



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**KÖZELROKON LISZTHARMATGOMBÁK ELKÜLÖNÍTÉSE
GAZDANÖVÉNY-SPECIALIZÁCIÓJUK TÜKRÉBEN**

Doktori értekezés tézisei

Jankovics Tünde

Gödöllő

2008

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola
tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti
vezetője: Prof. Dr. Virányi Ferenc
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Növényvédelmi Intézet

témavezető: Dr. Kiss Levente
tudományos osztályvezető
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete,
Növénykórtani Osztály

A Doktori Iskola vezetőjének
jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŪZOTT CÉLOK

A lizstharomatgombák fajszintű azonosítása és elkülönítése hagyományosan a gazdanövény, valamint a fénymikroszkóppal is tanulmányozható morfológiai tulajdonságok, elsősorban az ivaros termőtestek morfológiai jellemzői alapján történik. A kizárólag ivartalan fejlődési alakot (anamorfot) képző fajok azonosítása a hagyományos módszerekkel azonban sok esetben nehézségekbe ütközik. Az újonnan kialakult lizstharomatjárványok, és különösen azok, amelyek új földrajzi régiókban vagy új gazdanövényeken lépnek fel, sok esetben csak ivartalanul szaporodó lizstharomatgombákkal hozhatók összefüggésbe. A kórokozók pontos meghatározása, valamint eredetük és egyéb tulajdonságaik vizsgálata ezekben az esetekben különösen nehéz lehet.

A legújabb morfológiai és filogenetikai kutatások rámutattak arra, hogy a lizstharomatgombák valódi rokonsági viszonyait nem az ivaros termőtestek, hanem az ivartalan fejlődési alak morfológiai tulajdonságai tükrözik. Ez a felismerés egyrészt megváltoztatta a lizstharomatgombák rendszerezési elveit, másrészt jelentős mértékben módosította a törzsfajlásukkal kapcsolatos elképzeléseket. Ezen túlmenően a korszerű munkák egyértelművé tették azt, hogy egyes, morfológiai alapon elkülönített, széles gazdanövénykörrel rendelkező lizstharomatgombafajok valójában különböző gazdanövényekre specializálódott leszármazási vonalaktól állnak, vagyis gyűjtőfajként foghatók fel. A lizstharomatgombákkal kapcsolatos filogenetikai elemzések többsége egyetlen DNS-szakaszra, a riboszomális DNS ún. ITS (*Internal Transcribed Spacer*) régiójának bázissorrendjére épül. A fajok elkülönítése olykor, még az ITS-szekvenciák ismeretében is nehézségekbe ütközik, különösen a közeli filogenetikai kapcsolatban levő, morfológiai tulajdonságaik alapján megkülönböztethetetlen lizstharomatgombák esetében, melyek ITS-szekvenciái közel azonosak. A gazdanövény-specializáció tanulmányozása és a filogenetikai kapcsolatok más genomi régiókra is kiterjedő molekuláris vizsgálata ugyanakkor számos kérdésre választ adhat, és jelentősen hozzájárulhat a lizstharomatgombák pontosabb azonosításához.

A lizstharomatgombák elleni környezetbarát növényvédelem legfontosabb eszköze a lizstharomatfertőzésekkel szemben rezisztens növényfajták előállításának és

felhasználása. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a kórokozók populációiban viszonylag gyorsan, akár egy-két év alatt, felszaporodhatnak a rezisztenciát letörni képes változatok (rasszok). Ezek a rasszok képesek rövid idő alatt akár egész kontinensekre kiterjedő járványokat is okozni a légáramok útján nagy távolságokra terjedni képes lisztharmatgombák esetében. Mindez rámutat arra, hogy a lisztharmatgombák fajainak pontos azonosítása, populációik genetikai változékonyságának, valamint populációik szerkezetének ismerete elengedhetetlen egyrészt a rezisztencianemesítés, másrészt pedig a kórokozók eredetének, lehetséges inokulum-forrásainak feltárása szempontjából.

Munkánk során újonnan felbukkant, egymással közeli filogenetikai rokonságban álló lisztharmatgombákat tanulmányoztunk azok genetikai változékonyságának és gazdanövénykörének megismerése, illetve a fajok elkülönítése érdekében. A morfológiai- és molekuláris genetikai vizsgálatokat a gazdanövénykör tanulmányozásával kiegészítve komplex megközelítést alkalmaztunk a lisztharmatgombafajok elkülönítésében. Részletesen tanulmányoztuk továbbá egy nemrég leírt, paradicsomon vilászerte járványokat okozó lisztharmatgomba-anamorf, az *Oidium neolycopersici* genetikai változékonyságát és gazdanövénykörét. Az *O. neolycopersici* patogenitására és virulenciájára vonatkozó eddigi ismereteink ugyanis arra utalnak, hogy e gombafajon belül jelentős genetikai változékonyságról lehet szó, azt azonban eddig molekuláris eszközökkel alig vizsgálták, a fajon belüli esetleges rasszok elkülönítése pedig nem történt meg. Az *O. neolycopersici* gazdanövénykörével kapcsolatban ellentmondásos irodalmi adatok állnak rendelkezésünkre. Egyes szerzők szerint a kórokozó mindössze néhány, a *Solanaceae*-családba tartozó növényfajt képes megfertőzni, míg mások széles gazdanövénykörrel rendelkező gombafajként tartják számon. Ezenkívül néhány általunk megfigyelt, vérehulló fecskéfűvön (*Chelidonium majus*on), egy varjúháj-fajon (*Sedum alboroseum*on), galambszínű ördögsemen (*Scabiosa columbarián*) és golgotavirágon (*Passiflora caeruleán*) újonnan fellépett lisztharmatfertőzés kórokozói is olyan lisztharmatgomba-anamorfok, amelyek morfológiai tulajdonságaik alapján nem különböztethetők meg az *O. neolycopersic*től, emellett ITS-szekvenciáik is több mint 99%-ban azonosak az *O. neolycopersici* eddig meghatározott ITS-szekvenciáival. Így felmerült annak lehetősége, hogy a paradicsomot és egyéb, különböző növénycsaládokba tartozó növényfajokat esetleg ugyanaz a nemrég felbukkant, széles gazdanövénykörrel rendelkező lisztharmatgomba-anamorf fertőzi.

Munkánk során a fenti céloknak megfelelően az alábbi részkitűzéseket fogalmazzuk meg:

1. Újonnan felbukkant lisztharmatfertőzések kórokozójának pontos azonosítása Magyarországon és más országokban.
2. A paradicsomlisztharmat-járványokat világszerte kiváltó *Oidium neolycopersici* genetikai változékonyságának genom-szintű vizsgálata AFLP- (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) analízissel.
3. Az *O. neolycopersici* és egyéb, vele közelrokon, különböző gazdanövényeken újonnan felbukkant lisztharmatgombák filogenetikai viszonyainak, gazdanövénykörének feltárása a fajok elkülönítése céljából.
4. Az *Oidium longipes*, egy alig ismert lisztharmatgombafaj morfológiai- és filogenetikai vizsgálata, valamint gazdanövénykörének tanulmányozása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Lisztharmatminták

Vizsgálatainkban egyrészt az általunk gyűjtött, különböző kontinensekről származó lisztharmatmintákat, másrészt autentikus, nemzetközi herbáriumi gyűjteményekből kölcsönzött herbáriumi anyagokat használtunk fel. Az újonnan begyűjtött és a vizsgálatok szempontjából jelentős mintákat nemzetközi herbáriumi gyűjteményekben helyeztük el.

Morfológiai vizsgálatok

A lisztharmatgombák morfológiai tulajdonságait fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A preparátumokat a vizsgált minta természetétől függően különféle módszerekkel készítettük elő. A friss mintákat leggyakrabban vizes preparátumban tanulmányoztuk, míg a herbáriumi minták vizsgálatakor rendszerint a lisztharmatos növénydarabkákat tejsavban forraltuk fel a kiszáradt gombastruktúrák rehidrálása érdekében. A lisztharmat-preparátumokat a legtöbb esetben laktofenolban oldott gyapotkéssel megfestve vizsgáltuk.

Gazdanövénykör-vizsgálatok

A keresztfertőzési kísérleteket és egyes lisztharmatgombák polifág jellegének vizsgálatát izolált körülmények között végeztük üvegházban, illetve növénynevelő kamrában elhelyezett átlátszó búrák alatt. A kísérletekben vizsgált növényeket (tesztnövényeket) izolált körülmények között neveltük fel, vagy a tünetmentes növényeket a kísérletek beállítása előtt néhány hétig izoláltan tartottuk a külső eredetű fertőzések elkerülése érdekében. Az egyes kísérletekben a vizsgált növényfajok egyike szolgált inokulumforrásként, amelyen korábbi fertőzés eredményeként frissen sporuláló lisztharmattelepek alakultak ki. Ugyanazon növényfaj fertőzésmentes egyedeit pozitív kontrollnövényekként használtuk fel. Minden egyes kísérletben 1-4 inokulumforrásként szolgáló növényt, a tesztnövényekből és a pozitív kontrollnövényekből pedig 2-4 egyedet helyeztünk a búrák alá szorosan egymáshoz közel. A mesterséges fertőzéseket úgy végeztük, hogy az inokulumforrás lisztharmatos leveleit hozzáértettük a tesztnövények és a pozitív kontrollnövények leveleihez. A kísérletben szereplő összes növényt 3 hétig izoláltan tartottuk. Negatív kontrollként mindegyik növényfaj 2-3 fertőzésmentes egyedét egy másik búra alá helyeztük, és a mesterségesen fertőzött növényekkel azonos körülmények között tartottuk. A kísérletet minden vizsgált lisztharmatgombával legalább 2-5 alkalommal megismételtük üvegházban és növénynevelő kamrában 2005 és 2006 nyarán és őszén. A vizsgált növényfajok különböző lisztharmatgombákkal szembeni fogékonyságát 3 hét elteltével vizuálisan értékeltük. A tesztnövényeken fellépett fertőzések esetén a kórokozó pontos azonosítása érdekében egyrészt meghatároztuk az rDNS ITS-régiójának bázissorrendjét, másrészt inokulumként használtuk fel az eredeti gazdanövényének visszafertőzésére.

DNS-kivonás

A teljes genomi DNS kivonását a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA) felhasználásával végeztük a gyártó cég által megadott utasítások szerint. A minták előkészítése a későbbiekben alkalmazott molekuláris vizsgálati módszerektől valamint a minták természetétől függően többféle módon történt. A teljes genomi DNS-t mind az általunk gyűjtött, mind pedig a herbáriumokból kölcsönzött lisztharmatgomba-minták esetében azok ivartalan alakjának micéliumából vontuk ki. Egyes minták esetében a micéliumot steril penge segítségével távolítottuk el és gyűjtöttük össze a levél felületéről, más esetekben pedig a fertőzött levelekből micéliummal borított levéldarabkákat vágunk ki a DNS kinyerése céljából. A friss, nedvdús mintákat fagyasztva szárítottuk a DNS izolálása előtt.

Az AFLP-analízis érdekében a paradicsomon és egyéb növényfajokon frissen sporuláló lisztharmattelepekről steril ecset segítségével konídiumokat gyűjtöttünk steril desztillált vizet tartalmazó eppendorf-csőbe. Az így kapott konídium-szuszpenziót centrifugálással üleptítettük, majd a felülülő leöntése után a konídiumokat fagyasztva szárítottuk. A gomba-DNS növényi DNS általi szennyeződésének elkerülése érdekében a konídium-szuszpenziót az üleptítés előtt fénymikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá. A növényi szűrőket tartalmazó mintákat kizártuk a további vizsgálatokból. Az *O. neolycopersici* Franciaországban gyűjtött izolátumainak felszaporítása *Lagenaria leucantha* (Minibottle) sziklevelén Avignonban az INRA laboratóriumában történt. A lisztharmatgombákon kívül azok gazdanövényeiből is DNS-t vontunk ki annak érdekében, hogy a növényi DNS által szennyezett lisztharmat-mintákat az AFLP-mintázatuk alapján is azonosítani tudjuk, és kizárhassuk azokat az AFLP-elemzésből. Ennek érdekében lisztharmattól mentes levelekből steril pengével kivágott levéldarabkákat használtunk fel DNS-kivonáshoz. A levéldarabkákat fagyasztva szárítottuk, majd belőlük a lisztharmat-minták esetében alkalmazott módon DNS-t izoláltunk.

Az rDNS ITS-régiójának felszaporítása polimeráz-lánreakcióval

Az rDNS ITS-régióját a vizsgált lisztharmatgombák teljes genomi DNS-éből az ITS1-F/ITS4 gomba-specifikus láncindító oligonukleotid-párokkal (primer-párokkal) valamint az univerzális ITS1/ITS4 primer-párokkal szaporítottuk fel. Attól függően, hogy a polimeráz-lánreakció (PCR) során kapott termékeket közvetlen szekvencia-meghatározásra, vagy klónozást követő szekvencia-meghatározásra használtuk-e fel, kétféle polimeráz enzimet, *Taq*-polimerázt vagy *pfu*-polimerázt alkalmaztunk. A PCR-összetevők mennyisége és a PCR-körülmények a különböző vizsgálatokban csak kismértékben tértek el egymástól, ezért itt csak a két leggyakrabban alkalmazott reakciótypust ismertetjük.

A közvetlen szekvencia-meghatározás érdekében mintánként két PCR-t végeztünk 50-50 µl végtérfogatú reakcióelegyben, amelynek összetevői a következők voltak: 5 µl teljes genomi DNS, 5 µl 10-szeres *Taq*-puffer (Fermentas), 3 µl 25 mM-os MgCl₂ (Fermentas), 1,25 µl 10 mM-os dNTP (Fermentas), 1 µl 50 µM-os ITS1-F primer (Sigma), 1 µl 50 µM-os ITS4 primer (Sigma), 2 egység *Taq*-polimeráz (Fermentas). Az amplifikációt az alábbi program szerint végeztük: 5 perc kezdeti

denaturálás 95°C-on, majd 35 reakcióciklusban 45 mp denaturálás 95°C-on, 30 mp primer-kötődés 55°C-on és 80 mp elongáció 72°C-on, végül 10 perc elongáció 72°C-on.

Az ITS-szekvenciák klónozását megelőző PCR-t 50 µl végtérfogatú reakcióelegyben végeztük, amelynek összetevői a következők voltak: 5 µl teljes genomi DNS, 5 µl 10-szeres MgSO₄-tal kiegészített *pfu*-puffer (Fermentas), 1,25 µl 10 mM-os dNTP (Fermentas), 1 µl 50 µM-os ITS1-F primer (Sigma), 1 µl 50 µM-os ITS4 primer (Sigma), 2,5 egység *pfu*-polimeráz (Fermentas). A PCR körülményei a következők voltak: 5 perc kezdeti denaturálás 95°C-on, majd 35 reakcióciklusban ciklusonként 45 mp denaturálás 95°C-on, 45 mp primer-kötődés 55°C-on és 2 perc elongáció 72°C-on, végül 10 perc elongáció 72°C-on.

A kapott PCR-termékeket PCR M Clean Up System (Viogene) kit segítségével megtisztítottuk a gyártó cég által megadott utasítások szerint.

Az rDNS ITS-régiójának felszaporítása klónozással

A *pfu*-polimerázzal amplifikált PCR-termékek 3'-végéhez dATP-t kapcsoltunk az ún. *A-tailing* reakcióban. A reakciót 10 µl végtérfogatú reakcióelegyben végeztük, amelynek összetevői a következők voltak: 1 µl PCR-termék, 1 µl *Taq*-puffer (Fermentas), 1,8 µl MgCl₂ (Fermentas), 1 µl 2 mM-os dATP (Fermentas), 1 egység *Taq*-polimeráz (Fermentas). Az elegyet 20 percig 72°C-on inkubáltuk, majd a termékeket PCR M Clean Up System (Viogene) kit felhasználásával tisztítottuk meg. Az ily módon előállított termékeket pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) vektorba ligáltuk a gyártó cég által megadott utasítások betartásával. A ligálási reakciókat 4°C-on 20 órán át inkubáltuk. A JM109 kompetens sejtek (Promega, Madison, WI) transzformálását a gyártó által megadott utasítások szerint végeztük. A transzformáns baktérium-telepeket fehér/kék szelekció alapján választottuk ki. A fehér baktérium-telepekből az ITS1-F/ITS4 primerpárral ún. *colony PCR*-t végeztünk. A reakció templátjaként az előzőleg 10 percig 98°C-on inkubált, majd centrifugálással ülepített baktérium-szuszpenzió felülúszójának 2 µl-ét használtuk fel. A 20 µl végtérfogatú reakcióelegy összetevői, azok mennyiségi arányai és a PCR körülményei megegyeztek a közvetlen szekvencia-meghatározás céljából végzett és korábban ismertetett reakcióival. Azokat a fehér baktérium-telepeket, amelyekben a *colony PCR* során a gomba-specifikus ITS-primerpárral agaróz gélben detektálható termék szaporodott fel, steril fogpiszkáló segítségével friss LB- (Luria-Bertani) táptalajra oltottuk át. A friss telepekből steril fogpiszkálóval vittük át a baktériumokat 3-3 ml LB-táplevesbe, majd 16 órán át 37°C-on inkubáltuk 225 ford./perc sebességű rázatás mellett. A friss baktérium-szuszpenzióból a lisztharmatgombákból amplifikált ITS-szekvenciákat tartalmazó plazmidot Mini M Plasmid DNA Extraction System (Viogene) csomag felhasználásával tisztítottuk ki a cég által megadott utasítások szerint. A megtisztított plazmidot -20°C-on tároltuk az ITS-klónok szekvenciáinak meghatározásáig.

Az rDNS ITS-régiójának szekvencia-meghatározása

A vizsgált lisztharmatgombák PCR-módszerrel illetve klónozással felszaporított ITS-einek bázissorrend-meghatározásához a szekvenálási reakció 10 µl végtérfogatú elegyben történt, amelynek összetevői a következők voltak: 2,5 µl templát (tisztított PCR-termék vagy tisztított plazmid), 1 µl Big Dye Terminator 3.1 mix (Applied Biosystems), 1,5 µl puffer (Applied Biosystems), 1 µl 4 µM-os primer (M13/pUC forward vagy M13/pUC reverse (Fermentas) a plazmidból történő szekvenálás esetén, illetve ITS1-F vagy ITS4 primer (Sigma) a direkt szekvenálás esetén). A szekvenálási reakció körülményei a következők voltak: 1 perc kezdeti denaturálás 96°C-on, majd 35 reakcióciklusban ciklusonként 10 mp denaturálás 96°C-on, 5 mp primer-kötődés 50°C-on és 4 perc elongáció 60°C-on. A szekvenálási reakció termékének elektroforézisét a Szegedi Biológiai Központ Szekvenáló Laboratóriumában végezték. Minden minta esetében mindkét DNS-szálat megszekvenáltuk. A kapott szekvenciákat az elektroforegrammjaik alapján ellenőriztük, majd a GenBank (NCBI) adatbázisban deponáltuk.

Az AFLP-vizsgálatok és az AFLP-adatok elemzése

Az AFLP-vizsgálatokat Hollandiában, a Wageningeni Egyetem Növénynevelési Tanszékén végeztük. A teljes genomi DNS restrikciós endonukleázokkal való hasítása és az AFLP-adapterek restrikciós fragmentekhez való ligálása egy lépésben, az ún. restrikciós hasítási és ligálási reakcióban történt. A reakcióban az *EcoRI* és az *MseI* restrikciós endonukleázokat (New England Biolabs, Ipswich, MA) és az *EcoRI* és *MseI* adaptereket (Sigma Genosys) használtuk. A reakcióelegy végtérfogata 50 µl volt, amely az alábbi összetevőket tartalmazta: 5 egység *EcoRI* és 5 egység *MseI* restrikciós endonukleáz, 1 egység T4 DNS-ligáz (New England Biolabs), 5 pM *EcoRI* adapter, 50 pM *MseI* adapter, 1 µl 10 mM-os ATP, 10 µl 5x RL puffer (Life Technologies) és 80-240 ng teljes genomi DNS. A reakcióterméket 8-szorosára hígítva használtuk fel a preamplifikáció templátjaként.

A preamplifikációt az E01, az E02 és az M02, egyenként egy-egy szelektív nukleotidot tartalmazó ún. preszelektív primerek két kombinációjával (E01/M02 és E02/M02) végeztük. Az E01 és az E02 az *EcoRI*, az M02 pedig az *MseI* restrikciós endonukleáz hasítási helyére specifikus láncindító szekvenciák. A preamplifikáció 20 µl végtérfogatú reakcióelegyben történt, amely a következő összetevőket tartalmazta: 5 µl templát, 30 ng E01 vagy E02 preszelektív primer, 30 ng M02 preszelektív primer, 0,8 µl 5 mM-os dNTP, 0,4 egység Super-*Taq* DNS-polimeráz (Roche) és 2 µl 10-szeres Super-*Taq* puffer (Roche). A PCR 24 amplifikációs ciklusból állt, amelynek lépései a következők voltak: denaturáció 30 mp 94°C-on, primerkötődés 30 mp 56°C-on, elongáció 60 mp 72°C-on. A preamplifikáció során kapott termékek 5 µl-ét etídium-bromiddal kiegészített 1%-os agaróz gélben megfuttattuk, majd UV-fényben tettük láthatóvá. A 100-500 bázispár mérettartományban összefüggő sávval jellemezhető termékeket 30-szorosára hígítottuk, és templátként használtuk fel a szelektív amplifikációban.

A szelektív amplifikációt 19 különböző primerkombinációval végeztük, amelyeket egy előzetes, 40 primerkombinációra kiterjedő tesztelés során választottunk ki a kapott mintázatok

minősége alapján. Az *EcoRI* restrikciós endonukleáz hasítási helyére specifikus primerek infravörös festékkel (IRD700 vagy IRD800) jelöltek voltak és három szelektív nukleotidot tartalmaztak (Li-Cor Biosciences, Lincoln, USA), míg az *MseI* restrikciós endonukleáz hasítási helyére specifikus primerek (Sigma Genosys) jelöletlenek voltak és két szelektív nukleotidot tartalmaztak. A PCR 10 µl végtérfogatú reakcióelegyben történt, amely 5 µl templátot, 0,2 egység Super-*Taq* polimerázt, 1 µl 10-szeres Super puffert, 0,4 µl 5mM-os dNTP-t, 15 ng jelöletlen *MseI* primert és 0,5 pM IRD700 vagy IRD800 infravörös festékkel jelölt *EcoRI* primert tartalmazott. Az amplifikációt a következő, ún. *touch-down* programmal végeztük: az első ciklust (30 mp denaturáció 94°C-on, 30 mp primerkötődés 65°C-on, 60 mp elongáció 72°C-on) 11 másik ciklus követte, amelyekben ciklusonként 0,7°C-kal csökkent a primerkötődési hőmérséklet, majd 24 újabb ciklus következett (30 mp denaturáció 94°C-on, 30 mp primerkötődés 56°C-on, 60 mp elongáció 72°C-on). A PCR-termékhez 10 µl futtató puffert (98% formamid, 10 mM EDTA (pH8), 0,1% brómfenol-kék) adtunk, majd 5 percen át 95°C-on denaturáltuk és azonnal lehűtöttük jégen. Az AFLP-fragmensek elválasztását 8%-os denaturáló poliakrilamid gélben végeztük, a mintázatokot Li-Cor 4200 típusú szekvenáló készülék segítségével digitális formában rögzítettük.

Az AFLP-mintázatok megismételhetőségét a vizsgálat három különböző pontján ellenőriztük. A teljes folyamatot két liztharmat-mintából két-két független DNS-kivonás során előállított DNS-mintával ismételtük meg. A továbbiakban három másik DNS-mintával megisméltük a restrikciós hasítási és ligálási reakciót, a preszelektív és a szelektív amplifikációt. Végül, a szelektív amplifikációt megisméltük hat mintával a végső elemzésben felhasznált 19 primerkombináció felhasználásával. A kapott mintázatokot minden esetben vizuálisan hasonlítottuk össze.

A digitális kép formájában elmentett AFLP-mintázatokot az AFLP-Quantar programcsomag (Keygene, Hollandia) segítségével jelenítettük meg. A mintázatokot vizuálisan értékeltük oly módon, hogy minden monomorf (minden mintára jellemző) és polimorf (legalább egy mintára nem jellemző) AFLP-markert megvizsgáltunk az 50 és 500 bp közötti mérettartományban, azok meglétét vagy hiányát az egyes mintákban bináris adat formájában rögzítettük. A további adatelemzés érdekében két bináris adat-mátrixot állítottunk elő. Az egyik adat-mátrix tartalmazta az összes, a fent részletezett módon rögzített bináris adatot, míg a másik csak azokat az AFLP-markereket tartalmazta, amelyek legalább két mintára jellemzőek voltak. Az egyetlen mintára jellemző fragmenseket ily módon kizártuk az elemzésből. A két adathalmazból a TREECON programcsomag felhasználásával genetikai távolság mátrixot készítettünk, majd dendrogramokat állítottunk elő UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) és NJ (*Neighbor Joining*) módszerekkel. A dendrogramok elágazásainak megbízhatóságát ún. bootstrap-módszerrel ellenőriztük 1000 ismétlésben.

EREDMÉNYEK

Újonnan felépett lisztharmatfertőzések kórokozóinak azonosítása

Új adatokat közöltünk egyes lisztharmatgombák előfordulását illetően új gazdanövényeken illetve új földrajzi régiókban. A vérehulló fecskefűvön (*Chelidonium majuson*) egy *Oidium*-faj által okozott fertőzés világszerte az első adat lisztharmatfertőzésről ezen a gazdanövényen. Elsőként közöltük továbbá egy varjúhájfaj, a *Sedum alboroseum* lisztharmatfertőzését (kórokozó: *Oidium* sp.) Európából. Egy alig ismert lisztharmatgombafaj, az *O. longipes* előfordulását elsőként jeleztük Magyarországon, Ausztriában és Észak-Amerikában. Ezenkívül hozzájárultunk a galambszínű ördög szemén (*Scabiosa columbarián*) New Yorkban és a golgotavirágon (*Passiflora caeruleán*) Hollandiában fertőzéseket okozó *Oidium* spp., valamint a *P. caeruleáról* Bolíviában gyűjtött *Streptopodium* sp. azonosításához, amelyek szintén első előfordulási adatok ezekben az országokban.

Az *Oidium neolycopersici* és egyéb közelrokon lisztharmatgombák elkülönítése molekuláris- és gazdanövénykör-vizsgálatokkal

A paradicsomot fertőző *O. neolycopersici*, valamint a *S. alboroseumon*, *C. majuson*, *P. caeruleán* és *Aquilegia vulgarison* tüneteket okozó, morfológiai tulajdonságaik alapján megkülönböztethetetlen lisztharmatgombák molekuláris- (ITS-elemzés, AFLP-analízis) és gazdanövénykör-vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy esetükben egymástól elkülönült, különböző növénycsaládokba tartozó gazdanövényekre specializálódott, ugyanakkor egymással közeli rokonságban álló fajokról van szó. A különféle dísz- és vadon élő növényeken előforduló, újonnan felbukkant lisztharmatgomba-anamorfozok tehát valószínűleg nem szolgálnak inokulumként a paradicsom lisztharmatfertőzéséhez. Megállapítottuk, hogy az ITS-szekvenciákban található néhány nukleotidnyi különbségek háttérében valójában jelentős eltérések húzódnak meg a teljes genom szintjén, amelyek a kórokozók gazdanövénykörében is megmutatkoznak, ezért a paradicsomlisztharmat-járványok inokulum-forrásainak feltárása komplex megközelítést igényel.

Az *Oidium neolycopersici* genetikai változékonysága

Az *O. neolycopersici*, különböző földrajzi régiókból származó mintáinak AFLP-analízise alapján nagyfokú genetikai változékonyságot mutattunk ki, amelynek háttérében feltehetően a kórokozó rejtett ivaros szaporodása húzódhat meg, vagy esetleg egyéb mechanizmusok okozhatják a fajon belüli jelentős mértékű diverzitást. Az AFLP-mintázatok alapján nem találtunk földrajzi régiók szerinti elkülönülést az *O. neolycopersici* mintái között, amely feltehetően a kórokozó nagy távolságokra történő terjedésének következménye. Az izolátumok AFLP-mintázatában kimutatott különbségek nem tükrözték továbbá a korábbi munkákban kimutatott virulencia-különbségeket, ami arra utal, hogy az *O. neolycopersici*-izolátumok virulenciájában kimutatható eltérések csak kismértékű különbségekkel járhatnak együtt a teljes genom szintjén.

Eltérő ITS-szekvenciák kimutatása liztharmatgombákban

Liztharmatgombákban elsőként mutattunk ki eltérő, ún. paralóg szekvenciákat a riboszomális DNS ITS-régióját illetően a *C. majus*t fertőző *Oidium* sp. mintáiban. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy az ITS-szekvenciákban fellelhető egy-egy nukleotidnyi különbségeket kellő odafigyeléssel kell kezelnünk, különösen a közelrokon liztharmatgombák esetében. A *C. majus*t fertőző *Oidium* sp. paralóg szekvenciáiban kimutatott eltérések mértéke ugyanis hasonló az egyéb, különféle gazdanövényeket fertőző közelrokon liztharmatgombák ITS-szekvenciáiban kimutatott különbségekéhez, amelyekről azonban a gazdanövénykör-vizsgálatok és az AFLP-analízis alapján megállapítottuk, hogy elkülönült fajok.

Az *Oidium longipes* morfológiai, filogenetikai és gazdanövénykör-vizsgálata

A kevésbé ismert *O. longipes* kiterjedt vizsgálata alapján kimutattuk, hogy annak konídiumtartó-morfológiája sokkal változatosabb, mint ahogy az az eredeti fajleírásból és egyéb morfológiai jellemzésekből kitűnik. Gazdanövénykör-vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a petúnia liztharmatos betegségéért felelős *O. longipes* egyéb, a *Solanaceae*-családba tartozó növényfajokat, mint

például a dohányt, paradicsomot és a padlizsánt is megfertőzheti, esetleg járványok kiváltója lehet gazdasági szempontból jelentős termesztett növényfajokon is.

A *Pleochaeta indica* morfológiai és filogenetikai vizsgálata

Kimutattuk, hogy az Indiában ostorfát (*Celtis australis*) fertőző *Pleochaeta indica* morfológiai tulajdonságai alapján azonos a *Pleochaeta shiraiana* fajjal, vagyis a morfológiai alapon történt elkülönítése és új fajként való leírása megalapozatlan. A 28S rDNS és az ITS-régió bázissorrendjében mutatkozó jelentős különbségek alapján azonban a *P. indica* és a *P. shiraiana* elkülönült fajoknak tekinthetők. Megállapítottuk, hogy morfológiai alapokon mind az anamorf, mind pedig a teleomorf szintjén megkülönböztethetelen liztharmatgombák elkülönült kriptikus fajokat képviselhetnek.

Új tudományos eredmények

1. Új adatokat közöltünk egyes liztharmatgombák előfordulását illetően új gazdanövényeken illetve új földrajzi régiókban:

- világviszonylatban elsőként közöltük és jellemeztük egy *Oidium* sp. tulajdonságait, amely a vérehulló fecskefüvet (*Chelidonium majus*) fertőzi;
- Európában először közöltük és jellemeztük egy másik *Oidium* sp. tulajdonságait, amely egy dísznövényként termesztett varjúhájfajon, a *Sedum alboroseum* fordul elő;
- elsőként jeleztük Magyarországon, Ausztriában és Észak-Amerikában az *Oidium longipes* előfordulását;
- elsőként azonosítottunk egy Bolíviában gyűjtött *Streptopodium* sp.-t golgotavirágon (*Passiflora caerulea*);
- Hollandiában elsőként azonosítottunk és jellemeztünk egy *Oidium* sp.-t golgotavirágon (*P. caerulea*);
- elsőként jeleztük az Egyesült Államokbeli New York államban egy *Oidium* sp. előfordulását galamszínű ördögsemen (*Scabiosa columbaria*).

2. A paradicsomot fertőző *Oidium neolycopersici*, valamint a *S. alboroseumon*, *C. majuson*, *P. caeruleán* és *Aquilegia vulgarison* tüneteket okozó, morfológiai tulajdonságaik alapján megkülönböztethetetlen lisztharmatgombák molekuláris- (ITS-elemzés, AFLP-analízis) és gazdanövénykör-vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy esetükben egymástól elkülönült, különböző növénycsaládokba tartozó gazdanövényekre specializálódott, ugyanakkor egymással közeli rokonságban álló fajokról van szó. Kimutattuk, hogy a konzervatívnek tekinthető ITS-szekvenciákban mutatkozó néhány nukleotidnyi különbségek háttérében valójában jelentős eltérések húzódnak meg a teljes genom szintjén, amelyek a kórokozók gazdanövénykörében is megmutatkoznak.

3. Az *O. neolycopersici* különböző földrajzi régiókból származó mintáinak AFLP-analízise alapján nagyfokú genetikai változékonyságot mutattunk ki ebben a kórokozóban, amelynek háttérében feltehetően a kórokozó rejtett ivaros szaporodása húzódnak meg, vagy esetleg egyéb mechanizmusok okozhatják a fajon belüli jelentős mértékű diverzitást.

4. Lisztharmatgombákban elsőként mutattunk ki eltérő (ún. paralóg) szekvenciákat a riboszomális DNS ITS-régióját illetően a *C. majust* fertőző *Oidium* sp. mintáiban.

5. Az *O. longipes* esetében kimutattuk, hogy annak konídiumtartó-morfológiája az eredeti fajleíráshoz képest sokkal változatosabb.

6. Gazdanövénykör-vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az *O. longipes* a petúnián kívül egyéb, *Solanaceae*-családba tartozó növényfajokat, mint például a dohányt, paradicsomot és a padlizsánt is megfertőzheti, és ennek következtében járványok kiváltója lehet más, gazdasági szempontból jelentős termesztett növényfajokon is.

7. Kimutattuk, hogy az Indiában ostorfát (*Celtis australis*) fertőző *Pleochaeta indica* morfológiai tulajdonságai alapján azonos a *P. shiraiana* fajjal, vagyis a morfológiai alapon történt elkülönítése és új fajként való leírása megalapozatlan. Az rDNS ITS-régiójának bázissorrendjében mutatkozó jelentős különbségek alapján azonban a *P. indica* és a *P. shiraiana* elkülönült, kriptikus fajoknak tekinthetők.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

1. A paradicsomlisztharmat-járványok inokulum-forrásainak feltárása komplex megközelítést igényel.

A paradicsomot fertőző *Oidium neolycopersici*, valamint a *Sedum alboroseumon*, *Chelidonium majus*on, *Passiflora caerulea*n és *Aquilegia vulgaris*on tüneteket okozó, morfológiai tulajdonságaik alapján megkülönböztethetetlen lisztharmatgombák ITS- és AFLP-elemzése, valamint gazdanövénykör-vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy esetükben egymástól elkülönült, különböző növény családkba tartozó gazdanövényekre specializálódott, ugyanakkor egymással közeli rokonságban álló fajokról van szó. Ehhez a megállapításhoz csak a molekuláris és keresztfertőzési vizsgálatok együttes alkalmazása vezetett el, az egyes módszerek külön-külön történő alkalmazása nem lett volna elegendő ahhoz, hogy meggyőző módon bizonyítsuk ezt az állítást. A különféle dísz- és vadon élő növényeken előforduló, újonnan fellépett fertőzéseket okozó lisztharmatgomba-anamorfozok tehát valószínűleg nem szolgálnak a paradicsom lisztharmatfertőzésének inokulumforrásaként, azaz nem járulnak hozzá az elmúlt évtizedekben világszerte gondot okozó paradicsomlisztharmat-járványok kialakításához.

2. Az rDNS ITS-szekvenciákban feltárt egy-két nukleotidnyi különbség jelentős genom-szintű különbségekre utal egyes lisztharmatgombákban.

A pseudoidium-típusú lisztharmatgomba-anamorfozokkal kapcsolatos munkánk rámutat arra, hogy e lisztharmatgombák azonosítása és fajaik elkülönítése során egy, különféle vizsgálati módszereket magába foglaló, komplex megközelítést szükséges alkalmazni. A klasszikus, morfológiai tulajdonságokra és gazdanövényre alapozott azonosítási és fajelkülönítési módszert célszerű kiegészíteni összehasonlító gazdanövénykör vizsgálatokkal és molekuláris genetikai vizsgálatokkal is. A filogenetikai vizsgálatokat nem elegendő továbbá egyetlen DNS-szakasz, a lisztharmatgombák esetében elterjedt ITS-régió elemzésére alapozni, hanem egyéb genomi régiókra is ki kell terjeszteni a vizsgálatokat. Az AFLP-módszerrel kapott eredményeink a közelrokon pseudoidium-típusú

lisztharmatgombák esetében ugyanis azt mutatták, hogy az ITS-szekvenciákban található néhány nukleotidnyi különbségek háttérében valójában jelentős eltérések húzódnak meg a teljes genom szintjén, amelyek a kórokozók gazdanövénykörében is megmutatkoznak. A konzervatívnak tekintett ITS-szekvenciák, jóllehet alkalmasak a lisztharmatgombák általános filogenetikai viszonyainak megismerésére, az egymással közeli rokonságban álló lisztharmatgombák fajsztípusú elkülönítésében azonban korlátozott a felhasználhatóságuk.

3. *A morfológiai alapokon mind az anamorf, mind pedig a teleomorf szintjén megkülönböztethetelen lisztharmatgombák különböző kriptikus fajokat képviselhetnek.*

A pseudoidium-típusú lisztharmatgombák azonosítása során alkalmazott komplex megközelítésmód szükségességére hívja fel a figyelmet az ostorfát (*Celtis australis*) fertőző *Pleochaeta indica* esete is. A gomba mind az ivaros, mind pedig az ivartalan fejlődési alak morfológiai tulajdonságait tekintve megkülönböztethetetlen volt az elterjedtebb, és jól jellemzett *Pleochaeta shiraiana* fajtól. A morfológiai vizsgálatok alapján kimutatott azonosság ellenére az ITS-szekvenciákban jelentős különbségek mutatkoztak, amelyek alapján a *P. indica* és a *P. shiraiana* elkülönült lisztharmatgombafajoknak bizonyultak. Mindez arra utal, hogy a morfológiai tulajdonságokban megfigyelt azonosságok önmagukban olykor még abban az esetben sem elegendőek a fajok azonosításához, amikor az ivaros és az ivartalan fejlődési alakok is rendelkezésre állnak.

4. *Egy dísznövényfajon felbukkant lisztharmatgombafaj egyéb termesztett növényeket is veszélyeztethet.*

Az *Oidium longipes* gazdanövénykör-vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy a petúnián kívül egyéb, a *Solanaceae*-családba tartozó növényfajokon is okozhat tüneteket. Ez a kórokozó tehát forrása lehet más, termesztett és gazdaságilag jelentős növényfajokon kialakult lisztharmatfertőzéseknek. Mivel a petúniát és egyéb *Solanum*-fajokat több lisztharmatgombafaj fertőzi világszerte, az *O. longipes* esetében nem világos, hogy egy új kórokozóról van-e szó, vagy korábban

egyszerűen nem került a növénykórokozókat behatóan vizsgáló kutatók figyelmének központjába.

5. *Két anamorf alak is tartozhat ugyanahhoz a teleomorf nemzetséghez a lizstharmatgombák esetében.*

A *P. caeruleán* Bolíviában gyűjtött lizstharmatgomba-anamorf a morfológiai tulajdonságai alapján a *Streptopodium* ivartalan nemzetségbe tartozik. Eddigi ismerteink alapján a *Streptopodium*-anamorfok a *Pleochaeta* ivaros nemzetség ivartalan alakjai. A riboszomális DNS szekvenciáinak elemzése alapján azonban azt találtuk, hogy a vizsgált anamorf a *Phyllactinia* ivaros nemzetségbe tartozó lizstharmatgombákkal mutat közeli rokonságot. Eredményeink arra utalnak, hogy a *Streptopodium*-anamorfok két ivaros nemzetségnek, a *Pleochaeta*- és a *Phyllactinia*-nemzetségeknek is lehetnek az ivartalan alakjai. Ugyanakkor a *Phyllactinia*-nemzetségnek lehet *Streptopodium* és *Ovulariopsis* ivartalan alakja is.

6. *Eltérések lehetnek ugyanazon lizstharmat-minta ITS-szekvenciáiban.*

A *C. majust* fertőző *Oidium*-fajban kimutatott eltérések az ITS-szekvenciákban első igazolásai annak, hogy lizstharmatgombákban is léteznek különböző, ún. paralóg ITS-szekvenciák. Mindezek alapján hangsúlyoznunk kell az ITS-szekvenciák pontos, nukleotidonként történő ellenőrzésének szükségességét, különösen a közeli rokon fajok ITS-szekvenciáinak elemzése során, amelyek mindössze néhány nukleotidban térnek el egymástól, hasonlóképpen a *C. majust* fertőző lizstharmatgombában kimutatott paralóg szekvenciákhoz.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Angol nyelvű, teljes terjedelmű tudományos cikkek:

Jankovics, T., Bai, Y., Kovács, G. M., Bardin, M., Nicot, P. C., Toyoda, H., Matsuda, Y., Niks, R. E., Kiss, L. (2008): *Oidium neolycopersici*: intra-specific variability inferred from AFLP analysis and relationship with closely related powdery mildew fungi infecting various plant species. *Phytopathology* (in press).

Kiss, L., Jankovics, T., Kovács, G. M., Daughtrey, M. L. (2008): *Oidium longipes*, a new powdery mildew fungus on petunia in the USA: a potential threat to ornamental and vegetable solanaceous crops. *Plant Disease* (in press).

Kiss, L., Khosla, K., Jankovics, T., Niinomi, S., Braun, U., Takamatsu, S. (2006): A morphologically ill-founded powdery mildew species, *Pleochaeta indica*, is recognized as a phylogenetic species based on the analysis of the nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 110:1301-1308.

Angol nyelvű rövid közlemények:

Jankovics, T. (2007): First report of powdery mildew (*Oidium* sp.) on greater celandine (*Chelidonium majus*). *Plant Pathology*, 56:353.

Jankovics, T., Szentiványi, O. (2006): First report of powdery mildew on *Sedum alboroseum* in Europe. *Plant Pathology*, 55:297.

Magyar nyelvű tudományos közlemények

Jankovics, T., Kiss, L. (2007): Paradicsomlisztharmat: a kórokozó gazdanövényköre és genetikai változékonysága. *Növényvédelem*, 43:261-264.

Előadások, poszterek összefoglalói:

Jankovics, T., Bai, Y., Niks, R. E., Kovács, G. M., Kiss, L. (2007): A paradicsomot fertőző *Oidium neolycopersici* és egyéb közelrokon lisztharmatgombák genetikai változékonysága és gazdanövényköre. 53. *Növényvédelmi Tudományos Napok Összefoglalói*, 31. oldal.

Jankovics, T., Szentiványi, O. (2005): Újonnan fellépett lisztharmatfertőzések Magyarországon. 51. *Növényvédelmi Tudományos Napok Összefoglalói*, 92. oldal.

A dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemények

Angol nyelvű, teljes terjedelmű tudományos cikkek:

Szentiványi, O., Kiss, L., Russell, J. C., Kovács, G. M., Varga, K., Jankovics, T., Lesemann, S., Xu, X., Jeffries, P. (2005): *Ampelomyces* mycoparasites from apple powdery mildew identified as a distinct group based on single-stranded conformation polymorphism analysis of the rDNA ITS region. *Mycological Research*, 109: 429-438.

Előadások, poszterek összefoglalói:

Jankovics, T., Kiss, L. (2005). *In vitro* promycelium formation of germinating powdery mildew conidia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 52: 261-262.

Jankovics T., Kiss L. (2003): Almalisztharmaton hiperparazita *Ampelomyces* spp. vizsgálata. 49. *Növényvédelmi Tudományos Napok Összefoglalói*, 100. oldal.

