



Evaluatie van Piopino rassen (*Agrocybe aegerita*) uit de collectie van Plant Breeding Wageningen UR.

Anton S.M. Sonnenberg

© 2008 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.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Inleiding	2
3 Genotypering Pipoppino Rassen	3
3.1 De soortanalyse	3
3.2 Genetische variatie tussen de stammen	3
4 Substraatonderzoek	6

1. Samenvatting

In de biologische teelt van paddenstoelen is bij de teelt van een aantal soorten behoefte aan een verbetering in de teelt. Deze kan behaald worden door beter producerende rassen of een verbeterd substraat. Dit project heeft zich gericht op één van de soorten die nu een kleine markt heeft maar wel de potentie heeft om een groter deel van de markt te veroveren: de Pioppino (*Agrocybe aegerita*). PRI heeft 28 stammen van deze soort in de collectie. Aangezien er maar een beperkt aantal in teeltproeven getest kunnen worden is eerst een genotypering op de collectie gedaan om de verwantschappen tussen de stammen te bepalen en daarmee zichtbaar te maken of er veel identieke stammen in zitten. Hierna kunnen representanten van elk genotype geselecteerd worden voor substraat/teelt onderzoek.

Uit de genetische analyse is gebleken dat de collectie van 28 stammen uit 10 verschillende genotypen bestaat binnen de soort *A. aegerita* en dat één stam tot de soort *A. chaxinga* behoort.

Uit de collectie is een selectie gemaakt van 9 stammen, verdeeld over de verschillende genotypen. Van deze stammen is door PRI experimenteel broed gemaakt en dit is ter beschikking gesteld aan een groep telers voor substraat/teelt-onderzoek.

2. Inleiding

Pioppino (*Agrocybe aegerita*) is een mooie paddenstoel die potentie heeft in de markt. In Nederland is het een klein product maar in b.v. Italië is er een jaarlijkse productie van ca 500 ton. Om voor dit product een biologische markt te creëren zal de productie meer rendabel gemaakt moeten worden. Dat betekent dat de biologische efficiëntie in productie minimaal 10% of hoger moet zijn (100 gram verse paddenstoelen op 1 kg vers substraat). Nu is de productie daarvoor te laag. In overleg met een groep telers en een substraatbereider is een plan opgezet om tot een verbetering van de productie te komen. De aanpak zal tweeledig zijn: Stammen en substraat.



Figuur 1. Pioppino paddenstoelen (*Agrocybe aegerita*)

PRI heeft 28 *Agrocybe* stammen in haar collectie. Daar zitten ook een aantal bekende commerciële rassen bij die nu gebruikt worden. De genetische relatie tussen de rassen is onbekend. Van sommige stammen is de herkomst bekend, vaak echter niet. De hoeveelheid rassen die getest kunnen worden door de telers is beperkt. Om een goede keuze te kunnen maken uit de beschikbare stammen is besloten om eerst een genotypering te doen waarbij zowel op soort als op variatie binnen de soort zal worden gekeken. De telers en de substraatproducent zullen zelf een aantal substraatproeven opzetten en uitvoeren. PRI zal de resultaten hiervan registreren en vastleggen in een verslag. Dit zal pas in begin 2009 gebeuren.

3 Genotypering Pipoppino Rassen

De jaren waarin de Pioppino-stammen gedeponeerd zijn in de collectie van PRI variëren van 1968 tot 2003 en zijn slechts zéér beperkt genetisch geanalyseerd. Twee stammen zijn onder een andere naam dan de soort *aegerita* gedeponeerd: *cylindrica* en *chaxinga*. *Cylindrica* is waarschijnlijk ook een *aegerita*. Voor *chaxinga* is dit onbekend. Omdat op dit moment de teelt van Pioppino in Italië relatief groot is, is aan de Italiaanse broedproducent Italspaw gevraagd of zij hun gangbare en eventueel andere rassen ter beschikking willen stellen voor dit project. Italspaw heeft daarop 6 rassen toegestuurd waaronder het nu gebruikte commerciële ras. In tabel 1 staat de lijst rassen vermeld die in dit project zijn meegenomen.

Omdat van een aantal rassen uit de collectie niet helemaal zeker was of dezen tot de soort *Agrocybe aegerita* behoren is besloten om eerst de sequentie te bepalen van de Internal Transcribed Spacer (ITS). Dit is een gedeelte van het erfelijk materiaal dat erg geconserveerd is binnen de soort en een grotere variatie vertoont tussen soorten. Daarna is naar de genetische variatie van de stammen gekeken met Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) en Universal Rice Primers (URP), twee methoden die verder niet zullen worden uitgelegd maar eerder hebben aangetoond dat ze erg bruikbaar zijn om genetische verwantschappen te bepalen bij schimmels.

```
161                                     240
MES 13061 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00445 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00447 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00448 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00450 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 02020 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 02074 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 02097 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 02098 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 12794 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 12795 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 12796 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 12798 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 13055 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 13058 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 13059 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 13060 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00444 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00443 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00451 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00446 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00449 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00442 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00441 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
MES 00440 CTGACCGGCTGCTTCTACCGTTGAGTCTATGCTTT--TACACTATACACCATTGTTAAACCTTAGAATGTTAAAGGCT
```

Figuur 2. Het gedeelte van de ITS sequentie waarin kleine verschillen zijn te zien tussen de *Agrocybe aegerita* stammen. De grijs gearceerde stammen vormen een aparte groep.

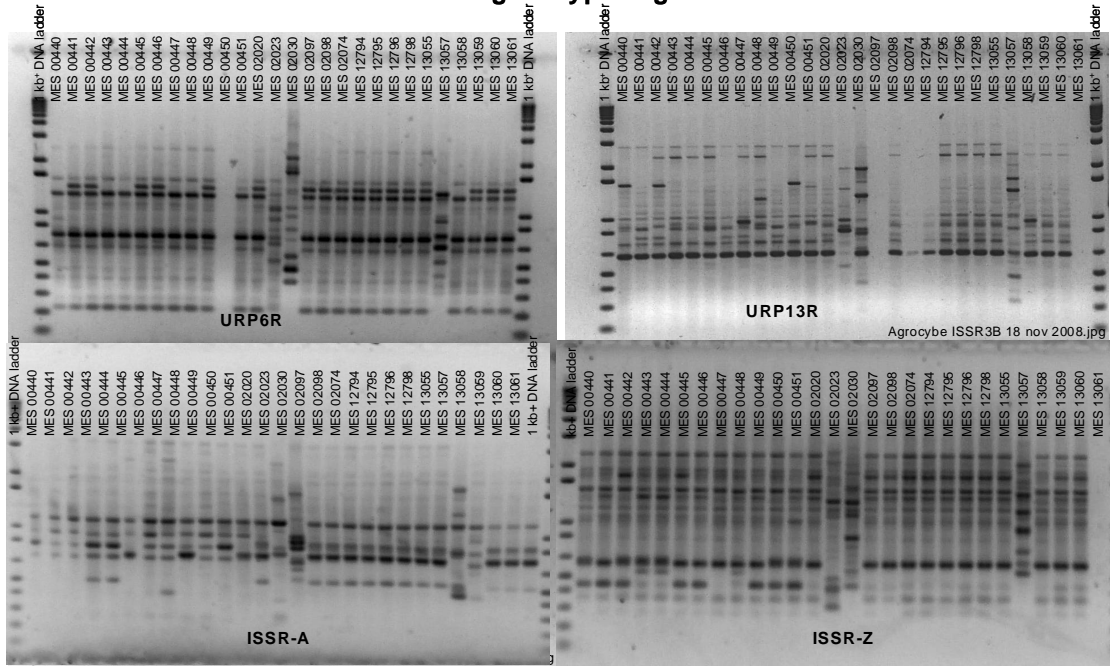
3.1 De soortanalyse

De analyse van de ITS sequentie (802 baseparen lang) liet zien dat 25 van de 28 stammen tot de soort *Agrocybe aegerita* behoren. Binnen deze 25 zijn 2 groepen te onderscheiden die slechts weinig in sequentie verschillen. De kleinste groep van 6 stammen verschilt slechts 4 van de 801 baseparen van de andere stammen (figuur 2). De stam die als *Agrocybe chaxinga* in de collectie is gedeponeerd verschilt in sequentie meer van de *A. aegerita* stammen en vergelijk met de gepubliceerde sequenties bevestigt dat dit de soort *chaxinga* is. Één van de stammen die door Italspaw is gedoneerd lijkt niet tot de soort *Aegerita* te behoren. De sequentie lijkt het meest op een Hebeloma soort maar zeker is dat niet. Bij één stam is de sequentie analyse niet gelukt.

3.2 Genetische variatie tussen de stammen

De genetische verwantschappen tussen de stammen is onderzocht met behulp van twee ISSR primers en twee URP primers. Deze vier set primers genereren elk stukjes DNA uit het erfelijk materiaal dat in meerdere kopieën voorkomt. Als de stammen genetisch niet identiek zijn zal het aantal en de lengte van deze stukjes verschillen. Voor elke primer set en voor elke stam zijn de stukjes DNA op grootte gescheiden op een gel (een soort moleculaire zeef) waarna de bandjes via een kleuring zichtbaar zijn gemaakt (figuur 3).

ISSR en URP genotypering



Figuur 3. Genotypering van de *Agroclybe* stamens met behulp van ISSR en URP primers. De 4 set primers die gebruikt zijn genereren elk stukjes DNA uit het erfelijk materiaal dat in meerdere kopieën voorkomt. Als de stammen genetisch niet identiek zijn zal het aantal en de lengte van deze stukjes verschillen. Voor elke primer set en voor elke stam zijn de stukjes DNA op grootte gescheiden op een gel (een soort moleculaire zeef) waarna de bandjes via een kleuring zichtbaar zijn gemaakt.

MES nr.	Ras/Labnaam	Genus	Soort	Soort				Genetische verwantschap				Definitief		Herkomst
				ITS-seq.	ISSR-A	ISSR-Z	AS	URP6R	URP13R	Genotype	Type			
1	MES 00440	23.0-1	<i>Agroclybe aegerita</i>	1_2	1	1	1	1	A	wildisolaat	onbekend			
2	MES 00441	23.0-2	<i>Agroclybe aegerita</i>	2	1	2	2	2	B	wildisolaat	CBS 204.46			
3	MES 00449	23.0-10	<i>Agroclybe aegerita</i>	2	1	2	2	2	B	onbekend	CBS 358.51			
4	MES 00446	23.0-7	<i>Agroclybe aegerita</i>	2	1	2	2	3	Ba	onbekend	CBS 358.51			
5	MES 00442	23.0-3	<i>Agroclybe aegerita</i>	2	1	3	2	2	Bb	onbekend	onbekend			
6	MES 00451	23.0-12	<i>Agroclybe aegerita</i>	2	7	1	2	7	H	onbekend	CBS 205.46			
7	MES 00443	23.0-4	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	2	4	1	4	C	onbekend	onbekend			
8	MES 00444	23.0-5	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	2	4	1	4	C	onbekend	onbekend			
9	MES 00445	23.0-6	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	3	3	2	4	D	onbekend	onbekend			
10	MES 00447	23.0-8	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	4	5	1	5	E	onbekend	CBS 178.69			
11	MES 13058	Aa cross	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	4	5	1	5	E	experimenteel ras	Italspaw			
12	MES 00448	23.0-9	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	5	4	1	6	F	commercieel ras	Les Miz 21			
13	MES 00450	23.0-11	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	6	1		1	G	onbekend	CBS 178.69			
14	MES 02020	agr 03/01	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	onbekend			
15	MES 02074	M 4100	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	Mycelia b.v.			
16	MES 02097	98/10	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	onbekend			
17	MES 02098	agr 03/02	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	Somycel 4021			
18	MES 12794	A.aegerita 13	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	onbekend			
19	MES 12795	A.aegerita 146	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	onbekend			
20	MES 12796	A.aegerita 152	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	onbekend			
21	MES 12798	A.aegerita 157/E4	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	onbekend			
22	MES 13055	Aa3	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	commercieel ras	Italspaw			
23	MES 13059	Aa OE	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	experimenteel ras	Italspaw			
24	MES 13060	Aa Rdl	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	experimenteel ras	Italspaw			
25	MES 13061	Aa Mal	<i>Agroclybe aegerita</i>	1	8	6	2	8	I	experimenteel ras	Italspaw			
26	MES 02023	agr 02/01	<i>Agroclybe chaxinga</i>	4	9	7	3	9	J	stam uit China, Jilin Provincie				
27	MES 02030		<i>Agroclybe cylindracea</i>	?			4	10	K	onbekend	onbekend			
28	MES 13057	Aa 171	<i>Hebeloma???</i>	3			5	11	L	experimenteel ras	Italspaw			

Tabel 2. Genotypering van de Pioppino stammen uit de collectie van Plant Breeding, PRI Wageningen UR. In de tweede kolom zijn de collectienamen van de stammen weergegeven en in de derde kolom de labnamen of de stamnaam zoals die is aangereikt door de oorspronkelijke eigenaar. In de kolom "Soort" is de uitslag van de soortbepaling met ITS te zien. In de kolommen onder de kop "Genetische verwantschap" zijn de analyses weergegeven om de variatie tussen stammen te bepalen. Deze is gebruikt om een "definitief" stamgenotype weer te geven. Stammen met een identiek genotype zijn naar alle waarschijnlijkheid kopieën van elkaar (geen genetische verschillen). Stammen met een zelfde letter maar een verschillende volgreter zijn nauw aan elkaar verwant. De stamnaamen in de tweede kolom die omkaderd zijn, zijn gebruikt voor de bereiding van experimenteel broed en deze zullen door de telers getest worden. Rijen met identieke kleuren geven stammen aan met hetzelfde genotype.

De nu gebruikte commerciële rassen vallen in de grootste groep. Dat wijst erop dat veel nu gebruikte stammen identiek aan elkaar zijn ondanks het feit dat ze onder verschillende namen en door verschillende broedfabrikanten worden verkocht. Dat is niet ongebruikelijk in de paddenstoelenteelt. De andere groepen verschillen behoorlijk van deze grote groep en vertoont onderling ook variatie. De genotypering identificeert tien verschillende genotypen binnen de *A. aegerita* stammen. Zoals verwacht is de *A. chaxinga* genetisch duidelijk verschillend van de andere stammen. De stam die niet geïdentificeerd kon worden op soort verschilt ook erg van de rest, evenals de stam die waarschijnlijk niet tot het genus *Agrocybe* behoort (MES 13057, tabel 2).

De genetische analyse heeft de samenhang in de collectie *Agrocybe* duidelijk gemaakt en een selectie vergemakkelijkt. Uit de collectie is een selectie van negen stammen gekozen die voor experimentele teelten gebruikt zullen worden. Deze stammen zijn verdeeld over de genotypen die zijn vastgesteld (omkaderde MES nummers in tabel 2).

4 Substraatonderzoek

In overleg met de telers is besloten om het substraatonderzoek op twee type bulksubstraten te doen, te weten zaagsel en stro. Door capaciteitverschillen in de twee bedrijven zullen voor het zaagselsubstraat 5 stammen worden getest en voor het strosubstraat 9 stammen.

Het zaagsel substraat zal door Bert Rademakers (CNC-Exotic Mushrooms) geleverd worden en het strosubstraat door John Verbruggen (Substraatproducent en teler).

Voor beide bedrijven is broed gemaakt als aangegeven in tabel 3.

Na 2 vluchten zal in gezamenlijk overleg een selectie gemaakt worden die op wat grotere schaal op substraat van John Verbruggen geteeld zal worden.

Na de substraatproeven zal in overleg besloten worden welk ras(sen) en welk substraat de beste potentie heeft. Indien er een ras uitkomt dat alleen in de PRI collectie voorhanden is zal PRI er voor zorgen dat dit via een commerciële broedleverancier beschikbaar komt. PRI zal afspraken maken omtrent kosten en bescherming van het ras.

In het substraatonderzoek zullen misschien niet altijd grondstoffen gebruikt kunnen worden die van biologische oorsprong zijn. De uiteindelijke commerciële teelt zal echter wel worden opgezet op substraat dat uit grondstoffen bestaat van biologische oorsprong.

Agrocybe stammen											
MES nr.	Ras/Labnaam	Genus	Soort	geïsoleerd op	Identification based on ITS-seq.	ISSR-A	ISSR-B	ISSR-Z	Type	Herkomst	
1	MES 00440	23.0-1	Agrocybe	aegerita	22-sep-08	Agrocybe aegerita	1	1	1	wildisolaat	
2	MES 00441	23.0-2	Agrocybe	aegerita	22-sep-08	Agrocybe aegerita	1	1	2	wildisolaat	CBS 204.4
3	MES 00443	23.0-4	Agrocybe	aegerita	22-sep-08	Agrocybe aegerita	2	1	4	onbekend	
4	MES 00445	23.0-6	Agrocybe	aegerita	22-sep-08	Agrocybe aegerita	3	1	3	onbekend	
5	MES 00448	23.0-9	Agrocybe	aegerita	22-sep-08	Agrocybe aegerita	5	1	4	Les Miz 21	
6	MES 02023	agr 02/01	Agrocybe	chaxinga	22-sep-08	? (slechte sequentie)	9	2	7	onbekend	China
7	MES 02074	M 4100	Agrocybe	aegerita	22-sep-08	Agrocybe aegerita	8	1	6	Mycelia 4100	
8	MES 02098	agr 03/02	Agrocybe	aegerita	22-sep-08	Agrocybe aegerita	8	1	6	Somycel 4021	
9	MES 13055	Aa3	Agrocybe	aegerita	22-sep-08	Agrocybe aegerita	8	1	6	Italspaw	

Broed voor Verbruggen		Broed voor Rademakers		Totaal
1	MES 00440 15 liter			15
2	MES 00441 15 liter			15
3	MES 00443 15 liter	MES 00443	3 liter	18
4	MES 00445 15 liter			15
5	MES 00448 15 liter			15
6	MES 02023 15 liter	MES 02023	3 liter	18
7	MES 02074 15 liter	MES 02074	3 liter	18
8	MES 02098 15 liter	MES 02098	3 liter	18
9	MES 13055 15 liter	MES 13055	3 liter	18
Totale broed hoeveelheid				150 liter

Tabel 3. Lijst met geselecteerde stammen uit de PRI collectie die geteeld zullen worden door een aantal tellers op 2 soorten substraten. Het onderste gedeelte van de tabel geeft aan de hoeveelheden broed die door PRI gemaakt zijn (Broed voor Verbruggen; 15 liter bestemd voor strosubstraat; broed voor Rademakers; 5 liter bestemd voor zaagselsubstraat).