



Waar zitten de hoofdschakelaars voor de knopvorming in champignons?

Rapportage van PRI voor ondersteuning STW project aan afdeling Microbiologie, Universiteit Utrecht

Anton Sonnenberg & Johan Baars

© 2011 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

Dit rapport bevat een gezamenlijke rapportage over de volgende projecten.

Gefinancierd door Productschap voor de Tuinbouw



Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 – 48 60 01
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1. Introductie	3
2. Isolatie genproducten in de dekaarde na aanzet tot knopvorming (afventileren)	5
3. Genoomsequencing van de champignon	7
3.1. Genoomsequentie van H39 (ouder Horst U1)	8
4. Knopvorming bij <i>Schizophyllum commune</i>	9

1. Introductie

Welke teler zou dat niet willen weten waar de hoofdschakelaars voor de knopvorming zitten. Welke teler zou dan niet graag aan de knoppen draaien om zijn teelt dat te laten doen wat hij wil. Zijn grootste wens is een voorspelbare teelt. Weten wanneer er precies geoogst moet worden, hoe groot de productie zal zijn en wat de kwaliteit gaat worden. Daar missen we echter de fundamentele kennis voor.

De knopvorming van de champignons is het meest cruciale punt in de teelt. Het bepalen van het tijdstip van de knopvorming, de hoeveelheid knoppen en de uitgroei hiervan bepalen voor een groot gedeelte of zijn teelt succesvol zal zijn of niet. Een ervaren teler weet wat hij moet doen om het proces zo optimaal mogelijk te laten verlopen, maar helemaal in de hand heeft hij het nooit. Wisselingen in de kwaliteit van de grondstoffen, ziekten en plagen, ja zelfs het buiten klimaat heeft op deze indoorteelt een invloed die het verschil tussen een goede en slechte teelt kan bepalen. Weten we eigenlijk wat het mycelium aanzet tot het samentrekken en wat vervolgens bepaald of knoppen gevormd worden of uitgroeien? We kennen inderdaad een aantal belangrijke klimaatfactoren die hierop een invloed hebben. Maar wat er in dat mycelium of in de knoppen gebeurt, is nog steeds een raadsel. Het erfelijk materiaal in het mycelium, de knoppen en de paddenstoelen is identiek. Het bevat de blauwdruk of handleiding die in elke cel aanwezig is en waarin staat wat een champignon tot een champignon maakt en geen konijn om maar eens wat te noemen. Maar welk gedeelte van de handleiding wordt nu gevolgd in de verschillende stadia in de teelt? En nog belangrijker: wat bepaalt wanneer van het ene naar het andere hoofdstuk wordt overgeschakeld? Daar weten we helaas nog weinig van. Toch zijn er technieken voorhanden om te bepalen hoe deze handleiding, het erfelijk materiaal, in de champignon werkt. De afdeling Microbiologie van de Universiteit Utrecht heeft ruime ervaring met deze technieken. De groep staat onder leiding van Professor Han Wösten die al jaren aan een schimmel werkt die in de natuur op dood hout voorkomt en paddenstoeltjes maakt. In Nederland noemen we dit paddenstoeltje “het waaiertje” met de fraaie Latijnse naam *Schizophyllum commune*. Dit paddenstoeltje kan ook onder laboratoriumomstandigheden paddenstoelen maken. Een mooi studieobject dus om te bestuderen hoe de vorming van paddenstoelen wordt aangestuurd door het erfelijk materiaal. PRI heeft goede contacten met deze groep en onlangs hebben we samen besloten dat het echt tijd wordt om uit te zoeken wat er zich afspeelt in het mycelium wanneer het besluit om knoppen te gaan vormen. Er is een subsidie aangevraagd bij de Stichting Technische Wetenschappen (STW), een onderdeel van het Ministerie van Economische Zaken. STW financiert onderzoek dat aan Universiteiten wordt uitgevoerd. Eind vorig jaar is deze subsidie toegekend. Dit jaar zal er een 4-jarig onderzoeksproject starten in deze groep waarbij Dr. Luis Lugones de leiding zal hebben in het onderzoek. De titel geeft duidelijk aan wat er in dit project wordt uitgevoerd: “Hoofdschakelaars in de knopvorming van paddenstoelen” (Masterswitches of initiation of mushroom formation). Belangrijk in dit project is dat, naast het waaiertje, ook de champignon wordt onderzocht. STW vindt het belangrijk dat uitkomsten van dit soort projecten ook uiteindelijk in de praktijk gebruikt gaan worden. Het feit dat Nederland een belangrijke producent is van paddenstoelen en dat PRI een schakel vormt tussen het fundamentele onderzoek en de toepassing heeft een belangrijke rol gespeeld bij de



De twee soorten paddenstoelen die in het STW project gebruikt zullen worden om te zoeken naar de “Hoofdschakelaars in de knopvorming”. Links het waaiertje (*Schizophyllum commune*) en rechts de champignon (*Agaricus bisporus*).

toekenning. Ook een ondersteuning vanuit het bedrijfsleven in de vorm van adhesiebetuigingen (VPN en CNC) hebben de subsidiegever weten te overtuigen.

Door te onderzoeken hoe het erfelijk materiaal wordt omgezet van de vegetatieve groei naar de paddenstoelvormig wordt duidelijk welke omgevingsfactoren daarop een invloed hebben. Dat geeft dan de mogelijkheid om dit proces te beïnvloeden en dus te sturen. Dat is precies wat een teler wil. Door twee erg verschillende type paddenstoelen te nemen in dit onderzoek zal ook duidelijk worden of de hoofdschakelaars voor knopvorming een algemeen mechanisme is voor paddenstoelvormende schimmels. Dat kan perspectief bieden voor soorten die we nu niet, of met veel moeite, kunnen telen. Het productschap voor tuinbouw heeft de ondersteuning van dit project door PRI mogelijk gemaakt door een financiële ondersteuning gedurende de looptijd van het STW project.

2 Isolatie genproducten in de dekaarde na aanzet tot knopvorming (afventileren)

Om te onderzoeken welke genen worden aangeschakeld vanaf het moment dat deze wordt geïnduceerd door het afventileren moeten myceliummonsters genomen worden uit de dekaarde vlak vóór het afventileren en op verschillende tijdstippen na het afventileren. Uit dit mycelium moet vervolgens RNA worden geïsoleerd. Dit RNA is een product van actieve genen en op deze manier kun je achterhalen welke genen actief zijn.

Voorproefje

Traditioneel wordt standaard dekaarde gebruikt in de champignonteelt. We voorzagen problemen met het gebruik van dekaarde omdat er grote hoeveelheden veen in verwerkt zit. In veen zitten vele humuszuren en deze kunnen storend werken op de kwaliteit van de RNA-isolatie en alle downstream processen. Een tweede nadeel van dekaarde is zijn “plakkerige” karakter. Dit maakt het lastig om mycelium los van de dekaarde te isoleren.

Er zijn diverse alternatieven mogelijk om de hoeveelheid humuszuren te verminderen in de deklaag.

1. Mergel
2. Mergel met dekaarde-extract
3. Steenwol met dekaarde-extract
4. Vermiculiet met dekaarde-extract

Deze alternatieven zijn in een voorproefje in kisten geteeld gezamenlijk met de traditionele dekaarde. Gelet werd op de mogelijkheid om het mycelium te scheiden van de deklaag en of uit het mycelium RNA geïsoleerd kan worden van een goede kwaliteit. Het scheiden van mycelium van de deklaag mag niet teveel tijd in beslag nemen omdat dit leidt tot “stress” voor het mycelium met als gevolg dat er genen tot expressie komen die met stress te maken hebben en niet met de knopvorming. Na isolatie is het mycelium ingevroren met behulp van vloeibare stikstof. Er is in dit voorproefje ook gekeken of deze typen dekaarde wel paddenstoelen kan produceren.

Uit mycelium van eerder genoemde deklaagen is RNA geïsoleerd volgens een standaard procedure. Het malen ging het eenvoudigste bij mycelium wat afgescheept wordt van mergel en dekaarde. De monsters van de gewassen mergel en dekaarde en de steenwol waren slecht te malen. Bij gewassen mergel en dekaarde zitten vele bevroren waterdruppels die moeilijk stuk te krijgen zijn. De bevroren steenwol is ook zeer moeizaam te malen. De hoeveelheid RNA die van de steenwol kon worden geïsoleerd was te weinig om zichtbaar te maken op een gel. De resterende monsters zagen er allemaal goed uit.

De conclusie was dat het is mogelijk is om een goede kwaliteit RNA uit dekaarde te isoleren. Hierdoor vervalt de noodzaak voor een alternatief. Mergel met dekaarde-extract is wel een alternatief waarbij het oogsten eenvoudiger is dan bij dekaarde. Steenwol valt af als alternatieve deklaag met als doel om RNA te isoleren. Waarschijnlijk is de ratio mycelium/deklaag materiaal te laag waardoor er te weinig RNA kon worden geïsoleerd.

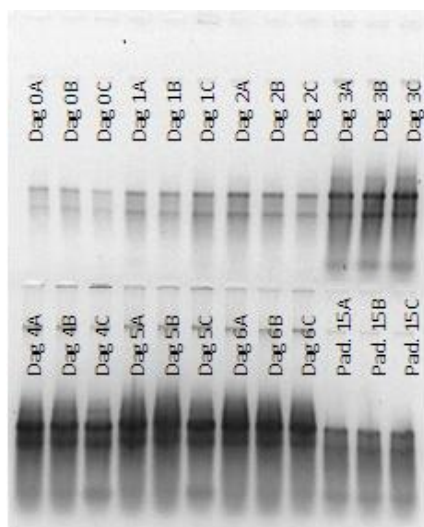
Oogsten van mycelium op verschillende tijdstippen

In proef 26250 zijn 5 kisten afgedekt met dekaarde en 5 kisten afgedekt met mergel met dekaarde extract. De bemonstering is gedaan op tijdstippen 0 (dag vóór afventileren) t/m dag 15 (paddenstoelen) bij de standaard dekaarde (zie tabel hieronder). Bij gebruik van mergel is bemonsterd vanaf dag 0 t/m dag 10 (knoppen). Voor monsternamen is 2/3 van het oppervlakte van de deklaag geoogst en daarna weer teruggelegd. Het andere deel dient ter controle om het tijdstip tot knopvorming te bepalen.

Van dag 0 tot dag 6 is ook compost ingevroren bij de teelt met standaard dekaarde. Met de compostmonsters zou eventueel nog gekeken kunnen worden of de genen die leiden tot knopvorming ook tot expressie komen in compost.

Standaard dekaarde				
Day	datum	Stadium	Monster	Monster
0	1-12-2005	Voor afventileren	Dekaarde	Compost
1	2-12-2005	Dag na afventileren	Dekaarde	Compost
2	3-12-2005		Dekaarde	Compost
3	4-12-2005		Dekaarde	Compost

4	5-12-2005	Forse samentrekking mycelium	Dekaarde	Compost
5	6-12-2005	Geogst van day2	Dekaarde	Compost
6	7-12-2005	Knoppen geogst van kist day1	Dekaarde	
15	16-12-2005		Paddenstoelen	
Mergel dekaarde				
Day	datum	Stadium	Monster	
0	7-12-2005	Voor afventileren	Dekaarde	
1	8-12-2005	Dag na afventileren	Dekaarde	
6	12-12-2005	Start samentrekking mycelium	Dekaarde	
9	15-12-2005	Forse samentrekking mycelium	Dekaarde	
10	16-12-2005	Knoppen	Dekaarde	
Tabel 1. Bemonsteren van dekaarde om uit het mycelium RNA te isoleren. Dit RNA wordt gebruikt om te achterhalen hoe genen tot expressie komen tijdens de knopvorming.				



Figuur 2. Analyse van RNA uit mycelium uit de verschillende typen dekaarde. De monsters die op de gel te zien zijn, zijn genomen op 1 dag vóór het afventileren (dag 0) tot 6 dagen na afventileren. Ook zijn RNA monsters te zien geïsoleerd uit paddenstoelen.

Het mycelium van day0 is geogst m.b.v. spoelen. Echter was het mycelium vele malen ieler dan bij het uittesten. Verwacht wordt dat een deel van het mycelium is weggespoeld en er niet meer voldoende is overgebleven. Om geen risico te lopen zijn op de overige dagen is het mycelium van de mergel geschraapt.

De genen bestaan uit DNA. Bij het actief worden van genen worden deze "afgeschreven" in RNA moleculen die dezelfde informatie bevatten als het gen maar uit iets andere bouwstenen zijn opgebouwd. Dit RNA wordt vervolgens vertaald naar een eiwit dat de functie uitvoert waarvoor het gen staat. RNA is maar een kort leven beschouwd omdat genen ook snel weer uitgezet moeten kunnen worden. Het is daarom lastig om intact RNA te isoleren. De RNA extractie uit de compost zijn daarom op gel geanalyseerd op afbraak. Vrijwel alle monsters zagen er goed uit zodat deze monsters voor analyse gebruikt kunnen worden (figuur 2).

3 Genoomsequencing van de champignon

In het STW project is voornamelijk aan de schimmel *Schizophyllum commune* gewerkt. Dit is een modelschimmel waaraan al veel werk is gedaan en dat op labschaal ook erg makkelijk tot knopvorming is aan te zetten. Om de expressie (activiteit) van alle genen in verschillende stadia van ontwikkeling efficiënt te kunnen bepalen is de gehele sequentie van het erfelijk materiaal nodig. De sequentie van *S. commune* is bekend en daarom kon deze methode ook worden toegepast. De bedoeling van het STW project was om in het onderzoek later over te schakelen naar de champignon. Omdat hiervoor nog geen sequentie bekend is heeft PRI meegedaan om een consortium te vormen met andere onderzoekers en een aanbiedingsbrief te maken aan een genoomanalyse instituut in California (USA). Dit instituut (JGI; <http://www.jgi.doe.gov/>) is onderdeel van het Ministerie van Energie (Departement of Energy; DOE) en ondersteunt sequencing werk als dit past binnen hun duurzaamheidsstrategieën. In de aanbiedingsbrief hebben we benadrukt dat de champignon een belangrijke schakel is in de koolstofkringloop dat daarom deze sequentie van belang is. Na twee pogingen is het voorstel gehonoreerd. Voor dit project moest gekozen worden welke stam gesequencet zou worden. We hebben voorgesteld om één van de ouders van Horst U1 te sequencen (H97) omdat dit ras de moeder van alle huidige rassen is en aan dit ras het meeste onderzoek is gedaan. PRI heeft daarna een grote hoeveelheid DNA geïsoleerd van de betreffende ouder van U1 en dit opgestuurd naar JGI. Na de bepaling van de sequentie moeten de plaatsten van de genen worden aangegeven. Dit heet "annotatie". Om deze annotatie te vergemakkelijken is door JGI gevraagd om RNA te isoleren van verschillende stadia in de ontwikkeling. We hebben daarom van mycelium gegroeid op compostagar, mycelium uit de dekaarde en uit de paddenstoelen genomen en daaruit RNA geïsoleerd. Door uit deze uiteenlopende stadia RNA te isoleren bestaat de kans dat het product van de meeste genen in de RNA monsters zitten. Het sequencen van deze RNA's levert dan de informatie op waar de genen op het DNA gelokaliseerd zijn.

Chromosoom #	Geschatte lengte (Mb)	Toegewezen		Geschatte missende	Nog niet toegewezen	
	Gel-analyses	scaffolds	Sequence length	sequentie	scaffolds	Lengte
I	3.60	1	3343696	256304	Scaffold 18	249292
II	3.44	5, 16	2981859	458141	Scaffold 19	197385
III	3.06	2	3111184	-51184	Scaffold 22	24809
IV	3.06	4, 14	3264186	-204186	Scaffold 23	14553
V	2.57	3	2553239	16761	Scaffold 24	7624
VI	2.32	6	2334609	-14609	Scaffold 26	5831
VII	2.32	7	2081940	238060	Scaffold 27	5606
VIII	1.90	8	1953713	-53713	Scaffold 28	4528
IX	2.13	10, 29	1639527	490473	Scaffold 30	4107
X	1.81	9	1748887	61113	Scaffold 31	3428
XI	1.66	13, 15	1688515	-28515	Scaffold 33	2580
XII	1.51	12, 17	1676604	-166604		
XIII	1.40	11	1336043	63957		
	30.78	Totalen	29714002	1065998		519743
		Gesequencet	30233745			

Tabel 2. Genoom-analyse van één van de ouders van Horst U1, i.e. H97. het DNA van deze stam is in stukjes gesequencet en softwarematig aan elkaar geschakeld tot grotere sequenties (scaffolds). Deze scaffolds zijn vervolgens aan chromosomen toegewezen gebruik makend van bestaande genetische kaarten. Aan de hand van eerdere schattingen van chromosoomlengten m.b.v gelen kan geschat worden hoeveel van het genoom nog niet is gesequencet.

Het bepalen van de sequentie gebeurt in stukken en is een *random* proces. Het resultaat is miljoenen stukjes DNA die elkaar overlappen in sequentie. Alle stukken worden met software aan elkaar gezet tot zo groot mogelijke stukken. Deze worden ook wel *scaffolds* genoemd. Het totale genoom van de champignon is verdeeld over 13 chromosomen. Bij een volledig gelukte sequencing zouden elke *scaffold* een chromosoom moeten voorstellen. In de praktijk is dat helaas niet altijd het geval. In samenwerking met INRA Bordeaux hebben we de eerder geproduceerde genetische kaarten van champignonrassen gebruikt om alle scaffolds aan chromosomen toe te wijzen. Tevens hebben we een paar jaar geleden de lengte van elk chromosoom geschat met behulp van *pulsed-field electrophoresis*. Door al deze data aan elkaar te koppelen weten we hoe het genoom van één van de ouders, i.e. H97, er uit ziet (tabel 2). Uit de analyse blijkt dat vrijwel het hele genoom is gesequencet. Wat vooral ontbreekt, zijn de uiteinden van de chromosomen, de zogenaamde telomeren.

3.1 Genoomsequentie van H39 (ouder Horst U1)

Het bepalen van de totale genoomsequentie van H97 heeft nogal wat tijd gekost en zou normaalgesproken een behoorlijk bedrag kosten. Door de projectmatige aanbidding bij JGI en de samenwerking tussen een aantal onderzoekers (PRI, HRI, INRA en Sylvan) het dit weinig gekost. Als een keer een goede en betrouwbare sequentie van een soort bekend is, kunnen andere stammen van dezelfde soort op een veel snellere en goedkopere manier gesequencet worden. Aangezien veel onderzoek gedaan is en gedaan worden aan Horst U1 was het wenselijk om ook de andere ouder van Horst H1, i.e. H39 te sequencen. Het STW knopvormingsproject heeft de kosten hiervan gedragen. Sindsdien is het sequencen van stammen weer goedkoper geworden.

Voor het bepalen van de H39 sequentie is een *next generation* sequencing methode gebruikt van Illumina (http://www.illumina.com/technology/sequencing_technology.ilmn). Deze is uitgevoerd door ServiceXs (Leiden). Met deze methode worden veel kleinere stukjes DNA gesequencet. Dat gaat sneller en goedkoper. Deze stukjes zijn zo klein en hebben vaak zo weinig overlap dat het aan elkaar breien van deze stukjes niet kan. Omdat de sequentie van H97 helemaal bekend is en de genomen van verschillende stammen binnen één soort niet veel verschillen kan de sequentie van H97 gebruik worden als "kapstok" om de kleine stukjes sequentie van H39 op volgorde te zetten. Op deze manier zijn ook 33 scaffolds van H39 bepaald en daarmee ook vrijwel het hele genoom van H39 bekend. De sequentie van beide stammen is gebruikt bij 2 TT-Groene Genetica projecten die momenteel lopen.

4 Knopvorming bij *Schizophyllum commune*

In het STW project is voornamelijk gewerkt aan de modelschimmel *Schizophyllum commune* en uitgevoerd door de AIO Robin Ohm. Aan *S. commune* is wereldwijd veel onderzoek gedaan en het is vrij makkelijk om de hele knopvorming op labschaal te volgen (op agarculturen). Dat lukt helaas nog niet met de champignon.

De beste manier om de functie van een gen te achterhalen is het uitschakelen van een gen en kijken welk fenotype daarbij hoort. Het uitschakelen van genen via genetische modificatie is niet eenvoudig. Robin heeft daarom in zijn promotietijd eerst aandacht besteed aan een techniek om specifiek genen uit te zetten. Dat is uiteindelijk gelukt. Dit is van belang voor dit project maar ook voor alle andere genetisch project met schimmels.

Robin is vervolgens op zoek gegaan naar induceerbare promotoren. Dat zijn stukjes DNA die vóór een gen zitten en als een soort aan/uit knop functioneren. Robin heeft 7 genen gevonden die coderen voor zogenaamde *heat shock* eiwitten. Drie van deze genen hebben geen activiteit bij 25 °C maar vertonen een sterke activiteit bij 37 en 42 °C. De promotoren van deze genen reageren dus op een verhoogde temperatuur. Robin heeft aangetoond dat één van deze genen zelf lokaal in een weefsel tot expressie kan worden gebracht door een hete naald in het weefsel te steken. Door een dergelijke promotor voor een bepaald gen te zetten kan dit gen door warmte worden aangeschakeld. Dit kan als model functioneren om b.v. knopvorming aan te zetten met een externe prikkel.

Met de volledig bekende sequentie van *S. commune* heeft Robin het genoom geanalyseerd. *S. commune* heeft 38.5 miljoen baseparen die samen coderen voor 13.210 eiwitten. Ter vergelijking, de champignon heeft ca. 30.5 miljoen baseparen en die coderen voor ca. 10.500 eiwitten. Door deze analyse te vergelijken met andere organismen heeft hij eiwitfamilies geïdentificeerd die oververtegenwoordigd zijn in paddenstoelvormende schimmels. Voorbeelden zijn hydrofobinen en verschillende transcriptiefactoren (genproducten die de activiteit van andere genen controleren). Het genoom van *S. commune* bevat 471 van dit soort transcriptiefactoren en acht hiervan bevinden zich op het mating type locus. Er zijn twee mating type loci die betrokken zijn bij de vorming van paddenstoelen. Stammen (monokaryons) zijn kruisbaar als ze verschillende mating type factoren hebben. De genexpressie is bekeken in 4 ontwikkelingsstadia: monokaryons, aggregaten, primordia en volwassen paddenstoelen. Ca 60% van de genen komt tot expressie in minimaal 1 ontwikkelingsstadium. Een flink aantal genen vertoont een verschillende activiteit in verschillende stadia (differentiële expressie). De voornaamste zijn de hydrofobinen, signaaltransductie eiwitten (die een externe prikkel opvangen en aan het inwendige van de cel doorgeven) en transcriptiefactoren. Voor het eerst werd aangetoond dat anti-sense genexpressie voorkomt bij *S. commune* en wel voornamelijk in het ontwikkelingsstadium met primordia. Dit mechanisme heeft waarschijnlijk ook te maken met genregulatie.

Van de 471 voorspelde transcriptiefactoren kwamen er 311 tot expressie tijdens de paddenstoelvorming. Tien van deze genen werden uitgeschakeld en bij 8 ervan bleek dit effect te hebben op de paddenstoelvorming. Met de bestudering van deze fenotypen is een moel gemaakt waarbij inzicht werd verkregen van processen die een rol spelen bij de paddenstoelvorming. Bij een van de mutanten is het gen dat betrokken is bij de paddenstoelvorming onder controle gebracht van het al eerder genoemde *heat shock* eiwit. Door elke dag een warmte behandeling te geven bleek deze mutant inderdaad weer paddenstoelen te vormen. Op deze manier heeft Robin de functie van alle mutanten beschreven en hun mogelijk rol bij de vorming van paddenstoelen aangegeven. Een slotconclusie luidde dat genen die coderen voor structurele paddenstoel-eiwitten over de algemeen laag tot expressie komen in de mutanten. De transcriptiefactoren die bij de paddenstoelvorming betrokken zijn komen juist wel veel tot expressie. De hypothese luidt: Het regulatiemechanisme van paddenstoelvorming staat in een stand-by modus zolang er geen hyfen de lucht ingroeien.

Nu er een flink aantal genomen van andere paddenstoelvormende schimmels gesequent zijn kon Robin een vergelijk maken. Hij vond dat de transcriptiefactoren voor paddenstoelvorming die bij *S. commune* zijn gevonden ook aanwezig zijn in andere paddenstoelvormende schimmels, inclusief de champignon.

Op basis hiervan is een vervolg STW project aangevraagd waarbij de nadruk zal liggen op de champignon. Hierin zal ook een post-doc werken die de laatste 2 jaar van het onderzoek zal doen bij PRI in Wageningen.