



Illustrasjon generert med DALL-E 3, en KI-modell utviklet av OpenAI.

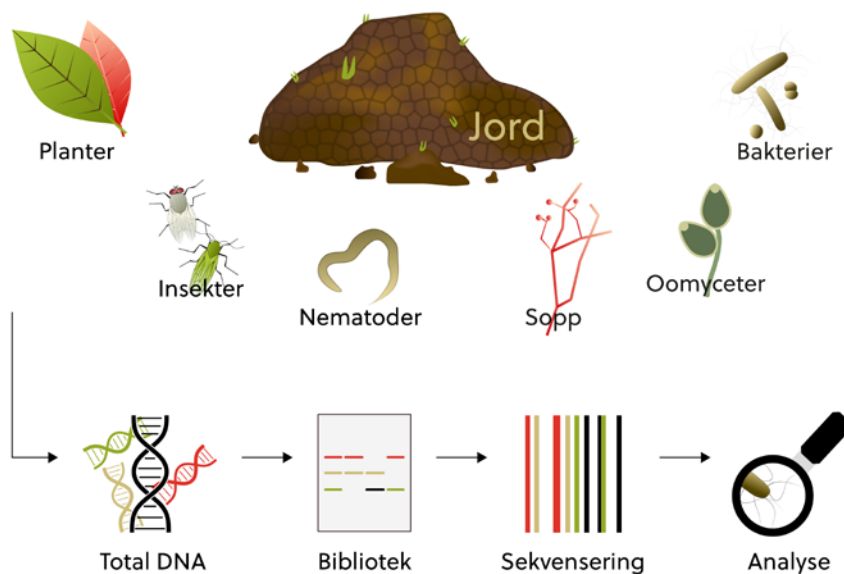
Nye molekylære verktøy for bedre plantehelse

Kombinasjonen av raskere, billigere DNA-sekvenseringsteknologier og avanserte analysemetoder har gjort høykapasitetssekvensering til et svært attraktivt verktøy med flere anvendelsesområder innen plantehelse.

I løpet av de siste 20 årene har vi sett en stadig forbedring i metoder for DNA-sekvensering, dvs. metoder for å bestemme rekkefølgen av baser i en DNA-tråd, samtidig som kostnadene har gått ned (Uhlen & Quake, 2023). En sekvenseringsmaskin kan i dag produsere omtrent 1 million ganger mer data per døgn enn for 20 år siden. I tillegg er det kommet metoder som kan sekvensere mye lengre DNA-tråder enn tidligere. Dette forbedrer kvaliteten og er spesielt nyttig for å skille mellom veldig nærstående arter. Det har også vært en akselererende utvikling i programvare for prosessering av sekvensdata. Det innebærer at denne teknologien kan brukes til mange formål.

SEKVENSERING AV MILJØ-DNA

Gjennom flere strategiske instituttsatsinger har NIBIO de siste årene etablert høykapasitetssekvensering for identifisering av forskjellige organismer basert på miljø-DNA. Tradisjonelt må man isolere organismer, være seg bakterier, sopp eller insekter fra jord, vann eller planteprøver, før man kan identifisere de, enten gjennom morfologiske eller molekylære undersøkelser. Ved bruk av høykapasitetssekvensering kan man i prinsippet isolere alt DNA direkte fra en miljøprøve, og få en oversikt over alle organismer som er i prøven. Dette kalles metastrekoding og man kan tilpasse analyseoppsettet til spesifikke organismegrupper ettersom hva som er



Figur 1. Diagram som viser trinnene for sekvensering av miljø-DNA, for deteksjon av forskjellige grupper planteskadegjørere i en prøve. Illustrasjon Simeon Rossmann.

relevant (Figur 1). I insektfeller er det for eksempel lite interessant å analysere for annet enn insekter, mens i jordprøver kan det være aktuelt å analysere for alle de forskjellige grupper av planteskadegjørere, dvs. bakterier, oomyceter, sopp, nematoder og insekter i tillegg til ugras. Med denne metoden fant vi så mye som 1800 forskjellige oomyceter i 64 jordprøver fra importerte planter, mens tradisjonelle metoder førte til identifisering av knapt 20 forskjellige arter fra de samme prøvene (Rossmann et al., 2021). Metoden kan også bli et nyttig verktøy i forbindelse med jordflytting og håndtering av andre masser ved anleggsvirksomhet, fordi man kan unngå forflytting av eventuelt smittede masser og hindre kostbar deponering av dyrkbar jord.

Ved hjelp av metastrekkoding kan man også få oversikt over mikroorganismene i eller på en plante, det såkalte fytobiomet (Sohrabi et al., 2023). Dette har NIBIO for eksempel studert i salat i sammenheng med både plantepatogener og humanpatogener, samt i hvetekorn der man fant sammenheng mellom enkelte organismer assosiert med redusert glutenkvalitet (Dees et al., 2015; Aamot et al., 2020). Med kunnskap om sammensetningen i fytobiomet, spesielt nytteorganismer og plantepatogener, kan man potensielt manipulere mikrobefundet til fordel for plante og miljø, for eksempel bedre plantas næringsopptak, vekst og immunforsvar. Dette betyr at kunnskap om fytobiomet vil kunne bidra til ett mer bærekraftig jordbruk med redusert og selektivt bruk av plantevernmidler.

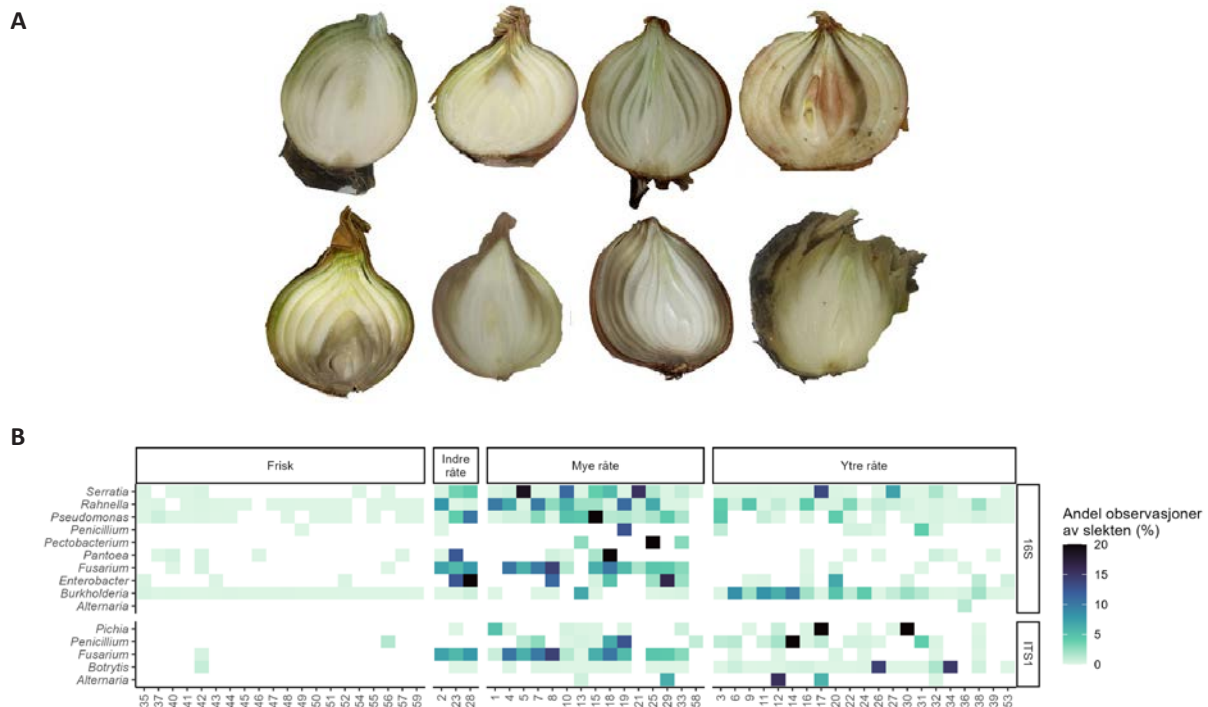
IDENTIFIKASJON AV UKJENT SYKDOMSORGANISME

Metastrekkoding kan også være nyttig i de tilfeller man ikke klarer å isolere en skadegjører fra plantemateriale

med sykdom. Det kan skyldes at man mangler kunnskap om mulige skadegjørere basert på symptombilde, eller at skaden skyldes flere organismer som påvirker hverandre. I slike tilfeller vil høykapasitetssekvensering gi informasjon om alle organismer som er til stede i prøven. Siden analysene vil gi hundrevis av arter vil det naturlig nok være viktig å sammenligne med friskt materiale for å finne skadegjørere(e). Denne metoden har vi brukt til for eksempel å identifisere bakterier og sopp i plommetrær med sykdomssymptom og i et stort forsøk med løk dyrket og lagret forskjellige steder i landet for å undersøke råteproblemer (Figur 2). Metoden kan også tenkes brukt for å effektivisere eller utvide testing av plantemateriale som skal sertifiseres eller materiale som skal importeres.

MÅLRETTET EFFEKTIV GENSEKVENSERING

I noen tilfeller kan det være interessant å få detaljert informasjon om spesifikke gener i en samling av planter eller skadegjørere. Gener som gir motstandsdyktighet mot sykdommer, er spesielt interessant i foredlingsammenheng. I prosjektet DivGene har vi nylig sekvensert 12 forskjellige gener som er kjent for å gi resistens mot tørråte og potetvirus Y. Vi har analysert mer enn 300 forskjellige sorter eller linjer av potet fra sortssamlinger i Norge og Polen, og sett på tilstedeværelse og variasjon i disse genene i sortsmateriale (Paluchowska et al., 2024). For tørråten har vi sekvensert et utvalg på 60 såkalte effektorgener, som regnes som viktige for infeksjon, i en samling av nesten 400 tørråteisolater fra Norge og Polen (Rossmann et al., 2024) (Figur 3). Man kan raskt og effektivt kopiere opp og sekvensere alle de 60 genene fra hvert av isolatene, med andre ord rundt 24.000 gen-sekvenser. Mange av effektorgenene er avgjørende for om potetplanta klarer å stoppe infeksjon, altså om



Figur 2. Eksempel fra undersøkelse av løkråte ved hjelp av høykapasitetssekvensering. **A)** Råte i løk kan være både innvendig og på utsiden. Ofte er flere slekter av sykdomsorganismer til stede og det er ikke lett å finne ut hvilke skadegjørere som bidrar til råten. **B)** Med høykapasitetssekvensering kan vi undersøke tilstedeværelse av mange bakterieslekter og sopp, i mange prøver samtidig. Diagrammet viser utvalgte slekter av bakterier og sopp som kan forårsake sykdom i løk, og hvilken prøver som inneholder mest av disse (mørkest farge). Det er tydelige forskjeller i fordelingen, noen slekter observeres hyppigere når råten er innvendig, andre når råten er utvendig, og mange prøver inneholder flere sykdomsslekter. Foto A: Monica Skogen.

den kjenner igjen tørrråten som en inntrenger eller ikke. Det er vist at små variasjoner i disse genene kan utgjøre forskjell på vellykket infeksjon eller ikke, og det er derfor viktig å ha en oversikt over hva slags egenskaper som finnes i tørrråtepopulasjonen. I andre skadegjørere kan det være andre gener som er viktig å ha kunnskap om og i hvert tilfelle vil metoden derfor kreve en viss tilpasning og utprøving. Selv om sekvensering har blitt mye billigere og mer effektivt er metoden utviklet slik at det må et betydelig antall prøver til for at pris per prøve ikke skal bli veldig høy.

AUTOMATISERT DATAPROSESSERING

Når mye data genereres raskt er det viktig å ha gode rutiner for både å behandle og lagre dataene. Vi bruker det åpne og fritt tilgjengelige programmeringspråket R for automatisk prosessering av rådataene fra sekvenseringsmaskinene til enkelt håndterbare resultater. Prosesseringen inkluderer bortfiltrering av data som ikke er av god nok kvalitet samt optelling og gruppering av mange millioner enkeltobservasjoner av sekvenser. Etter denne reduksjonen av rådata til en enkel liste av unike sekvenser og en tabell som inneholder antall observasjoner for disse, kan dataene analyseres på ulike måter. Forskjellene mellom sekvensene i sekvenslisten fra friskt og sykt

plantemateriale brukes for eksempel til å identifisere mulige sykdomsorganismer i en prøve, ved hjelp av internasjonale offentlige databaser.

KONKLUSJON

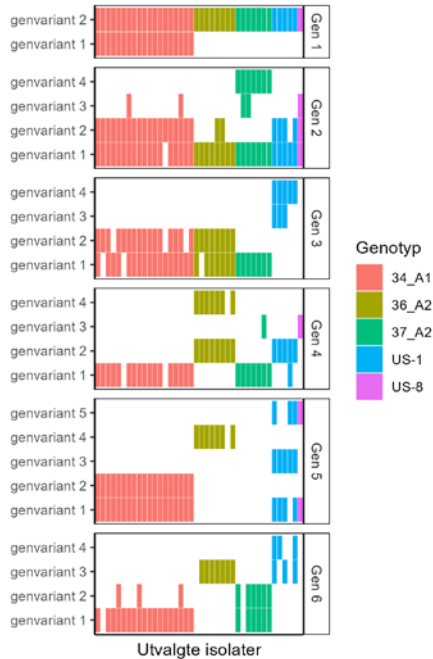
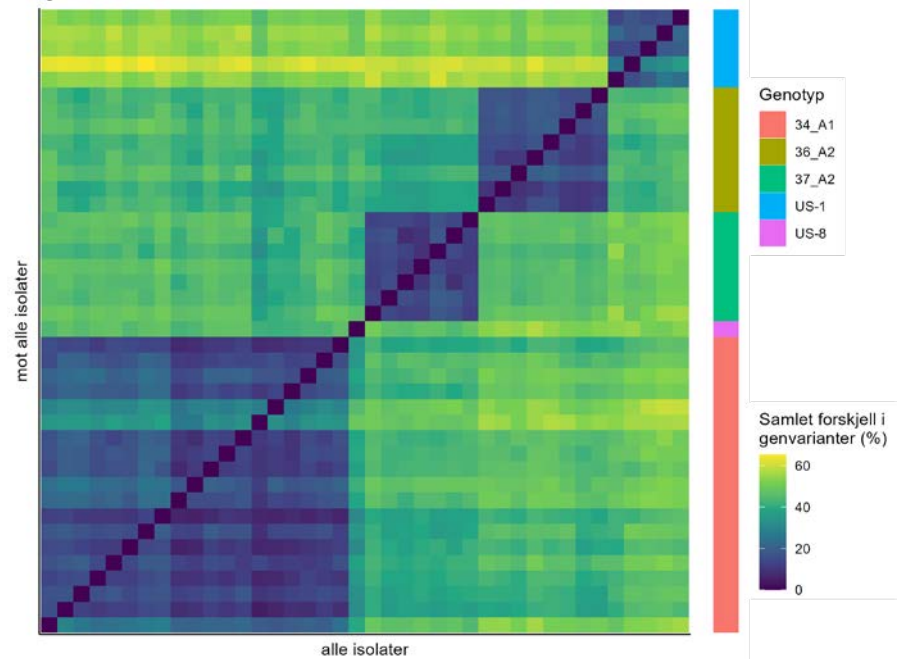
Selv om høykapasitetssekvenseringsmetoder er under stadig utvikling ser vi allerede nå at dette er et kraftig verktøyssett som kan brukes til å forbedre plantehelse gjennom identifisering og multideteksjon av skadegjørere og nytteorganismer, foredling av sykdomsresistente sorter, og økt forståelse av plante-mikrobe-interaksjoner. Utfordringer knyttet til kostnader, datastyring og teknisk ekspertise må adresseres for å realisere potensialet fullt ut.

REFERANSER

- Dees, M. W., Lysøe, E., Nordskog, B., & Brurberg, M. B. (2015). Bacterial communities associated with surfaces of leafy greens: shift in composition and decrease in richness over time. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1530-1539. <https://doi.org/10.1128/aem.03470-14>
- Paluchowska, P., Rossmann, S. L., Lysøe, E., Janiszewska, M., Michalak, K., Giglou, R. H., Giglou, M.T., Brurberg, M. B., Śliwka, J., & Yin, Z. (2024). Diversity of the *Rysto* gene conferring resistance to potato virus Y in wild relatives of potato. *BMC Plant Biology*, 24(1), 375. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05089-2>

A

Figur 3. Eksempel på målrettet sekvensering av effektorgener fra potettørråte. Metoden kan avdekke alle varianter av flere forskjellige gener i mange biologiske prøver samtidig. **A)** Potet infisert med tørråte – hvitt belegg er mycel og sporangier. **B)** Et utvalg av seks gener i ca. 40 isolater av tørråte-organismen er vist. For hvert gen vises de 2-5 genvariantene som ble funnet. Fargen indikerer klonlinjen isolatene hører til og viser at de forskjellige klonlinjene har forskjellige genvarianter. **C)** Når genvarianter fra alle 70 gener kombineres, kan den samlede forskjellen mellom alle isolater beregnes. Klonlinjene skiller seg tydelig fra hverandre som grupper med likere sammensetning av sykdomsgenvarianter. Foto A: May Bente Brurberg.

B**C**

Rossmann, S., Lysøe, E., Skogen, M., Talgø, V., & Brurberg, M. B. (2021). DNA Metabarcoding reveals broad presence of plant pathogenic oomycetes in soil from internationally traded plants. *Frontiers in Microbiology*, 12, 637068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637068>

Rossmann, S. L., Lysøe, E., Skogen, M., Eikemo, H., Janiszewska, M., Ludwiczewska, M., Sobkowiak, S., Śliwka, J., & Brurberg, M. B. (2024). Effector diversity within *Phytophthora infestans* SSR-genotypes. *Manus in prep.*

Sohrabi, R., Paasch, B. C., Liber, J. A., & He, S. Y. (2023). Phyllosphere microbiome. *Annual Review of Plant Biology*, 74, 539-568. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-032704>

Uhlen, M., & Quake, S. R. (2023). Sequential sequencing by synthesis and the next-generation sequencing revolution. *Trends in Biotechnology*, 41(12), 1565-1572. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.06.007>

Aamot, H. U., Lysøe, E., Koga, S., Nielsen, K. A. G., Böcker, U., Brodal, G., Dill-Macky, R., Uhlen, A. K., & Hofgaard, I. S. (2020). *Microdochium majus* and other fungal pathogens associated with reduced gluten quality in wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 331, 108712. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108712>

FINANSIERING

Metoder har blitt bygget opp primært gjennom NIBIOs strategiske instituttsatsninger Bioimmigrants (2018-2022), Fytobiom (2017-2022), Resistopp (2017-2021) og Pathfoodchain (2012-2018) finansiert av Norges Forskningsråd (prosjektnummer 342631/L10), og er videreutviklet i prosjektet DivGene UMO-2019/34/H/NZ9/00559 finansiert gjennom EØS-midlene. Et av de nevnte eksempler er fra prosjektet 'Mer norsk løk' som er finansiert gjennom Grofondet og Forskningsmidlene for jordbruk og matindustri (FFL/JA).

FORFATTERE:

May Bente Brurberg^{1,2}, Simeon Lim Rossmann^{1,2}, Erik Lysøe¹, Monica Skogen¹, Carl Gunnar Fossdal¹

¹NIBIO,

²Norges miljø- og biovitenskapelige universitet - NMBU