

Farkas Eszter¹- Kellner Nikolett²- Deák Tamás³- Bisztray György Dénes⁴

Feketerothadással fertőzött ellenálló és fogékony szőlőfajták összehasonlító transzkriptomikai vizsgálata

Comparative transcriptome profiling of resistant and susceptible grapevine varieties infected with black rot

farkas.eszter89@gmail.com

¹ Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, PhD hallgató

² Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, PhD hallgató

³ Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, egyetemi docens

⁴ Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, egyetemi tanár

Összefoglaló

A szőlő feketerothadásáért a *Gnignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz tömlősgomba faj felelős, amely az elmúlt évek szélsőségesen meleg, csapadékos és párás időjárási körülményei között jelentős termésvesztéseget okozott Magyarországon, elsősorban az organikus szőlőtermesztésben. A gazdaságilag fontos bortermő szőlő (*Vitis vinifera* L.) fajták általában fogékonyságot mutatnak a kórokozóval szemben, míg egy interspecifikus hibridfajta, a 'Csillám' erősen toleránsnak/rezisztensnek bizonyult.

Ahhoz, hogy molekuláris szinten megértsük a szőlő feketerothadással szembeni védekezési mechanizmusait, egy toleráns/rezisztens 'Csillám' és egy fogékony 'Csaba gyöngye' szőlőfajta összehasonlító RNS szekvenálását végeztük el Illumina platformon. A kórokozó gomba spórájával inokulált szőlőlevelek transzkripciós válaszát tanulmányoztuk a fertőzést követően 0, 6, 18 és 36 órával.

Előzetes eredményeink alapján a patogén által indukált immunitás alapvető elemeinek (sztlbén szintázokat és PR fehérjéket kódoló gének) expressziója szignifikánsan magasabb volt a toleráns fajtában. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a 'Csillám' preformált rezisztenciával rendelkezik. Mindazonáltal a differenciált expressziót mutató gének között, rezisztencia gén analógokat is azonosítottunk, melyek az effektor indukált immunitás szerepét is hangsúlyozhatják a szőlő védekezési rendszerében.

Korábbi kutatások *Vitis cinerea* genetikai háttérben (Börner alanyfajta) a feketerothadással szembeni rezisztenciát meghatározó QTL régiót a 14-es kapcsoltsági csoportban lokalizálták. A mi kísérleti eredményeink alapján differenciált expressziót mutató gének között ugyanakkor egy sem található a szőlő 14. kapcsoltsági csoportjának korábban azonosított QTL régiójában. A 'Csillám' toleranciájának genetikai háttere mindezek alapján különbözhet az előzőleg említett Börner alanyfajta rezisztenciájától.

Bevezetés

A szőlő feketerothadásáért a *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz (anamorf alakja: *Phyllosticta ampelivida* (Engelm.) van der Aa) nevű, Észak-Amerikában őshonos hemibiotróf gomba felelős. Európában 1885-ben jelent meg először. Hasonlóképp a 19. század második felében terjedt el a szőlőlisztharmat (*Erysiphe necator*) és a szőlőperonoszpóra (*Plasmopara viticola*), melyek a szőlő rezisztenciakutatás legintenzívebben tanulmányozott betegségei között szerepelnek (Atak, 2016, Buonassisi et al., 2017), miközben a feketerothadás, mérsékelt kártétele miatt háttérbe szorult mind a kutatás, mind pedig a rezisztencia nemesítés terén. Az elmúlt években a kutatók figyelmét felkeltette a szőlőt, a világ egyre nagyobb részén veszélyeztető guignardiás feketerothadás megjelenése.

Magyarországon a szőlő feketerothadását először Mikulás és Tomcsányi (1999) írták le, majd hazánkban a betegség járványszintű megjelenését 2010-ben és 2014-ben tapasztalták (Dula et al., 2016). Az organikus szőlőtermesztésben a csökkentett fungicid használat és a lisztharmat-, peronoszpóra rezisztens szőlőfajták alkalmazása is együttesen a másodlagos kórokozók, mint a *Guignardia bidwellii* megjelenését eredményezték, további nehézségeket okozva a szőlőtermesztőknek.

Napjainkban a szőlő rezisztencia kutatások nagy része vad *Vitis* fajokkal foglalkozik, mivel ezek a növények domesztikáció hiányában és a kórokozókkal való koevolúció eredményeként (miközben az ázsiai rezisztencia források esetében ez utóbbi nem játszott szerepet) értékes rezisztencia forrásként őrződhetnek meg. A biotikus rezisztencianemesítés számára alapvető jelentőségű az új rezisztencia források azonosítása és ezek felhasználása, mivel a rezisztenciagének hatékonyságának letörése folyamatos problémát jelent a növényvédelemben. A feltárt rezisztencia források marker alapú szelekciójának segítségével többek között feketerothadás toleráns/rezisztens szőlőfajták nemesítését támogathatjuk és ezáltal a szőlő védekező képességét fokozhatjuk.

A feketerothadással szemben rezisztens szőlőfajták, illetve -fajok között megtalálható a 'Merzling' (*Vitis L. subsp. vinifera*), a 'Börner' (*Vitis riparia* Gm x *Vitis cinerea* Arnold), 'Seibel 7053' (Seibel 5163 x Seibel 880) és az 'Illinois 547-1' (*V. rupestris* B38 x *V. cinerea* B9) (Dalbo et al., 2000, 2001; Kiss et al., 2017). Hausmann et al. (2016) a *Vitis vinifera* és *Vitis labrusca* keresztezéséből létrejött direkt termő hibridek és a főképp *V. rupestris*, *Vitis vinifera*, illetve észak-amerikai *Vitis* fajok keresztezéséből származó ún. franko-amerikai hibridek között is egyaránt talált ellenálló fajtákat.

Az általunk vizsgált 'Csillám' franko-amerikai hibrid szőlőfajta, amely a 'Kékfrankos' és a 'Seibel 4643' leszármazottja, szintén erősen toleráns volt feketerothadással szemben (Kiss et al., 2017). A genetikai térképek alapján történő QTL elemzés, elsődlegesen a 14-es kromoszómán mutatott ki feketerothadás rezisztenciát szabályozó lókuszokat a 'Börner' (Rex et al., 2014) és a 'GF.GA-47-42' x 'Villard Blanc' hasadó családokkal folytatott tanulmányokban (Hausmann et al., 2016).

A kórokozó észak-amerikai eredete alapján koevolúciót feltételeznek az Észak-Amerikában őshonos szőlőfajtákkal, mely elősegíti a rezisztencia kialakulását. Hausmann et al. (2016) kutatási eredményei alapján az észak-amerikai vadszőlő fajok, mint a *Vitis aestivalis*, *V. cinerea* és *V. vulpina* rezisztensek, míg a kelet-ázsiai eredetű *Vitis amurensis* alapvetően fogékonyak bizonyult a feketerothadás kórokozójával szemben. Mindezek ellenére koevolúció hiányában is kialakulhat rezisztencia egy nem őshonos kórokozóval szemben is (Jiao et al., 2016).

A növény-kórokozó kölcsönhatás cikk-cakk modellje alapján több fázisú válaszreakcióban zajlik a védekezés. A növényi immunitás kezdeti patogén által indukált immunitás (PTI) alapú reakcióját a kórokozó elkerülheti, gátolhatja, de ekkor egy sokkal magasabb amplitúdójú effektor indukált immunitás (ETI) válasszal a növény kiküszöbölheti a kórokozó által termelt effektorokat. Az ETI-ért felelősek a biotróf kórokozók elleni reakcióban az NBS-LRR gének, melyek többségében rezisztencia (R) fehérjéket kódolnak. Korábban az ETI

alapú nemesítés volt jelentősebb, a növénynemesítésben azonban egyre kiemeltebb figyelmet fordítunk a PTI-n alapuló védekezésre is (Jiao et al., 2016).

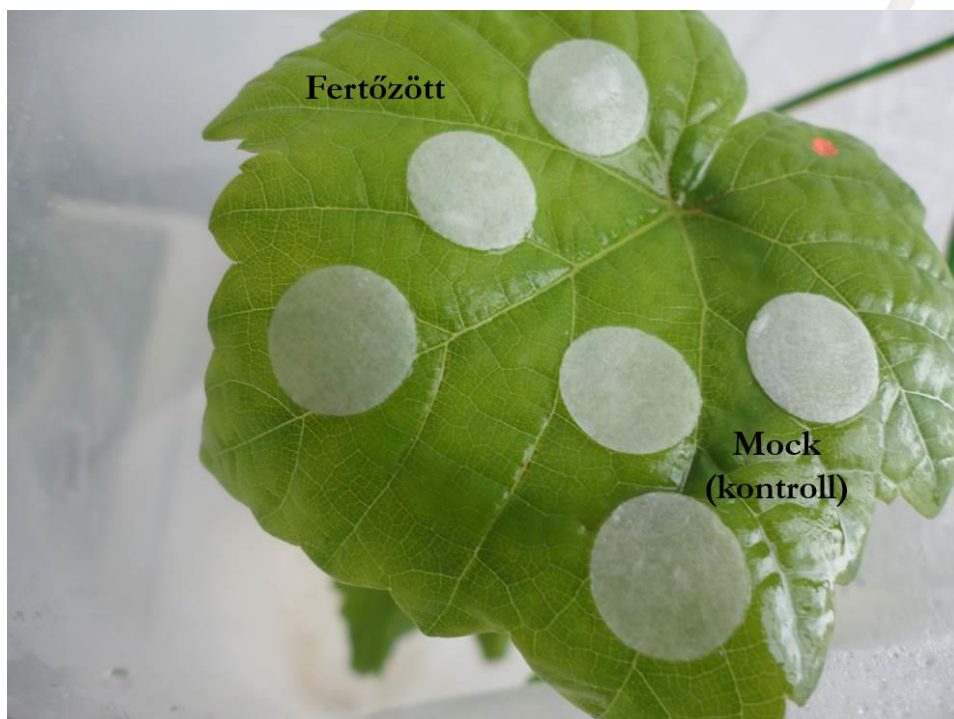
A növénykórokozó mikroorganizmusok életmódjuktól függően eltérő szignalizációs útvonalakat aktiválnak. Általánosságban a biotróf kórokozók a szalicilsavas védekezési útvonalat serkentik, míg a nekrotrófok a jázmonsavas jelátviteli utat. A hemibiotróf kórokozók a kezdeti kolonizáció során biotróf, majd nekrotróf életmódot folytatnak, ezáltal mindkettő szignalizációs útvonalat indukálhatják.

Jelen kutatásban a feketerothadással szembeni ellenállóság biológiai hátterének megismeréhez összehasonlítottuk a fogékony és a toleráns fajta génexpressziós változásait, másrészt a fertőzött és kontroll (mock inokulált) növények RNS populációit. A szőlő-gomba kölcsönhatásban résztvevő növényi válasz géneket és szignalizációs útvonalakat a fertőzés kezdeti, első 36 órájában tanulmányoztuk. A végső gyakorlati célok között szerepel az ellenállósághoz kapcsolt, a nemesítés során marker támogatott szelekcióna alkalmas markerek azonosítása.

Anyag és módszer

A kísérlet során a fogékony 'Csaba gyöngye' és a toleránsnak tekintett 'Csillám' szőlőfajták vesszőiből kétrügyes dugványokat hajtattunk üvegházi körülmények között. A fertőzéshez a növényeket 26 °C, 100% relatív páratartalom mellett folyamatos levélnedvességet biztosítva neveltük. A burgonya-dextróz táptalajon tenyésztett *Guignardia bidwellii* spóráizolátumait, 5×10^5 spóra/ml koncentrációban állítottuk elő foszfátpufferban.

A spóraszuszpenzióból 10 μ l-t vittünk egy 7 mm átmérőjű steril szűrőpapír korongra, majd ezeket a korongokat helyeztük a fiatal, növekvő szőlőlevelekre. A kontroll (mock) korongokat foszfátpufferral itattunk át. A fertőzéseket féllevél-módszerrel végeztük, azaz minden fiatal levél felületének egyik felére spóraszuszpenzióval, másik felére steril foszfátpufferral átitatott, mock szűrőpapírkorongot helyeztünk 3 biológiai ismétlésben (1. ábra).



1.ábra. A féllevél módszer.

A konidiospórák csírázását és hifák kezdeti növekedését tripánkéék festékkel validáltuk. A fertőzést követő 0, 6, 18 és 36 órával (hpi) a szűrőpapír korongok helyéről mintát vettünk, majd a mintákat gyorsfagyasztottuk folyékony nitrogénben és az RNS kivonásáig -70°C -on tároltuk. Egy-egy mintának a levél egyik illetve másik felén található 3-3 db (mock illetve fertőzött) korong számított.

Az RNS kivonást Gambino et al. (2008) protokollja alapján végeztük. A szekvenálást végző UD Genomed Kft. az RNS kivonatokból pair end szekvenálásra (2×100 bp) alkalmas szekvenáló könyvtárakat készített, melynek során ellátta a könyvtárakat a megfelelő index szekvenciákkal. A könyvtárak randomizált poolozását követően Illumina HiSeq platformon került sor szekvenálásra.

A nyers szekvencia olvasatok minőségszűrését és az adapterek eltávolítását Trimmomatic (Bolger et al., 2014) szoftverrel végeztük. A könyvtár hosszának becsléséhez a minőségszűrt leolvasásokat a szőlő referencia genomhoz (Jaillon et al., 2007) illesztettük bwa (Li - Durbin, 2009) szoftverrel.

A referencia genom alapú *de novo* transzkript építést és a leolvasások illesztését a transzkriptomhoz tophat és cufflinks (Trapnell et al., 2012) szoftverrel végeztük. Az egyes transzkriptekre illeszkedő nyers szekvencia-számot ht-seq (Anders et al., 2014) programmal olvastuk ki, majd a GC-tartalom alapú normalizálást, a differenciáltan expresszálo gének (DE) azonosítását és a statisztikai elemzést edgeR program segítségével végeztük (Chen et al., 2015).

Eredmények

A toleráns és a fogékony fajtákban a kontroll és a feketerothadással fertőzött levelekből 3 biológiai ismétlésben a négy különböző mintavételi (0, 6, 18, 36 hpi) időpontból, 42 szekvenáló könyvtár készült el. A minőségszűrt olvasatok 5-30 millió read-et foglaltak magukban könyvtáranként, ami 0,5-3 milliárd nukleotidnyi információt jelent mintánként. A „pair end” szekvencia olvasatok párijainak átlagos távolsága -53 és 2 bp között volt, 42-ből 41 szekvenáló könyvtár leolvasási párijai átfedést mutattak.

A referencia genom (Jaillon et al., 2007) strukturális annotációjának felhasználásával és a *de novo* transzkriptek illesztésével létrehoztunk egy, a kísérletünket teljes mértékben reprezentáló *de novo* transzkriptumot. A 42 könyvtárban hozzávetőlegesen 32000 ismert gén és 4331 új transzkriptum szerepelt számos splicing variánssal együtt. Mindezek ellenére viszonylag nagy számban előfordulhatnak pszeudogének vagy álpozitív gének, azonban a legtöbb újonnan azonosított gén szabályos exon-intron struktúrát mutat. Az azonosított új gének közül a szőlő referencia genomra történő illesztés feltehetően kizárta a patogén gombából származó géneket.

A szekvencia olvasatok referencia transzkriptumra történő illesztésében, az egyes gének hossza és GC-tartalma jelentősen befolyásolja az adott transzkriptumra illeszkedő read-ek számát, ezért az RNAseq könyvtárak GC alapú normalizálása szükséges. Az alkalmazott statisztikai módszerek a biológiai ismétléseket felhasználó RNS szekvenálási kísérletekben folyamatosan fejlődnek. A jelenleg széles körben alkalmazott eljárás binomiális eloszláson alapszik és lineáris modellt alkalmaz (Chen et al., 2015).

A toleráns ‘Csillám’ és a fogékony ‘Csaba gyöngye’ 0 hpi, tehát fertőzést közvetlenül megelőző expressziójának összehasonlításával a fajták közötti különbség volt kimutatható. Ebben a mintavételi időpontban a 25 szignifikánsan differenciáltan expresszálo gén között azonosítottunk protein kinázokat és egy rpm1-like rezisztencia gént.

A differenciáltan expresszálo gének (DE), azok a gének, melyek a négy mintavételi időpont valamelyikében a feketerothadás fertőzés hatására kifejeződésük változásának szempontjából eltérően reagáltak a

fogékony és az ellenálló fajta esetében (2. ábra). A 'Csillám' fajtában a preformált rezisztenciáért felelős gének magasabb expressziója és ezáltal feltehetően magasabb patogén által indukált immunitás volt eleve megfigyelhető a 'Csaba gyöngye' fajtához képest. A fertőzést követő 6. órában az expressziós különbségek statisztikai megbízhatósága általánosságban alacsonyabb volt, a p érték 10^{-5} körül mozgott, míg a 0. órában a p értékek 10^{-20} és 10^{-50} között voltak.

A 25 legjelentősebben differenciált expressziót (DE) mutató gén közül 19 a PTI-ben (patogén által kiváltott immunitás) játszott szerepet, míg a további 16 gén a fenil-alanin-ammónia-liáz és sztilbén szintáz géncsalád tagja volt. A DE gének 18 órával a fertőzést követően a 6 órás minták génjeihez hasonló expressziós mintázatot mutattak. A 18 hpi mintákban az antocianin bioszintézis génjei képviseltettek kiemelkedő arányban.

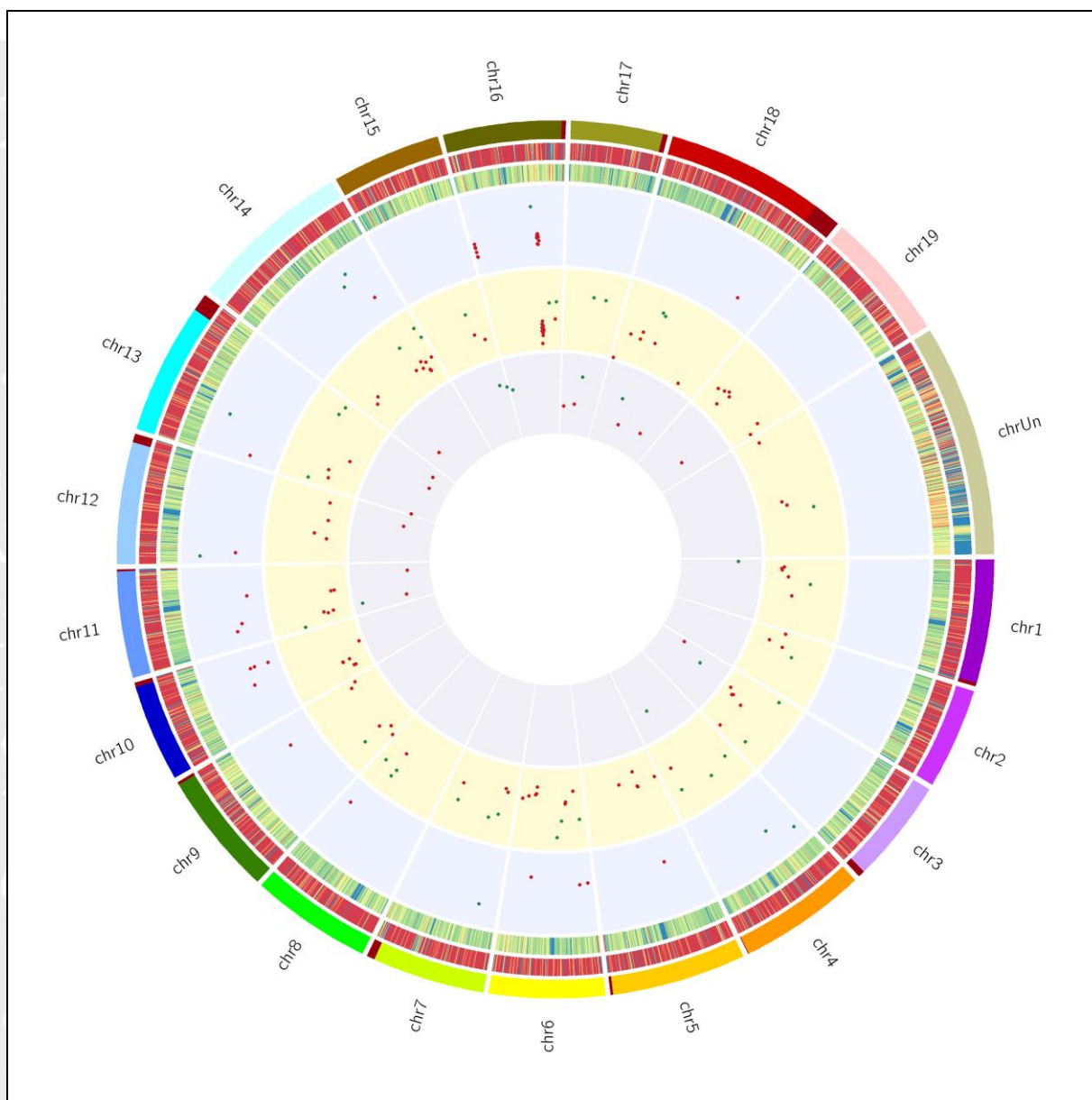
A 36 órás mintákban az LRR (leucinban gazdag ismétlődés) és egyéb kinázokat kódoló gének expressziója volt magas, illetve számos szőlő specifikus és ismeretlen fehérjét kódoló gén fejeződött ki jelentős mértékben. Ebben a mintavételi időpontban már az oxidatív stresszválasz és patogén indukált immunitás génjei nem mutattak differenciált expressziót. A különböző levelek expressziója azonban erősen eltérő választ adott, a p értékek jelentősebben alacsonyabbak voltak, 10^{-3} körül alakultak.

A differenciált expressziót mutató gének között találtunk a jázmosavas/etilén és szalicilsavas útvonalon központi szerepet betöltő géneket is egyaránt, ez valószínűleg a kórokozó hemibiotróf tulajdonságával magyarázható. Jelenleg a feketerothadás rezisztenciáért felelős gének expressziójának kvantitatív PCR-rel történő validása zajlik.

Következtetések

Előzetes eredményeink alapján a 'Csillám' ellenállóságáért a preformált rezisztencia felelős és a növényi válaszban főként a patogén indukált immunitás elemei vesznek részt. Ugyanakkor az effektor indukált immunitás szerepét sem zárhatjuk ki.

A differenciált expressziót mutató gének egyike sem volt megtalálható 'Börner' fajtában már azonosított QTL régió 14-es kapcsoltsági csoportjában megtalálható feketerothadás rezisztenciát szabályozó lókuszkok egyikében sem. Ezek alapján a két eltérő genotípusú szőlőfajta, a 'Csillám' és a 'Börner' eltérő rezisztencia mechanizmussal rendelkezik a feketerothadásal szemben.



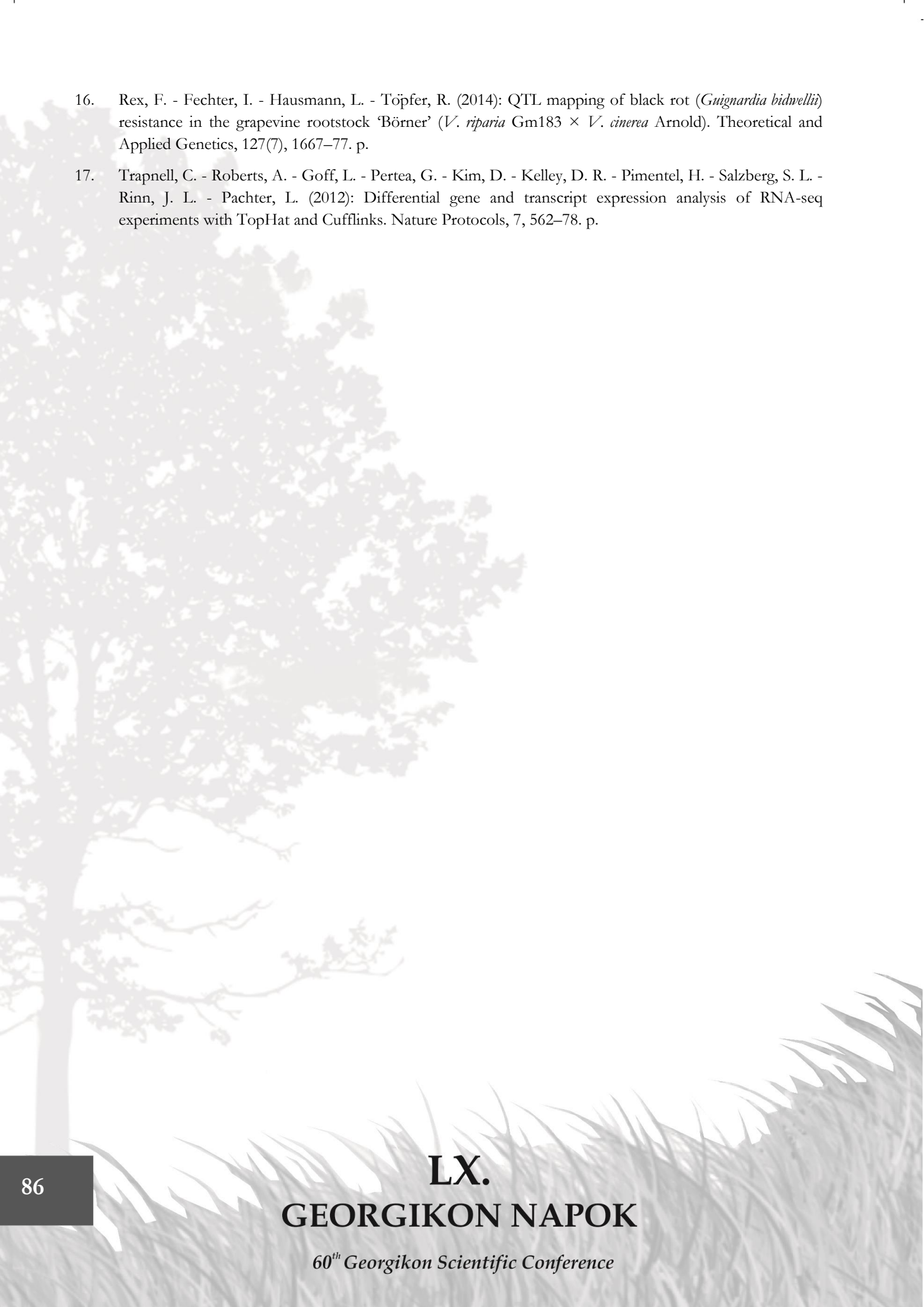
2.ábra. $P < 0.01$ szignifikancia szinten differenciáló expressziót mutató gének. A legkülső sáv a szőlő kromoszómáit (piros színnel az ún. random kromoszóma részeket) mutatja. A második sáv a genom ismeretlen N tartalmát, a harmadik sáv a GC arányt mutatja: intenzívebb, sötétebb színárnyalat magasabb N tartalmat, illetve magasabb GC arányt jelez. A következő sávok a 6, 18 és 36 hpi mintákban 99% fölötti megbízhatósági szinten a Csaba gyöngye fajtához viszonyítva alul (piros) vagy felül (zöld) expresszált gének pozícióját mutatja.

Köszönetnyilvánítás

A KTIA_AIK_12-1-2013-0001 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Nemzetközi együttműködéssel megvalósuló alap és ipari kutatási valamint Infokommunikációs technológiai fejlesztési projektek támogatása a Közép-magyarországi régióban pályázati program finanszírozásában, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (1783-3/2018/FEKUTSTRAT) támogatta, a Szent István Egyetem növénynemesítés, növényvédelemmel kapcsolatos kutatások tématerületi programja keretében valósult meg.

Irodalomjegyzék

1. Anders, S. - Pyl, P.T. - Huber, W. (2014): HTSeq A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. p.
2. Atak, A. (2016): Determination of Downy Mildew and Powdery Mildew Resistance of Some Grape Cultivars. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 11-17. p.
3. Buonassisi, D. - Colombo, M. - Migliaro, D. - Dolzani, C. - Peressotti, E. - Mizzotti, C. - Velasco, R. - Masiero, S. - Perazzolli, M. - Vezzulli, S. (2017): Breeding for grapevine downy mildew resistance: a review of omics approaches. *Euphytica*, 213(5), 103.
4. Bolger, A. M. - Lohse, M. - Usadel, B. (2014): Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-20. p.
5. Chen, Y. - Mccarthy, D. - Robinson, M. - Smyth, G.K. (2015): edgeR : differential expression analysis of digital gene expression data User 's Guide.
6. Dalbó, M. A - Weeden, N. F. - Reisch, B. I. (2000): QTL analysis of disease resistance in interspecific hybrid grapes. VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding. *ISHS Acta Horticulturae*, 528, 215-219. p.
7. Dalbó, M. A - Ye, G.N - Weeden, N.F. - Wilcox, W.F. - Reisch, B.I. (2001): Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(1), 83–89. p.
8. Dula, B. - Lázár, J. – Kölber, M. (2016): A szőlő növényvédelme II: betegségek. *Növényvédelem* 77 (52), 221-262. p.
9. Gambino, G. - Perrone, I. - Gribaudo, I. (2008): A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520-5. p.
10. Hausmann, L. - Rex, F. - Töpfer, R. (2016): Evaluation and genetic analysis of grapevine black rot resistances. X. International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology. *ISHS Acta Horticulturae* 1188, 285-290 p.
11. Jaillon, O. - Aury, J.-M. - Noel, B. - Policriti, A. - Clepet, C. - Casagrande, A. et al., (2007): The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449, 463–467. p.
12. Jiao, Y. – Xu, W. - Duan, D. - Wang, Y. - Nick, P. (2016): A stilbene synthase allele from a Chinese wild grapevine confers resistance to powdery mildew by recruiting salicylic acid signalling for efficient defence. *Journal of Experimental Botany*, 67(19), 5841–5856. p.
13. Kiss, E. - Tóth-Lencsés, K. - Szóke, A. - Kerekes, A. - Veres, A. - Roznik, D. - Kozma, P. (2017): Origin of “Csillám”, a promising source for black rot resistance. *Vitis*, 54, 53–54. p.
14. Li, H. - Durbin, R. (2009): Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754–1760. p.
15. Mikulás, J. - Tomcsányi, E. (1999): Megjelent hazánkban is a feketerothadás. *Kertészet és Szőlészet*, 48, 11–12. p.

- 
16. Rex, F. - Fechter, I. - Hausmann, L. - Töpfer, R. (2014): QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock 'Börner' (*V. riparia* Gm183 × *V. cinerea* Arnold). *Theoretical and Applied Genetics*, 127(7), 1667–77. p.
17. Trapnell, C. - Roberts, A. - Goff, L. - Pertea, G. - Kim, D. - Kelley, D. R. - Pimentel, H. - Salzberg, S. L. - Rinn, J. L. - Pachter, L. (2012): Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7, 562–78. p.