

Különböző burgonyafajták fitoftóra (*Phytophthora infestans*) fertőzésre adott válaszána transzkriptómiai vizsgálata

Transcriptome Analysis of the Phytophthora Infestans Induced Stress-Response in Different Potato Cultivars

Taller János^{1*}, Nagy Erzsébet¹, Idogwu Esther Ijeoma¹, Wolf István², Polgár Zsolt³ és Frank Krisztián²

¹MATE Genetika és Biotechnológia Intézet;

taller.janos@uni-mate.hu, nagy.erzsebet@uni-mate.hu, idogwu.esther.ijeoma@phd.uni-mate.hu

²MATE Agrárcsoport Kft; wolfistvan01@gmail.com, frank.krisztian@uni-mate.hu

³MATE Növénytermesztési Intézet; polgar.zsolt@uni-mate.hu

*Levelező szerző: taller.janos@uni-mate.hu

Összefoglalás: A *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary nevű oomycéta gomba által okozott burgonyavész a burgonya egyik legveszélyesebb kórokozója. Vad *Solanum* fajokban számos rezisztenciagént azonosítottak, melyek közül a *Solanum demissum* eredetű 11 rasszspecifikus *P. infestans* rezisztenciagén a legelterjedtebben hasznított a burgonyanemesítésben. Korábbi elemzéseink azt mutatták, hogy a White Lady (WL) fajtában a 11 R gén legtöbbje megtalálható. A jelen kutatási programban a magas fitoftóra rezisztenciával rendelkező WL mellett Gergely (2004) alapján jó horizontális rezisztenciájúnak leírt Kastia fajtát és egy fogékony fajtát, a Sárvári borostyánt használtuk, hogy transzkriptom vizsgálattal hasonlítsuk össze a *P. infestans* inokulációra adott reakcióikat. A transzkriptom elemzést a MP-1548-as *P. infestans* izolátummal való oltás előtt (kontroll), valamint 18, 24, 48 és 72 órával az oltás után vett levélmintákból tisztított RNS-en végeztük. A fertőzési kísérlet a WL várt rezisztenciáját és a Sárvári borostyán fogékonyságát igazolta, de a Kastia a fitoftóra fertőzés jellegzetes tüneteit produkálta. Az egyes RNS-szekvenálások rövid leolvasásait egy in vitro White Lady növény hosszú leolvasásokból álló transzkriptomjához illesztettük, és szekvenálásonként több mint 100 000 transzkriptet azonosítottunk. A három fajta fitoftóra fertőzésre adott stressz-válaszát e géngyűjtemények összehasonlításán keresztül jellemeztük. Vizsgálataink átfogó különbségeket mutattak ki a rezisztens és a fogékony fajták fitoftóra fertőzésre adott válaszában.

Kulcsszavak: *Phytophthora infestans*, burgonya, transzkriptom vizsgálat, rezisztencia

Abstract: Late blight, caused by the oomycete fungus *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, is one of the most dangerous diseases of potatoes. A number of resistance genes have been identified in wild *Solanum* species, of which 11 race-specific *P. infestans* resistance genes derived from *Solanum demissum* are the most widely used in potato improvement. Our previous analyses have shown that most of the 11 R genes are present in cultivar White Lady (WL). In the present research program, in addition to WL, which has high resistance to late blight, we used the cultivar Kastia, described by Gergely (2004) as having good horizontal resistance, and a susceptible cultivar, Sárvári borostyán, to compare by transcriptome analysis their responses to *P. infestans* inoculation. The transcriptome analysis was performed on purified RNA from leaf samples taken before inoculation with *P. infestans* isolate MP-1548 (control) and 18, 24,

48 and 72 h after inoculation. The infection experiment demonstrated the expected resistance of WL and susceptibility of Sárvári borostyán, but Kastia showed the typical symptoms of *Phytophthora* infection. Short reads of each RNA sequence were aligned to the long read transcriptome of an *in vitro* White Lady plant and over 100 000 transcripts per sequencing were identified. The stress response of the three cultivars to *P. infestans* infection was characterized by comparing these gene collections. Our analyses revealed overall differences in the response of resistant and susceptible cultivars to *P. infestans* inoculation.

Keywords: *Phytophthora infestans*, potatoe, transcriptome analysis, resistance

1. Bevezetés

A XX. század elejétől indult rezisztencia nemesítés, majd a fungicidek és más kontroll eljárások alkalmazása ellenére világszerte továbbra is a *P. infestans* a burgonyatermesztés biztonságát leginkább veszélyeztető kórokozó. (Haverkort et al., 2009) A fitoftóra fertőzés által előidézett veszteség globálisan évi 5,6 milliárd Euróra becsülhető. A kórokozóval szemben a kémiai szerekkel történő védekezés hatékony, ugyanakkor, a felmerülő környezetbiztonsági kérdések miatt az EU-ban az engedélyezett fungicidek köre szűkül. E helyzetre leginkább a genetikai alapú védelem kialakítása jelenthetne megoldást a termesztett fajtákban.

A burgonya és a hemibiotróf *P. infestans* közötti kompatibilis kölcsönhatás esetén a kórokozó effektor molekulái képesek már a fertőzés korai szakaszában leküzdeni a gazdanövény veleszületett immunválaszát. A kompatibilis kölcsönhatás eredménye az effektor által kiváltott érzékenység (effector-triggered susceptibility - ETS) A fitoftóra elleni sikeres védekezéshez szükséges a kórokozó különféle effektor molekuláinak közvetlen vagy közvetett módon történő felismerése és hatásmechanizmusuk gátlása. E feladatot a növényeken belül az R-gének látják el, a jelenséget pedig effektor által kiváltott immunitásnak (effector-triggered immunity - ETI) nevezzük. Az egyes burgonyanövényekben sok száz, adott effektor molekulá(k)ra specifikus R-gén található. A különféle fitoftóra rasszok földrajzi terjedésének, rekombinációnak vagy mutációnak köszönhetően megjelenhetnek egy adott fajta rezisztenciáját áttörni képes új biotípusok, melyek e tulajdonságukat olyan effektor molekuláknak köszönhetik, melyekkel szemben a gazdanövényben nincs megfelelő, inkompatibilitást eredményező R-gén. Amennyiben a patogén nem rendelkezik a rezisztencia áttöréséhez szükséges virulencia faktorral, azaz effektor molekulával, úgy a megtámadott növényi sejten végbemege az ETI, ami gyakran hiperszenzitív reakcióval (HR) jár együtt. A hiperszenzitív reakció során jelentkező programozott sejthalál eredményeként a megtámadott növényi sejt elpusztul, meggátolva ezzel a kórokozó terjedését a növényben. Az így elpusztult sejtek lézió formájában gyakran láthatók a növényen.

A burgonya nemesítésben fitoftóra rezisztencia kialakítására széleskörűen alkalmazzák a *Solanum demissum* hexaploid vad burgonyafajból származó R1-R11 géneket tartalmazó vonalakat. E rassz-specifikus rezisztenciagének külön-külön megtalálhatók a Mastenbrock differenciáló sor vonalaiban, lehetővé téve a *P. infestans* izolátumok megfelelő AVR génjeinek azonosítását. A különböző izolátumok avirulencia génjeinek összetétele ismeretében a R1-R11 gének fertőzési tesztekkel azonosíthatók a különböző burgonya genotípusokban. A keszthelyi Burgonyakutatási Központban nemesített White Lady (WL) fajta nagyfokú fitoftóra rezisztenciával bír. Korábbi, Wolf István által a differenciáló sorral végzett vizsgálatok alapján megállapítást nyert, hogy az R1, R2, R3, R4, R6, R7, R10 és R11 gének jelen vannak a fajtában, míg az R5 hiányzik belőle (Hajianfar, 2014). Az R8 és R9 jelenlétét/hiányát megfelelő izolátum híján nem tudtuk tesztelni.

Jelen vizsgálatok során célunk a fitoftóra fertőzésre adott biotikus stressz-válasz molekuláris genetikai módszerekkel történő összehasonlító elemzése volt. A White Lady mellett a fogékony

Sárvári borostyán (Sb) és a jó horizontális rezisztenciával rendelkezőnek leírt (Gergely, 2004) Kastia (K) fajtát vontuk be a vizsgálatokba. E vizsgálat rövid leolvasásokból (Illumina) álló RNS-szekvenálási adatait egy *in vitro* WL növény PacBio platformon kapott hosszú leolvasásaihoz illesztettük. E megközelítés ugyan korlátozhatja az azonosítható gének számát, azonban csaknem a teljes genomra kiterjedő információt nyújt gének expressziós változásairól, illetve, mivel egy hosszú leolvasás egy teljes mRNS szekvenciát reprezentál, így e gének kódoló szekvenciájáról is.

2. Anyag és módszer

2.1. Növényanyag

White Lady (WL), Sárvári borostyán (Sb) és Kastia (K) burgonyafajták gumóit 3 literes cserepekben lévő balti tőzegbe ültettük, és fitotronban 50%-os relatív páratartalom, 16:8 óra megvilágítás : sötét periódus mellett neveltük a növényeket. A megvilágítás kezdetekor 20°C-ról két óra alatt 25°C-ra emeltük, majd a sötét periódus kezdetére szintén két órán belül 20°C-ra csökkentettük a hőmérsékletet. Mindegyik fajtából öt növényt a kezelések céljára egyet pedig kontrollnak használtunk.

2.2. Fertőzések és mintavétel

A kezelésre kerülő, virágzás előtti stádiumban lévő növények 2-2 levélének fonákjára 15 000 sporangium/mL fitoftóra oldatból 50 µL-t egyetlen cseppben helyeztünk el, míg a kontroll növényekre steril desztillált vizet cseppentettünk. A cseppeket minden esetben az összetett levél csúcsi levélkéjére helyeztük. A kezelésekhöz a lengyel eredetű MP-1548 izolátumot használtuk. A cseppeket 12 óra múlva pipettával eltávolítottuk.

Mintagyűjtéshez a kezelt csúcsi levélke melletti levélkéket használtuk. Mintákat minden növényről a kezelés után 18, 24, 48 és 72 óra múlva gyűjtöttünk. A levélmintákat szárazjégre gyűjtöttük, majd RNS tisztításig -70°C-on tároltuk.

2.3. Molekuláris vizsgálatok

Az egyes levélmintákból 50 mg-ot használtunk a RNS előtisztításához, melyet TRIzolal (Invitrogen, USA) végeztünk a gyártó útmutatásai alapján. Egy következő tisztítási lépésben a teljes RNS-t Direct-zol RNA Microprep kittel (Zymo Research, USA) vontuk ki, majd a poly-A dúsítást Poly(A) RNA Selection kittel (Lexogen, Ausztria) végeztük. A RNS integritást RNA 6000 Pico kittel 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA) készüléken vizsgáltuk. Csak az 5,5 RIN érték feletti minőségű RNS mintákat használtuk a további vizsgálatokhoz. A RNS-szekvenáláshoz a könyvtárakat NEXTFLEX Rapid Directional RNA_Seq kit 2.0 (Perkin Elmer, USA) felhasználásával készítettük el. A transzkriptom szekvenálásokat NextSeq 500 (Illumina, USA) platformon végeztük, High Output 150 sequencing kittel.

2.4. Bioinformatikai elemzések

A SOAPdenovo-Trans (Xie et al., 2014) programot használtuk az egyes minták RNS-szekvenálási rövid leolvasásainak illesztéséhez. Referenciának az *in vitro* WL növény hosszú leolvasásai szolgáltak. A leolvasások kvantifikálása a Salmon program (Patro et al., 2017) „index” és „quat” parancsainak segítségével történt. A statisztikailag szignifikáns differenciálisan kifejeződő gének (DEGs - differentially expressed genes) a DESeq2 (Love et al., 2014) program segítségével, R környezetben kerültek azonosításra.

3. Eredmények

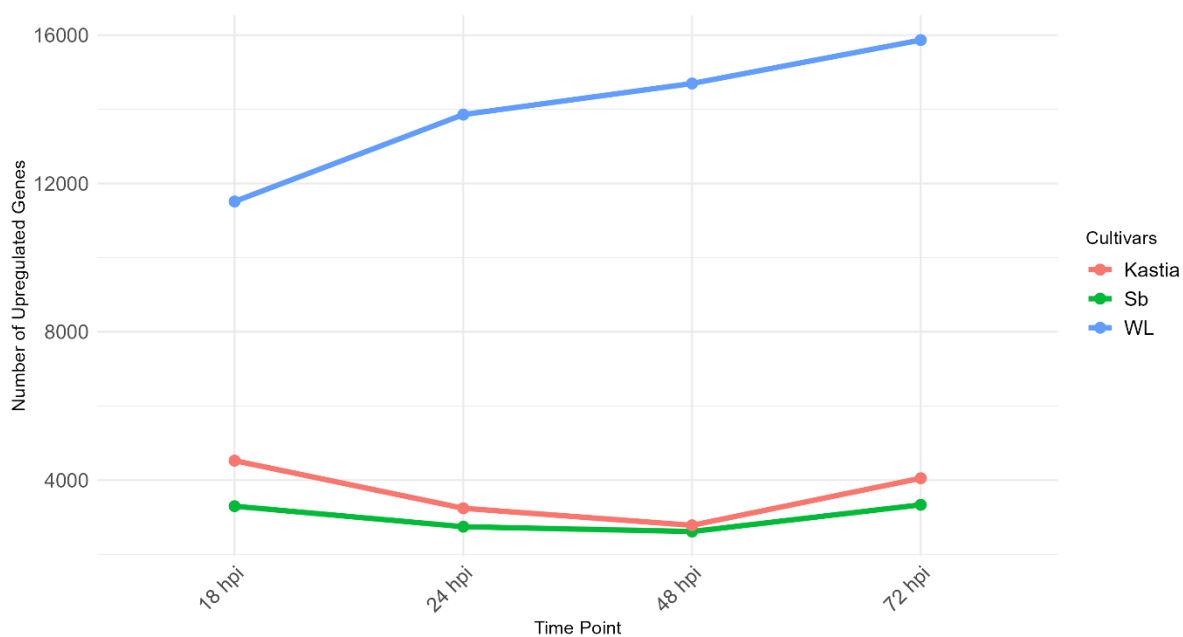
3.1. Fertőzési tesztek

A rezisztens WL fajta levelén a fitoftóra sporangiumokat tartalmazó vízcsepp helyén 48 órával a fertőzés után láthatóak voltak a hiperszenzitív rezisztenciára utaló léziók, melyek nem terjedtek tovább a szomszédos területekre. A fogékony Sb fajta a fertőzés tipikus tüneteit mutatta, azaz a fitoftóra sikeresen megtelepedett a kezelés helyén, és onnan tovább terjedt. Érdekes módon a jó fitoftóra rezisztenciával rendelkező fajtának leírt Kastia a burgonyavész jellegzetes tüneteit mutatta az MP-1548 izolátummal szemben, azaz vizsgálatainkban fogékonynak bizonyult, az összes kezelt növény befertőződött.

3.2. Transzkriptom vizsgálatok

Mindhárom fajta kontroll és kezelt mintáinak RNS szekvenálással kapott leolvasásait az *in vitro* White Lady hosszú leolvasásaihoz illesztettük, és ez alapján a WL-ben 111 228, a Sb-ban 102 654, míg a Kastia fajtában 101 919 egyedi szekvenciájú transzkriptet azonosítottunk.

A rezisztens és fogékony fajták között jelentős eltérések mutatkoztak a fertőzés hatására megváltozott expressziót mutató gének számában. A felül-, illetve alulszabályozott gének számát az 1., illetve a 2. ábra mutatja.

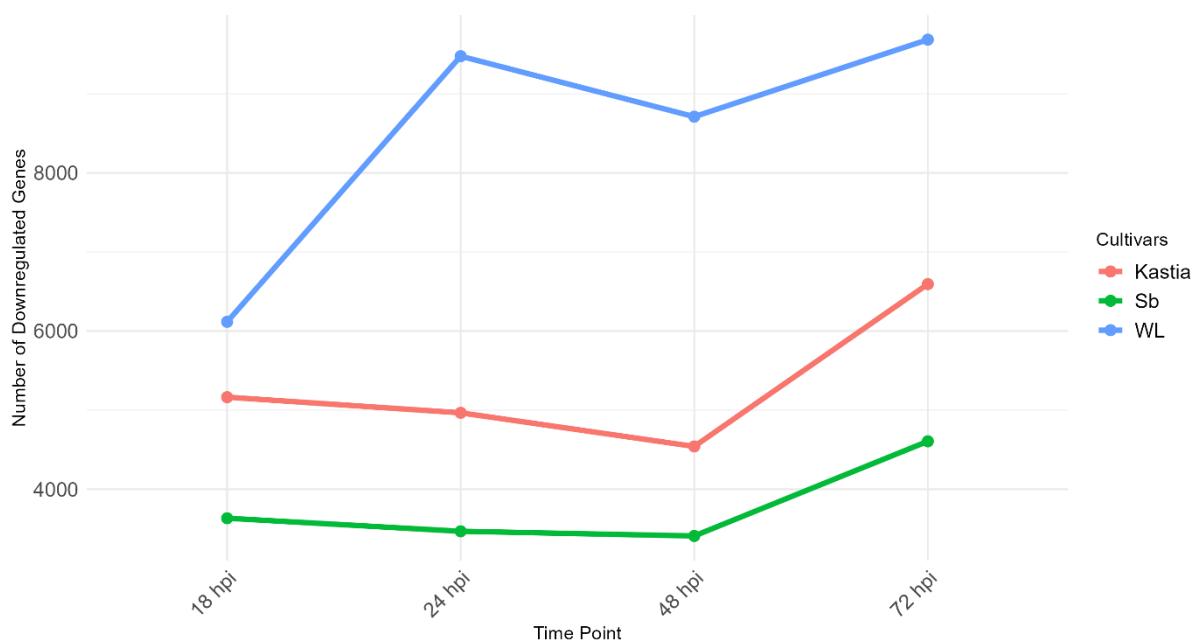


1. ábra A felülszabályozott gének száma a három vizsgált fajta négy mintavételi időpontjában a kontroll mintához viszonyítva

Az ábra a log₂ kópiaszám változást meghaladó gének számát mutatja.

A rezisztens WL fajtában a felülszabályozott gének száma folyamatosan emelkedett a 18. órában mért 11 514-ről a 72. órában 15 867-re. Ezzel szemben a fogékony Sb és Kastia fajtában a 18. órában mért 3 298, illetve 4 526 érték csökkent, a 48. órában érve el a mélypontot, majd ismét emelkedni kezdett.

A rezisztens fajtában a felülszabályozott DEG-ek száma 3-5-szörösen haladta meg a fogékony fajtákban mért értéket mindegyik mérési időpontban.



2. ábra Az alulszabályozott gének száma a három vizsgált fajta négy mintavételi időpontjában a kontroll mintához viszonyítva

Az ábra a \log_2 kópiaszám változást meghaladó gének számát mutatja.

Az alulszabályozott DEG-ek száma mindhárom fajta esetében a 72. órában érte el a maximumot, és a legalacsonyabb értéket a 48. órában mutatta. A 18. órát leszámítva a rezisztens fajtában 2-3-szor annyi gén lett alulszabályozva, mint a fogékony fajtákban.

4. Megvitatás

A rezisztens White Lady fajtában mindegy 9%-kal több egyedi transzkriptet azonosítottunk, mint a fogékony Sárvári borostyán, illetve Kastia fajtában. Ugyanakkor, a felülszabályozott, illetve az alulszabályozott gének számában többszörös eltérés mutatkozott a WL javára. Ez arra utal, hogy a rezisztens genotípusban a fitoftóra fertőzésre adott stressz-válasz lényegesen kiterjedtebb, és a fertőzés utáni 72. órában a White Lady-ben azonosított egyedi transzkriptek mintegy 23%-át érinti, míg a Kastiában ez 10%, a Sárvári borostyánban pedig 8%. Ez a különbség még nyilvánvalóbb a mind a négy mintavételi időpontban kifejeződő felülszabályozott gének esetében, mivel a White Lady-ben 6 375 olyan gént találtunk, melyek mind a négy mintavételi időpontban \log_2 értéket meghaladó kópiaszám növekedést mutattak, míg a Sárvári borostyánban csak 976, és a Kastiában 897 ilyen gén volt. Eredményeink arra utalnak, hogy a rezisztenciagének túl a *P. infestans* fertőzés elleni sikeres, hiperszenzitív reakción alapuló védekezéshez a működő gének széles körének módosult kifejeződése szükséges a burgonyában.

A White Lady fajta levelein a fertőzés helyén, már a 48. órában szabad szemmel is láthatóvá váltak a sikeres hiperszenzitív reakcióra utaló léziók, azaz a stressz-válasz gyorsan zajlott le. Ugyanakkor, a két fogékony fajtában a 48. órában a burgonyavész kezdeti tüneteit tapasztaltuk. Mivel a 48. óra után mindhárom fajtában tovább növekedett a felül-, illetve alulszabályozott gének száma, ezért a továbbiakban célunk, hogy e géneket annotáljuk, azaz szekvenciájuk alapján feltételezhető funkciójukat meghatározzuk. E vizsgálatok választ adhatnak a rezisztens és fogékony genotípusokban a fitoftóra fertőzésre adott szisztémikus válaszban lévő különbségekre. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a fitoftóra fertőzésre adott stressz-válasz gyorsan, vélhetően néhány órán belül kiváltódik a növényben. Ezért újabb kísérleteket tervezünk beállítani a fertőzés utáni 18. órát megelőző időpontokban történő minták vétele és elemzése céljából, valamint megkezdtük a 18. órában csak a White Ladyben kifejeződő gének

annotálását a sikeres rezisztencia kialakításában résztvevő gének, géncsaládok azonosítása céljából.

Transzkriptómiai adataink kiértékelése, a rezisztencia kialakításában meghatározó gének és géncsaládok azonosítása hozzájárulhat a fitoftórával szembeni rezisztencianemesítés eszköztárának bővítéséhez, számos kulcsfontosságú génre kiterjedő amplitikon szekvenálási panelek fejlesztéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Jelen kutatást az INN_139994 OTKA pályázat támogatta.

Irodalom

- Bu, D., Luo, H., Huo, P., Wang, Z., Zhang, S., He, Z., Kong, L. (2021). KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*. **49** (W1), W317–W325. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab447>
- DeYoung, B. J., Innes, R. W. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology*. **7**, 1243–1249. <https://doi.org/10.1038/ni1410>
- Gergely, L. 2004. Burgonyafajták rezisztenciavizsgálata fitoftóra- (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) fertőzéssel szemben és egyes környezeti tényezők hatása a betegség-ellenállásra. PhD disszertáció. Veszprémi Egyetem, könyvtár.
- Hajianfar, R. 2014. Analysis of the genetic background of resistance in potato with special attention to late blight (*P. infestans*) resistance. PhD thesis
- Haverkort, A., Struik, P., Visser, R., Jacobsen, E. 2009. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research*. **52** (3) 249–264. <https://doi.org/10.1007/s11540-009-9136-3>
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*. **444**, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*. **15**, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J., Sessa, G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*. **54**, 23–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135035>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., Kingsford, C. 2017. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*. **14** (4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- van der Biezen, E. A., Jones, J. D. G. 1998. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology*. **8** (7), R225–R227. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70145-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70145-9)
- Xie, Y., Wu, G., Tang, J., Luo, R., Patterson, J., Liu, S., Huang, W., He, G., Gu, S., Li, S., Zhou, X., Lam, T. W., Li, Y., Xu, X., Wong, G. K.-S., Wang, J. 2014. SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. *Bioinformatics*. **30** (12), 1660–1666. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu077>

A műre a Creative Commons 4.0 standard licenc alábbi típusa vonatkozik:
CC-BY-NC-ND-4.0.

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

