gevalideerde indicatorgenen kunnen opleveren.



Figuur 6.. Pearson clustering van gecombineerde array en RT-data. In de tweede annotatiekolom is met RT aangegeven wanneer de RT-data van een kloon zijn gebruikt.



Figuur 7. Clusteranalyse van array en RT-resultaten voor een subset van de oogstmomenten (vnl. augustus en juni 2004)

Deliverables:

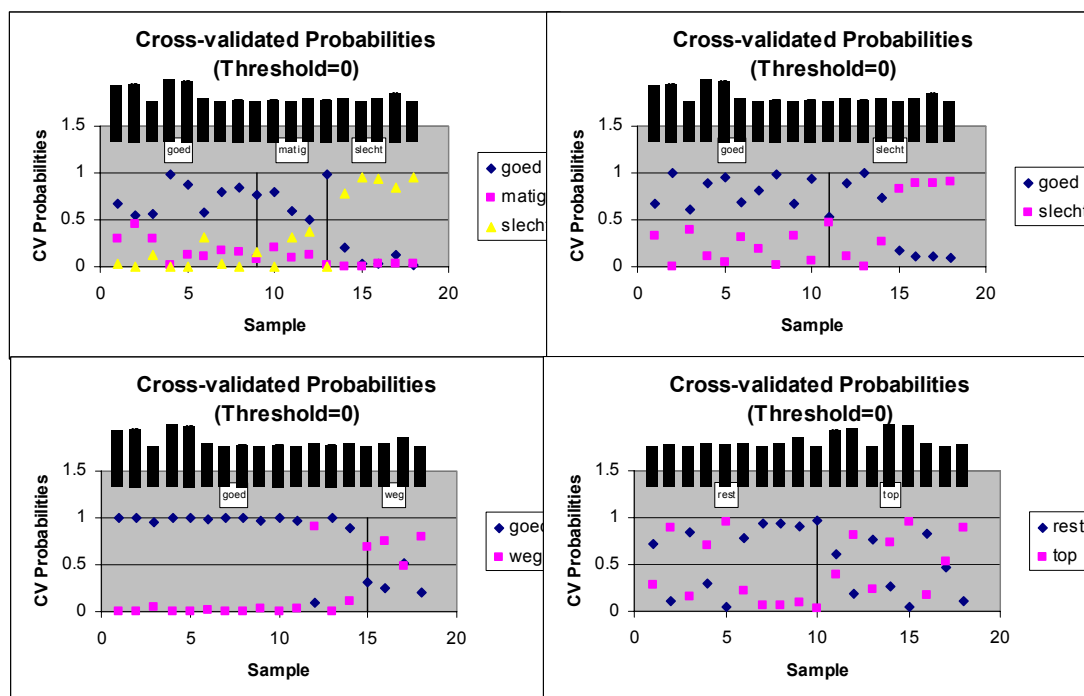
- cDNA (SSH) banken van tomatenvruchten en groene delen
- Sequentie informatie van 1700 tot expressie komende genen van tomaat
- Microarray met 974 elementen van tomaat
- RNA isolatie, hybridisatie en labelingsprotocollen voor tomaat
- Kennis opbouw betreffende statistische analyses rond microarray en Real Time PCR analyse
- Real Time PCR analyse voor 20 individuele genen van tomaat

Bij roos is dezelfde weg bewandeld als bij tomaat. Eerst zijn 2 expressie banken gemaakt, een totaal cDNA bank van buiten petalen van lichtbesmette Bianca rozen en een andere cDNA bank waarbij door subtractie met binnen petalen verrijkt is voor mogelijk interessant tot expressie komende genen. Na sequencing en analyse van de sequences zijn unieke genen geselecteerd. Hiervoor is nieuwe software ontwikkeld om efficiënt sequenties te blasten, blast resultaten om te zetten naar bewerkbare Excel files, clonen te selecteren en hulpmiddelen te genereren om foutloos clonen uit microtiterplaten te selecteren om om te zetten naar nieuwe platen voor amplificeren van de DNA fragmenten. Meer dan 1200 clonen zijn vervolgens vermenigvuldigd en geprint op een glas slide, de uiteindelijke microarray. Deze array is eerst getest met een ontwikkelingsreeks van bloemen in verschillende bloeistadia en zo'n zelfde reeks met een toenemende mate van Botrytis aantasting. Na enige optimalisatie van het hybridisatie protocol zagen de hybridisaties er zeer herhaalbaar en betrouwbaar uit. Hybridisatie van de microarray met RNA afkomstig van hevig geïnfecteerde bloemblaadjes resulteerde in de detectie van schimmel genen en rozen genen waarvan het zeer aannemelijk was dat ze met resistentie of reponsen op Botrytis te maken hebben.

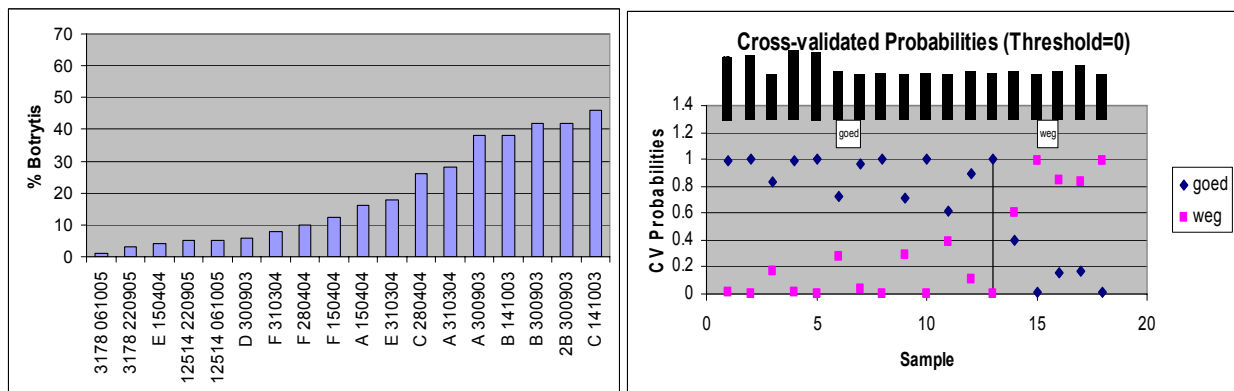
Daarna zijn de arrays gebruikt om verschillende batches rozen te analyseren. Het materiaal was afkomstig van rozen 1 dag na de oogst waarin niet of nauwelijks Botrytis aantasting waarneembaar was. De batches konden onderverdeeld worden in 3 kwaliteitsklassen. Uit elke klasse zijn 4 monsters in 3-voud gehybridiseerd. Met verschillende analyse methoden is er gezocht naar genen waarvan de expressie correleerden met Botrytis aantasting na 1 week incubatie in een standaard uitbloeiruimte.

Dit heeft geleid tot een selectie van 35 potentiële indicator genen die mogelijk inzetbaar zijn als indicatoren voor het voorspellen van de vatbaarheid voor Botrytis. De genexpressie van deze genen zijn vervolgens met behulp van een andere analyse methode voor genexpressie onderzocht. De betreffende Real Time PCR methode kan potentieel leiden tot een praktische kwantitatieve toetsmethode hoewel de tijd en kosten per analyse nog aan de hoge kant zijn. Voor de Real Time PCR analyse zijn primers ontworpen, getest en geoptimaliseerd. Ook is gekeken of de RNA methode gestandaardiseerd kan worden door gebruik te maken van commerciële RNA isolatie kitjes. Dit laatste bleek tegen te vallen omdat opbrengsten RNA aan de lage kant waren, onzuiver waren of wisselende resultaten gaven. Daarom is voor deze analyse nog even teruggegrepen op de CTAB RNA isolatie met een Qiagen RNA purificatie stap. Hopelijk dat in de toekomst wel een eenvoudiger methode gevonden wordt die het detectieproces kan versnellen. Met de opgezette Real Time PCR methode is vervolgens gekeken naar de genexpressie van 34 genen in 18 monsters en zijn deze data vervolgens gekoppeld aan het voorkomen van Botrytis in die partijen.

Na analyse van de data met het Predicted Analysis Microarray programma bleek dat de indeling in verschillende kwaliteitsklassen niet zo eenvoudig was. Een indeling in 3 klassen (goed, matig, slecht) was onbetrouwbaar (figuur 8, linksboven). Een indeling in 2 klassen goed en slecht lijkt alleen mogelijk indien de grens goed getrokken wordt, bij een ruime definitie van slecht vallen veel minder slechte in de verkeerde klasse (figuur 8, rechts boven), hetzelfde geldt voor het omgekeerde wanneer de grens bij alleen zeer slechte partijen wordt gelegd (figuur 8, links onder). Ook bij een selectie van de toppartijen (onder de 10% Botrytis aantasting) lijkt de correlatie niet goed op te gaan. Echter als we de grens van de kwaliteitsklassen bij de 30% aantasting leggen en de partijen op basis hiervan in 2 klassen (goed en slecht) indelen, kunnen deze groepen goed voorspeld worden op basis van de gemeten genexpressie (figuur 9). Dit kon niet alleen op basis van 34 geanalyseerde genen maar het aantal genen kon sterk verminderd worden zonder dat het de betrouwbaarheid van de test verminderde. Uiteindelijk bleek dat de voorspelling in de 2 kwaliteitsklassen gemaakt kon worden op basis van de analyse van 2 genen, genormaliseerd met 2 huishoudgenen (figuur 9). Als deze analyse voor meerdere monsters overeind blijft zou dat een enorme versimpeling van de test geven. Van beide genen is niets bekend, de sequentie informatie geeft geen enkele link met de mogelijke functie van de twee genen. We weten nu enkel dat het gen 626 relatief hoog tot expressie komt in partijen met weinig Botrytis aantasting en het gen 277 juist relatief laag tot expressie komt in dezelfde goede partijen.

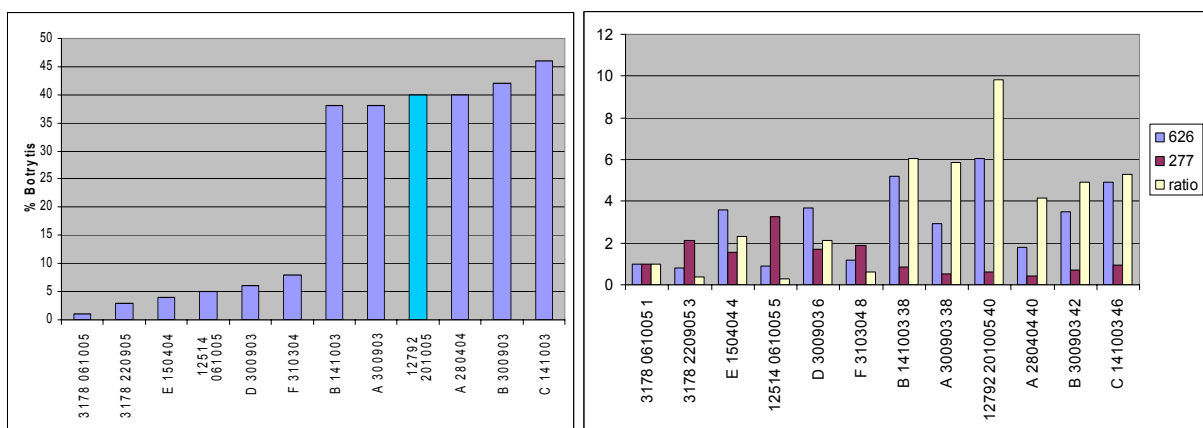


Figuur 8.. Resultaten van de PAM analyse gedaan op de genexpressie van 34 genen, genormaliseerd met 4 huishoudgenen, uitgevoerd op 17 partijen (1 in duplo). Links boven - indeling op 3 kwaliteitsklassen; rechts boven - indeling naar goede en slechte partijen met een grens van 20% aantasting; links onder - indeling naar goede en slechte partijen met een grens bij 40% botrytisi aantasting; rechts onder – indeling naar top partijen (minder dan 10% aantasting) en rest. Geen van deze klassenindelingen bleek goed te voorspellen op basis van genexpressie



Figuur 9. Correlatie tussen Botrytis aantasting en voorspelling in kwaliteitsklassen op basis van gen expressie. In het linker panel is de Botrytis aantasting weergegeven van de partijen die gebruikt zijn in de genexpressie analyse en staan tevens in dezelfde volgorde als de voorspellingsresultaten in het rechterpanel. Deze voorspelling was mogelijk op basis van 2 genen.

Hierdoor zou het in theorie ook mogelijk zijn om zonder normalisatie genen te werken omdat je misschien geen absolute expressie hoeft te detecteren maar dat ratio's ook een zeer goed beeld geven. Dat laatste is getest op een aantal monsters (figuur 10) waarbij duidelijk werd dat ratio's tussen 626 en 277 inderdaad een goede correlatie geven met kwaliteitsklasse.



Figuur 10. Indeling van de batches rozen naar gene expressie en ratio van 2 genen. Linker panel geeft de Botrytis aantasting van de geteste partijen aan, donker blauwe bars zijn Bianca's, licht blauw is Avalanche. Rechter panel de relatieve gen expressie van de verder onbekende genen 626 en 277 en de ratio tussen deze genen gedetecteerd bij dezelfde batches (staan in dezelfde volgorde) als in het linker panel. De ratio van de genexpressie koppelt sterk met de mate van Botrytis aantasting.

Verdere validatie van deze methode zal moeten volgen door meer partijen te testen. Pas bij een goede correlatie van heel veel partijen en verschillende herkomsten, veel verschillende cultivars en een classificatie van de partijen die overeenkomt met de wensen uit de praktijk zal er sprake zijn van een praktische waarde en inzetbaarheid van de test. Tot nu toe lijkt het 'proof of principle' geleverd dat op basis van genexpressie een voorspelling is te maken over Botrytis problemen die tot uiting kunnen komen in de naooogst fase.

Deliverables

- cDNA banken, een random en een subtractie bank verrijkt voor licht besmette buitenpetalen
- Sequentie informatie van 1400 tot expressie komende genen van roos
- Software tools voor het hanteren en assisteren bij het selecteren en amplificeren van de juiste klonen
- Microarray met 1200 genen van roos
- RNA isolatie, hybridisatie en labelingsprotocollen voor roos
- Kennisopbouw betreffende statistische analyses rond microarray en Real Time PCR analyse
- Real Time PCR analysis voor 38 individuele genen van roos
- Proof of principle voor het gebruik van gen expressie voor het voorspellen van Botrytis aantasting aangetoont bij 24 batches Bianca rozen en 1 geteste Avalanche

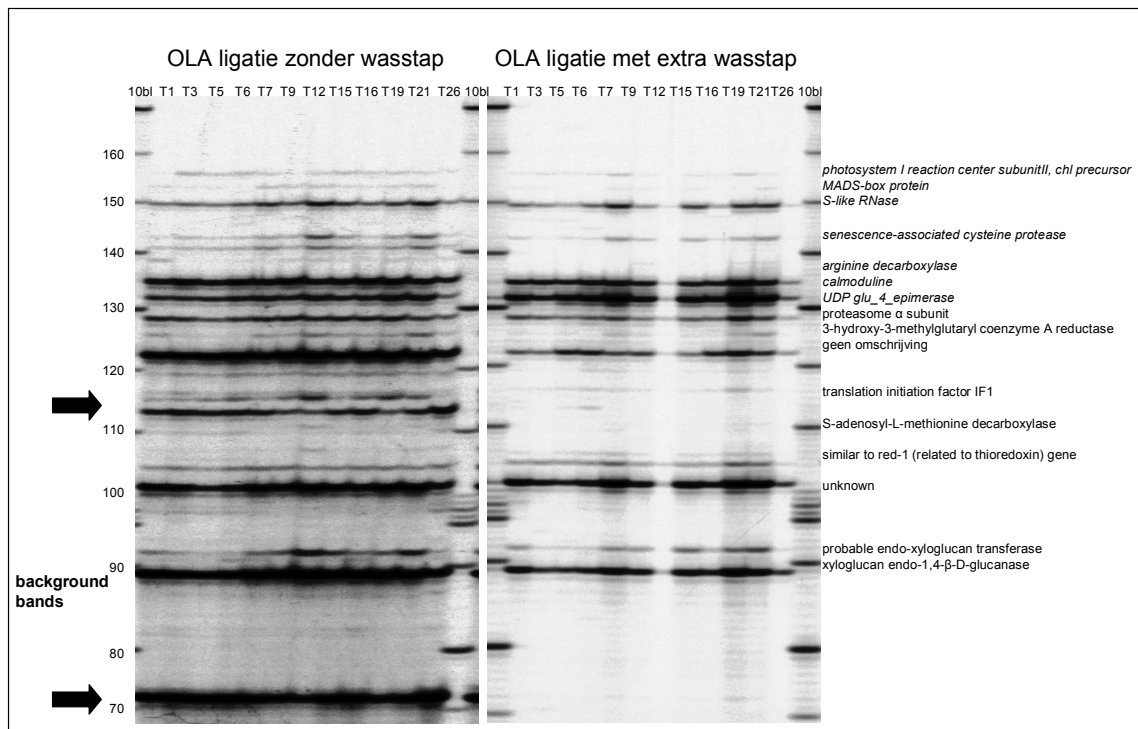
TAAK 4 - Ontwikkeling multiplex toetsmethode

Keygene's bijdrage aan het EET-OKEE project is te komen tot een betrouwbare, goedkope en snelle toets voor product beoordeling en bewaking. Deze toets, QualityQuantifier (QQ) genoemd, is gebaseerd op de door Keygene N.V. gepatenteerde SNPWave™ technologie, welke is gericht op het routinematig detecteren van genomische SNP (single nucleotide polymorphism) merkers in een multiplex assay voor genetische analyse. In tegenstelling tot het detecteren van genetische eigenschappen zal de QQ toets gericht zijn op het meten van genexpressie (mRNA) niveau's in een multiplex setting. Voor de toets wordt gebruik gemaakt van de microarray selectie van genen indicatief voor roos-Botrytis infectie en niet beïnvloede controle genen zoals vastgesteld door A&F in taak3. Met deze data is een toets ontwikkeld waarmee op grond van meting van genexpressie van meerdere genen tegelijkertijd een uitspraak kan worden gedaan over de kwaliteit (mate van besmetting) van het geanalyseerde roos monster.

- QQ toets experimenteel

De experimentele uitvoering van de toets is in de afgelopen periode verder ontwikkeld. Naast de verwachte fragmenten van bekende lengte werden in het profiel een aantal sterke afwijkende banden waargenomen. Deze zouden verklaard kunnen worden door aspecifieke annealing, en amplificatie van OLA oligonucleotide probes en amplificatie oligonucleotiden die aanwezig zijn in de PCR reactie. Nadere analyse van de oligo sequenties heeft echter geen duidelijke aanleiding gevonden. Door zuivering van de aan beads gebonden OLA hybridisatie-ligatie produkten van de complexe oligonucleotide mix voor de daaropvolgende PCR kon de aspecifieke achtergrond volledig geëlimineerd worden (figuur 11). Vergelijking van de linker en rechter panelen in figuur X laat duidelijk de eliminatie van de sterke achtergrond banden zien op de hoogte van ongeveer 70 en 113 bp. Verder is het totale profiel helderder geworden door het verdwijnen van de lichtere

diffuse achtergrond. Met deze stap resulteert het QualityQuantifier experimentele protocol in een definitief te volgen experimenteel protocol voor de analyses binnen het EET-OKEE project.

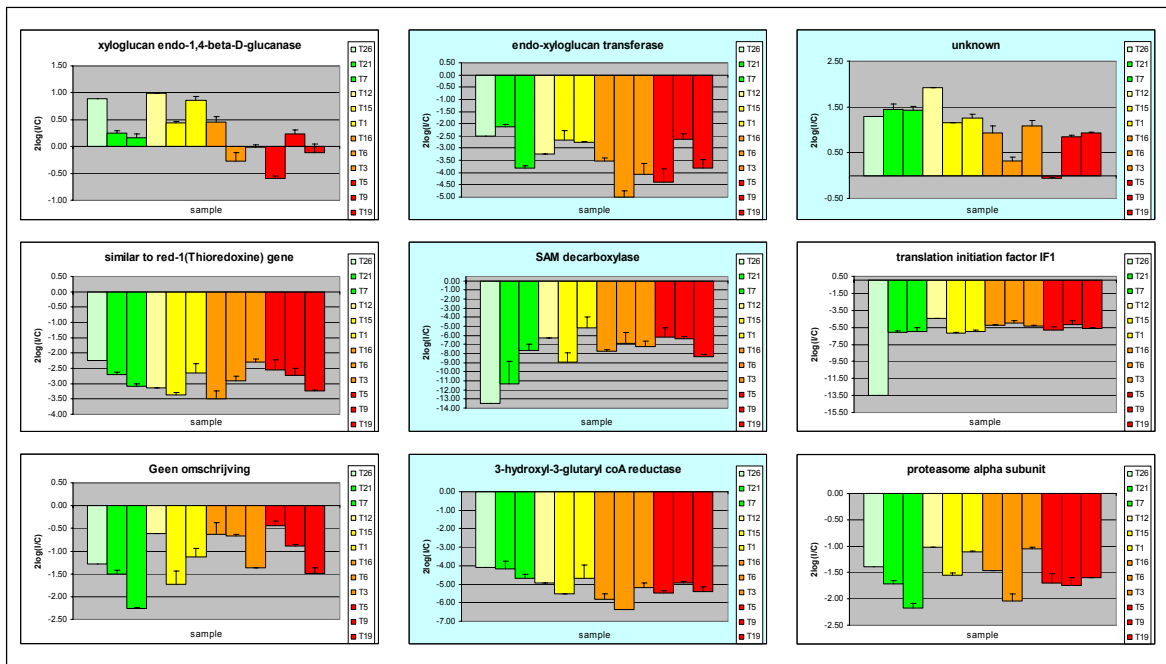


Figuur 11. Bead zuivering van OLA ligatie producten. Het linker paneel toont het amplificatie profiel van indicator en constitutieve genen zonder zuivering, het rechterpaneel het profiel na zuivering. De sterke achtergrond amplificatiefragmenten worden aangegeven met de pijlen

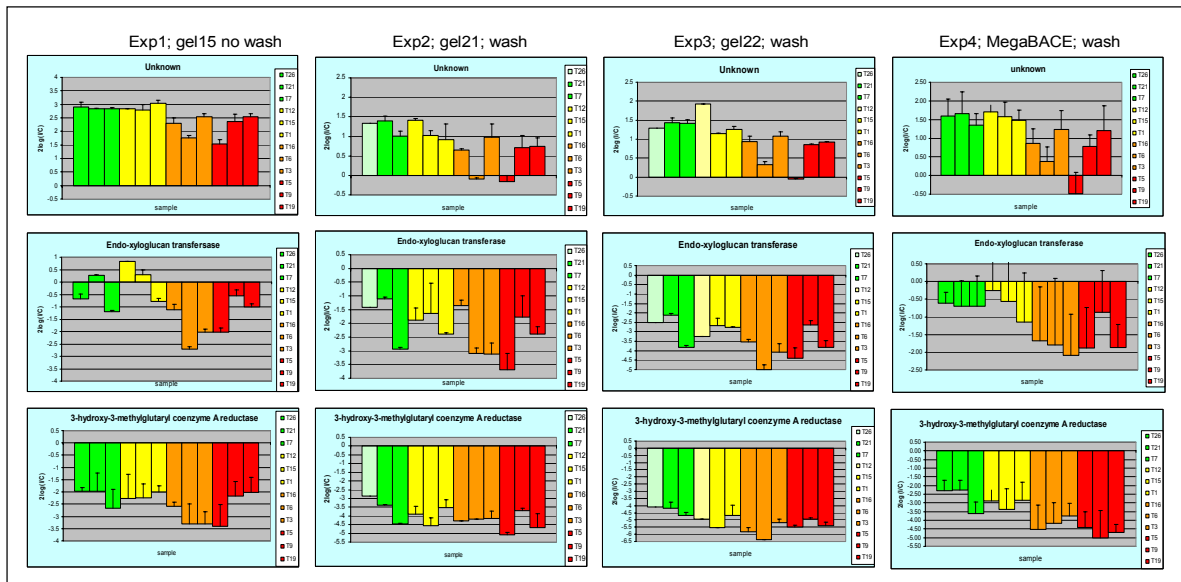
- QQ toets quantificatie

De signaalsterktes van de met het bovenstaande experimentele protocol gemaakte profielen zijn gekwantificeerd. Hiertoe is eerst vastgesteld dat voor de sterke signalen geen experimentele verzadiging van signaal is opgetreden, en waar nodig zijn meerdere radioactieve belichtingen gebruikt. De signalen waren hoe dan ook geen probleem voor het grote dynamisch bereik van de MegaBACE (capillaire elektroforese). Met bestaande Keygene N.V. AFLP software zijn de waargenomen banden geïndiceerd en is hun signaalsterkte gemeten. Allereerst is vastgesteld of de waargenomen signalen van de constitutieve controle genen daadwerkelijk onafhankelijk waren van Botrytis infectie. Alleen die genen (4) die voldoende sterke signalen gaven en geen expressie verschillen te zien gaven tussen wel en niet geïnfecteerde planten zijn als standaard voor quantificatie gebruikt.

Van de genexpressie van deze genen is een gemiddelde signaalsterkte berekend die als normalisatie waarde fungeert ten opzichte van de signaalsterkte van de genen indicatief voor botrytis infectie binnen een roos monster. Door normalisatie binnen een monster uit te voeren zijn correcties voor fluctuaties in totale signaalsterkte tussen monster niet nodig.



Figuur 12. Voorbeeld van berekende $2\log$ (indicator/gemiddeld constant) waarden voor indicator genexpressie met standaard deviatie over duplo metingen in een QQ toets experiment. De in groen weergegeven roosmonsters scoren in de Botrytis biologische toets goed, de gele monsters scoren redelijk, de oranje slecht en de rode zeer slecht. Lichte kleuren representeren een meting in enkelvoud. Genen met relevante trends worden weergegeven in blauw.



Figuur 13. Selectie van botrytis indicator genen uit afzonderlijke experimenten., met en zonder bead zuivering. Roosmonster weergave zoals in figuur 12.

Het expressie niveau van de indicatorgenen wordt berekend als $^2\log$ (indicator/gemiddeld constant) en deze waarden worden op het oog geanalyseerd op trends in relatie tot de mate van botrytis besmetting met klassen goed; redelijk, slecht; zeer slecht; zoals eerder bepaald door A&F. De absolute expressie waarden worden niet gebruikt voor vergelijking omdat deze van teveel parameters in de experimenten afhankelijk zijn en wellicht niet meer representatie voor de oorspronkelijke mRNA niveau's. De resultaten van een dergelijke analyse van een van de experimenten wordt getoond in figuur 12.

De data van vier verschillende (3 radioactief en 1 MegaBACE) experimenten zijn onderling vergeleken en alleen de genen die duidelijk in alle experimenten dezelfde trends te zien gaven zijn geselecteerd als "echte" indicatoren voor Botrytis infectie. Het resultaat van deze vergelijking wordt getoond in figuur 13

Uiteindelijk zijn dus van de toets op veertien genen er drie die consistent dezelfde genexpressie trend weergeven in relatie tot de mate van Botrytis infectie.

- Gen selectie voor Botrytis infectie

Uit de diverse experimenten zijn uiteindelijk drie indicator genen en vier constante genen naar voren gekomen. Deze genen worden weergegeven in tabel 2.

Tabel2. Selectie van geschikte genen voor de roos/Botrytis QualityQuantifier toets

	gen in microarray analyse	annotatie
constitutief	OProseR0947	UDPglu-4-epimerase
	OProseR1038	Calmoduline
	OProseR1062	S-like RNase
	OProseR1711	PhotosystemI reaction centre II
indicator	OProseR0060	Endo-xyloglucan transferase
	OProseR0277	Unknown
	OProseR1727	3-hydroxy-3-glutaryl coA reductase

Van de geselecteerde indicator genen is OProseR0277 (Unknown) ook door A&F op grond van RT-PCR resultaten (zie boven) onafhankelijk geselecteerd als geschikte indicator. De andere genen zijn alleen met de QQ toets gevonden. Om de bruikbaarheid van de geselecteerde genen te valideren is een grotere set van onafhankelijke roosmonsters nodig. Deze is voorhanden maar helaas is een eerste experiment met deze set monsters niet gelukt. (data niet getoond). Omdat in de experimentele planning tot einde 2005 budget er ook tijd gereserveerd was voor de geplande experimenten aan tomaat kwam de beslissing om niet verder te gaan met dit gewas helaas te laat om nog meer experimenten uit te voeren en meerdere kandidaat indicatorgenen te testen binnen dit project. Echter met de nu gevonden genen is "proof of concept" geleverd voor het gebruik van de QQ toets bij roos.

Deliverables

- OLA oligonucleotide probe ontwikkeling en oligonucleotide collectie voor inzet in de QQ toets
- mRNA isolatie, cDNA synthese, OLA hybridisatie en amplificatie reactie protocollen geschikt voor inzet in een routinematige laboratorium setting
- Selectie van constitutieve “controle” genen met expressieniveau’s onafhankelijk van Botrytis infectie
- Selectie van “indicator” genen met een expressie profiel indicatief voor Botrytis besmetting
- Validatie van het principe van kwantitatieve mRNA/cDNA OLA hybridisatie en amplificatie volgens het QualityQuantifier protocol
- Ontwikkeling van een QQ score methodiek op grond van radioactieve en capillaire electroforese data.
- Proof of principle van de QualityQuantifier toets bij roos door analyse van 12 bekende Bianca roos monsters.

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

Het doel binnen deze taak was om uitgewerkte genexpressie gegevens te koppelen aan voorspellingen over kwaliteitverlies. Deze analyses zijn zoals hierboven beschreven natuurlijk gebruikt bij het ontwikkelen van de genen en het koppelen met kwaliteitsdata, maar de bedoeling was om deze voorspelling nog verder te trekken zodat je ook voorspellingen zou kunnen doen over mogelijke temperatuurbijstellingen tijdens het transport zodat de producten goed worden afgeleverd daar er bij goede producten een energiewinst te behalen is door minder te koelen. Hetzelfde voor een integratie van de genexpressie toetsen bij luchttransport van rozen. Graag hadden we met een bijna gereed product een test gedaan bij luchttransport om samen met transporteurs tot een oordeel te komen over welke partijen op welke gronden beter niet meer vervoerd zouden kunnen worden. Ook hierbij zou een ecologisch voordeel doorslag kunnen geven bij de selectie en dus veel energie besparen, één van de uitgangspunten van het project. Met het beschikbaar komen van genexpressie data is wel een eerste aanzet gemaakt tot het koppelen van kwaliteitsverloop met genexpressie. Aangezien genen nog gevalideerd moeten worden en deze validatieproeven mogelijk betrouwbaardere genexpressie profielen opleveren zal gewacht worden met uitgebreidere analyses tot meer gegevens beschikbaar zijn. Om meer partijen van roos te kunnen screenen is contact gezocht met het Testcentrum van de Bloemenveiling Aalsmeer. Hiermee wordt dus een volgende stap gezet naar validatie en integratie van de test in bestaande houdbaarheidstesten. Verdere uitwerking van de resultaten van dit project zal moeten geschieden in nieuwe projecten die aangeboden zullen worden aan diverse partners in de keten van roos en tomaat.

2.2 Problemen en oplossingen

Tijdens het onderzoek hebben zich kleine problemen voorgedaan die enig oponthoud hebben gegeven.

Het moleculaire onderzoek bij tomaat was in eerste instantie afhankelijk van partijen tomaten die variabel kwaliteitverloop lieten zien. Hierdoor liep het onderzoek bij tomaat altijd iets achter op het onderzoek bij roos. De microarray hybridisaties bij tomaat liepen ook iets minder soepel dan verwacht, de hoeveelheden RNA die uit het gesamplede materiaal gehaald kon worden lagen veel lager dan bij eerder uitgevoerd onderzoek aan tomaat. Waarschijnlijk beïnvloede het rijpeningsstadium of bewaarconditie van de tomaten de hoeveelheid gen expressie en daarmee de RNA opbrengst. Na optimalisatie van het RNA isolatie protocol en microarray hybridisatie protocol werden uiteindelijk toch betrouwbare gen expressie profielen verkregen.

Het moleculaire onderzoek bij roos verliep voorspoedig totdat gewerkt werd aan het standaardiseren en optimaliseren van RNA isolatie en Real Time PCR. Geen van de RNA isolatie kits die inzetbaar zouden zijn voor eenvoudige overdracht naar andere labs bleek een betrouwbare standaard en zuivere opbrengst van RNA te garanderen, waardoor nog even teruggerepen moest worden op de bewerkelijke CTAB RNA isolatie protocol. Ook het opzetten van Real Time PCRs voor alle 35 genen die een gelijkwaardige PCR efficiency hadden bleek langer te duren dan verwacht. Na het testen van verschillende primers zijn uiteindelijk toch bijna alle genen succesvol omgezet in Real Time PCRs en gebruikt voor analyse van verschillende partijen rozen.

Bij de ontwikkeling van de multiplex toets zijn stapsgewijs diverse problemen overwonnen tijdens de optimalisatie van het assay. Initiële pogingen om directe ligatie op RNA te laten plaatsvinden bleken onreproduceerbaar en inefficiënt. Dit werd opgelost door first-strand cDNA als bron voor ligatie te gebruiken. Het gebruik van dynabeads voor mRNA isolatie en zuivering van cDNA en OLA ligatie producten zorgde uiteindelijk voor een efficiënte en zuivere amplificatie van OLA hybridisatie-ligatie producten. Hiermee is een volledig operationele toets procedure tot stand gekomen.

2.3 Wijzigingen in het projectplan

Wijzigingen in het projectplan hebben zich nauwelijks voorgedaan. Sommige van de individuele stappen in het onderzoek hebben iets meer tijd gekost dan van te voren gepland. Daardoor hebben we aan het eind niet alle verwachte validatie studies kunnen uitvoeren die we aan het begin van het project hadden gesteld. Ons inziens hebben we echter wel de oorspronkelijke doelstelling van het project behaald en valt de volgende stap van het onderzoek meer onder industriële applicatie, validatie en implementatie.

2.4 Samenwerking partners

De samenwerking tussen de partners verliep uitstekend. Op alle fronten moest goed worden samengewerkt omdat materiaal en kennis transfer van de ene naar de andere partner noodzakelijk was voor de voortgang. Op het juiste moment konden partners elkaar de nodige spullen aanleveren waardoor het project geen oponthoud heeft geleden. In de toekomst hopen alle

partijen vaker elkaar te betrekken in onderzoeksprojecten waarin elkaars kennis en expertise goed tot zijn recht komt.

3 Kosten overzicht

De projectfinanciering is tot stand gekomen uit de laatste reserves van het EET budget beschikbaar voor deze tender. Hierdoor was er minder budget beschikbaar, moest het hele project aangepast en is er daarna nog een aftopping van budget doorgevoerd. Toch hebben we geprobeerd met het beschikbare budget zoveel mogelijk van de oorspronkelijke doelstelling te verwezenlijken waar we blijkens dit verslag goed in geslaagd zijn. Productschap tuinbouw heeft voor A&F en PRI de kosten aangevuld op basis van 12.5% van het totaal budget zodat de eigenbijdrage van de genoemde instituten niet onder de 25% is gekomen.

In het begin van het project waren er onduidelijkheden hoe om te gaan met de kosten voor het sequencen van de DNA fragmenten door Greenomics, onderdeel van PRI. Hierdoor heeft PRI enige verschuivingen in de begroting moeten uitvoeren om dit sluitend te krijgen.

Middels een brief is tussentijds aangegeven waar verschuivingen in inspanningen waren (zelf uitvoeren van proeven die gepland stonden voor derden en minder congresbezoek en dit geld gebruikt voor experimentele tijd). Deze verschuivingen zijn door EET geaccepteerd binnen de voorwaarde dat dit budgetneutraal zou gebeuren.

4 Stand van zaken

4.1 Patent octrooi aanvragen

De resultaten van het onderzoek zullen opgenomen worden in een patentaanvraag getiteld 'Genomics-based quality diagnostics for fresh agricultural products'. Dit patent is ingediend door Monique van Wordragen, initiatief neemster van dit onderzoek en werkzaam binnen AFSG als senioronderzoekster. Het patent beschrijft de toepassing van genexpressieprofielering voor diagnostische voorspellingen van kwaliteit van agroproducten. Het patent beschrijft in aparte claims een aantal specifieke toepassingen van deze methodologie, waaronder de EET resultaten voor roos en tomaat.

4.2 Markt en vervolgplannen

Uit het marktonderzoek blijkt een duidelijke interesse van de praktijk voor kwaliteitsvoorspellende testen. De hele keten kan hiervan profiteren toch wijst men vaak naar elkaar om de eerste stap te nemen en een groot gedeelte van het onderzoek te betalen. De weg die nu bewandeld wordt maar wel veel tijd kost is om alle markt partijen te betrekken om als doel een gezamenlijke inspanning te leveren om huidige resultaten uit te werken tot geïmplementeerde kwaliteitstoetsen. Op het moment lopen diverse acquisitie trajecten op het verder ontwikkelen van het onderzoek bij roos en tomaat en wordt gezocht naar mogelijkheden om ook bij andere gewassen of kwaliteitseigenschappen onderzoek op te starten.

Daar de markt potentie groot is en er een duidelijk braakliggend terrein is tussen het identificeren van de kandidaat genen en een volledige implementatie in de praktijk heeft Monique van Wordragen een spin-off bedrijf opgericht dat zich volledig in deze niche gaat begeven. Het bedrijf zal op 1 september van start gaan, op dit moment is de formele afhandeling van financiering en aandeelhoudersovereenkomsten in een afrondende fase. Keygene heeft toegezegd de door haar ontwikkelde diagnostiek in de vorm van een exclusieve licentie ter beschikking te stellen aan het nieuwe bedrijf. Hierdoor zal ook gekeken worden of de nu ontwikkelde multiplex assay verder ontwikkeld kan worden en ingezet daar waar het nodig is om een grotere set aan genen te gebruiken voor diagnostische voorspellingen

4.3 Kennis overdracht

Publicaties

- Jurriaan J. Mes Genomics technieken helpen bij ketenoptimalisatie. Nieuwsbrief DLO 391, oktober 2003, jaargang 2, nummer 4.
- Jurriaan J. Mes, Renata M. Ariens, H. Martijntje Vollebregt, Eric P. Boer, Monique F. van Wordragen. 2004. Op weg naar een toets voor Botrytis aantasting in roos. KNPV werkgroep Botrytis gehouden op 18 mei, te Lisse. Abstract in Gewasbescherming jaargang 35(6): 16-17.
- Jurriaan J. Mes, Renata M. Ariens, H. Elodie Brans, Eric P. Boer, Monique F. van Wordragen. 2004. Microarray analysis related to Botrytis infection in rose. Abstract in Second EPSO conference, 10-14 October 2004.

- Jurriaan J. Mes, Renata M. Ariens, Brigitte Verkerk-Bakker, Monique F. Wordragen 2005. Predicted analysis of Botrytis infection in rose cut flowers. Abstract in Plant Genomics European Meetings Amsterdam, 20-23 september 2005.
- Jurriaan J. Mes, Renata M. Ariens, H. Martijntje Vollebregt, Eric P. Boer, Monique F. van Wordragen. 2005. Op weg naar een toets voor Botrytis aantasting in roos. KNPV werkgroep Botrytis gehouden op 12 april, te Wageningen. Abstract in Gewasbescherming in press

Presentaties

- Jurriaan J. Mes. Op weg naar een toets voor Botrytis aantasting in roos. KNPV werkgroep Botrytis, gehouden op 18 mei 2004, te Lisse.
- Jurriaan J. Mes. Voorspellen van Botrytis aantasting in snijrozen. Nederlandse Vereniging van Planten Weefselweek gehouden op 21 oktober 2005 te Leiden.
- Jurriaan J. Mes. Op weg naar een toets voor Botrytis aantasting in roos. KNPV werkgroep Botrytis gehouden op 12 april, te Wageningen.

Tussentijdse rapportages

- OKEE, Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering. Voortgangsrapportage januari 2003- juli 2003, publicatie date 23 september 2003
- OKEE, Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering. Voortgangsrapportage juli 2003- januari 2004, publicatie date 30 juni 2004
- OKEE, Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering. Voortgangsrapportage januari 2004 - juni 2004, publicatie date augustus 2004
- OKEE, Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering. Voortgangsrapportage juni 2004 – januari 2005, publicatie date april 2005
- OKEE, Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering. Voortgangsrapportage januari 2005 - juni 2005, publicatie date augustus 2005
- Marktverkenning kwaliteitsdiagnostiek in de verse groente, fruit en bloemen sector. Afstudeeropdracht Agrarische Hogeschool Larenstein, uitgevoerd door Erwin Weites, publicatie date augustus 2005

5 Eindconclusies

Het totale project heeft volledig naar tevredenheid van alle partners, investeerders en begeleidingscommissie gedraaid. Het uitgangsprincipe dat agroproducten een zeer variabele kwaliteit kunnen hebben werd in de proeven en diverse discussies bevestigd. Het ontwikkelen van een kwaliteitstoets, inzetbaar op een vroeg moment in de productie- of distributieketen, het doel van dit project, wordt dus door alle partijen omarmd. Bij het begin van het project was er nog slechts een aanname dat deze voorspelling mogelijk zou zijn op basis van gen expressie, waar alle tot dan toe onderzochte technieken eigenlijk nog faalden. Tijdens het onderzoek is veel ervaring opgedaan en zijn veel (software) applicaties ontwikkeld die dit type onderzoek in de toekomst zullen versnellen. Met de ontwikkelde multiplex methode is het gat tussen duren microarray analysis en enkele genen detectie met Real Time PCR aangevuld met een relatief goedkope methode die een middelgrote set aan indicator genen kan kwantificeren.

De huidige resultaten lijken de gehypotheticeerde correlatie tussen gen expressie en onderzochte kwaliteitkenmerken te bevestigen. Bij roos zijn 2 genen als zeer belangrijke indicatoren geïdentificeerd en bij tomaat is op basis van microarray analysis een correlatie aangetoond tussen genexpressie en stevigheid. Nu volgt echter een meer industriële fase die moet onderzoeken of deze indicatoren standhouden in de praktijk. Een spannende fase waarin veel validatie proeven gedaan moeten worden en waarin de wensen van de praktijk gesynchroniseerd moeten worden met de genexpressie data breekt aan.