



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**INTRA- ÉS INTERSPECIFIKUS
KÖLCSÖNHATÁSOK A *PHYTOPHTHORA*-
NEMZETSÉGBEN**

Doktori értekezés tézisei

Nagy Zoltán Árpád

**Gödöllő
2006**

A doktori iskola

megnevezése: **Biológiatudományi Doktori Iskola**

tudományága: **Biológiatudományok**

vezetője: **Prof. Dr. Tuba Zoltán**
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora SZIE, Mezőgazdasági
és Környezettudományi Kar Növényteni és Növényélettani Tanszék

témavezető: **Dr. Érsek Tibor**
tudományos osztályvezető, az MTA doktora MTA Növényvédelmi
Kutatóintézete, Növénykórtani Osztály

.....
Dr. Tuba Zoltán
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Érsek Tibor
A témavezető jóváhagyása

1. KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK ÉS KITŰZÖTT CÉLOK

1. 1. A *Phytophthora*-nemzetség

Bár telepszerveződésük alapján a *Phytophthora*-nemzetség tagjai a valódi gombákra emlékeztetnek, sajátos sejttani és biokémiai tulajdonságaik révén el is különülnek tőlük. DNS-vizsgálatok is megerősítették, hogy a barna- és sárgásmoszatokkal lényegesen nagyobb hasonlóságot mutatnak, mint a valódi gombákkal. Ezért a legújabb rendszerekben a fitoftórák és a hasonló gombaszerű szervezetek Oomycota-törzsként a valódi gombáktól elkülönítetten és e moszatokkal együtt a Chromista-országba kerültek.

Ivaros szaporodásuk petespórákkal (oospórákkal) történik, amelyek homotallikus fajokban (például a hazánkban nem élő *Ph. fragariae*) egy telepen belül keletkeznek. Ezzel ellentétben a heterotallikus fajok (például a *Ph. cambivora* és a *Ph. infestans*) csak két ellentétes párosodási típusú (A1 és A2) telep kölcsönhatásakor képeznek petespórát.

A fitoftórák növényi szövetben élnek, de kitartóképleteik – a petespórák, illetve az ivartalan úton keletkező klamidospórák – révén évekig képesek a talajban fertőzőképes állapotban fennmaradni. Egy vegetációs időszakon belül azonban a gyorsan terjedő járványokért az ivartalan úton keletkező sporangiumok, de még inkább a bennük kialakuló kétstoros rajzospórák (zoospórák) felelősek.

1. 2. A *Phytophthora infestans* és intraspecifikus változatossága

Talán nincs is még egy olyan kórokozó, amely a burgonya- és paradicsomvényt kiváltó *Phytophthora infestans*éhoz hasonló súlyos járványokat okozott volna. Írországból az 1840-es évek közepén robbanásszerűen szétterjedve szinte a teljes burgonyatermést megsemmisítette.

Mivel a *Phytophthora*-fajok egyszerű felépítése kevés morfológiai bélyeg elkülönítésére ad lehetőséget, a fenotípusos tulajdonságok csak korlátozottan használhatók a populációk szerkezetének jellemzésére. Közülük a gyakorlat (kémiai védekezés, ill. burgonyanemesítés) számára a növényvédő szerekkel szembeni érzékenység és a virulencia használható fel a legjobban.

A fitoftórák ellen általánosan alkalmazott szisztémikus fenilamidokkal (pl. metalaxillal) szemben gyakran alakul ki rezisztencia. Mivel

a rezisztens törzsek felszaporodása miatt csökken a vegyszeres védekezés hatékonysága, széleskörűen alkalmaznak metalaxilérzékenységi vizsgálatokat.

Vad *Solanum*-fajokból – elsősorban a *S. demissum*ból – 11 domináns rezisztenciagént ismerünk, amelyek a nemesítés során a burgonyába is bekerültek. Időközben azonban a kórokozónak ugyanennyi virulenciafaktora vált ismertté. Egy ismeretlen izolátum rasszkarakterét (virulenciatípusát) ama rezisztenciagének sorszámával jellemezzük, amelyeket az illető izolátum képes letörni. Így például az R1, R2 és R3 rezisztenciagének hatását egyaránt letörni képes törzset 1.2.3-as rasszként azonosítjuk.

Legegyszerűbben a párosodási típus határozható meg; ehhez az ismeretlen izolátumot kell ismert párosodási típusú törzssel egy Petri-csészében tenyészteni. Aszerint, hogy a vizsgált izolátum az A1 vagy az A2 típusú törzssel képez petespórát, A2, ill. A1 párosodási típusúnak minősül.

Azonban a populációk változatosságának jellemzésére alkalmasabbak a genetikai bélyegek (markerek), amelyek közül ma már többet használnak a fitoftórák tanulmányozására is. Ilyen az izoenzimek (röviden izozimek) vizsgálata, amely általában valamilyen alapanyagcsere-folyamat egyik reakcióját katalizáló enzim egyedenként különböző változatainak azonosításán alapul. A *Ph. infestans* vizsgálatához a glükóz-6-foszfát-izomeráz (Gpi, E. C. 5. 3. 1. 9.) és a glicil-leucin-peptidáz (Pep, E. C. 3. 4. 11/13.) enzimeket használják. Az izozimmintázatokból a populáció diverzitására következtethetünk, mert közvetlenül lehetővé teszik az allélgyakoriság megváltozásának követését.

Ellentétben az izozimvizsgálatokkal, amelyekhez mindig tiszta tenyészetből kivont enzimek kellenek, DNS-alapú vizsgálatokat – például a polimeráz-lánreakción (PCR) alapulókat – akár százéves herbáriumi anyagokon is el lehet végezni; ezzel a régi populációk összetételéről kaphatunk felvilágosítást. A *Ph. infestans* genomjában mérsékelt gyakorisággal ismétlődő, 1,2 kilobázis (kb) hosszúságú DNS-szakaszból készített, ún. RG57-próba felhasználható genetikai ujjlenyomat (*fingerprint*) készítésére, ha azt hibridizáltatjuk az egyed teljes genomi DNS-ének *EcoRI* endonukleázzal feldarabolt fragmentumaihoz. E széleskörűen alkalmazott módszer adataira épül a *Ph. infestans* izolátumairól összegyűjtött első világméretű adatbázis is. Újabban a mikroszatellitek (SSR: simple sequence repeats) vagy a mitokondriális genom elemzése is bővítheti a *Ph. infestans* populációinak jellemzését szolgáló molekuláris adatok tárházát.

A *Ph. infestans* génközpontja feltehetően Közép-Mexikó, mert itt a legnagyobb a faj genetikai változatossága, bizonyára a két párosodási típus régóta tartó együttes jelenléte miatt. Mexikón kívül először az Egyesült

Államokban jelent meg a kórokozó 1843-ban, majd két évvel később már átkerült Európába és hamar elérte Magyarországot is. Mivel az akkoriban termesztett burgonyafajták fogékonyak voltak a kórokozóra, az rendkívül gyorsan meghódította új élőhelyét.

Genetikai vizsgálatok alapján a kórokozó populációi az elmúlt mintegy százötven évben csak néhány kis változatosságú törzsből álltak, egyetlen (US-1 jelű) klónvonalat képviselve. Ezt a populációt a 86/100-as *Gpi* és a 92/100-as *Pep* genotípus jellemezte, korlátozott virulenciával, és a törzsek legnagyobb része érzékeny volt a metalaxil hatóanyagú növényvédő szerekre.

Bár petespórákat esetenként régi herbáriumi mintákban is megfigyeltek, Mexikón kívül csak az A1 párosodási típus jelenlétéről vannak adatok; az A2-es típust először Svájcban izolálták 1984-ben. Ekkorra tehető olyan új, komplex virulenciájú populációk világméretű elterjedése, amelyek már mindkét párosodási típust tartalmazták, és nagyobb agresszivitásuk révén szinte mindenhol kiszorították az ún. régi, klonális populációt. Ezzel a változással együtt járt a metalaxilrezisztens törzsek arányának növekedése is, veszélyeztetve a burgonya- és paradicsomtermesztést.

Magyarországon először 1965-ben vizsgálták a kórokozó törzseinek rasszkarakterét négy, viszonylag egyszerű rasszot azonosítva. Az A2 párosodási típust 1996-ban izolálták, az ekkor kezdődött vizsgálatok már esetenként akár nyolc virulenciafaktort is tartalmazó, összetett rasszokat tártak fel. Ez az eredmény előre sejtette, hogy a világméretű változások hazánkat sem kerülték el.

1. 3. Az égerfitoftóra mint természetes fajhibrid

Amellett, hogy hibridek kialakulása a természetben igen ritka jelenség, nehéz egy ilyen kórokozó hibrid jellegét és eredetét csupán morfológiai bélyegek alapján bizonyítani. Bár a lehetséges szülőkkel végzett keresztezési kísérletek tisztázhatják az eredet kérdését, növénykórokozókkal ez az út nehezen járható. Hibridek mesterséges előállításával ezek a nehézségek leküzdhetők és a *Phytophthora*-nemzetségben rajzospórák indukált fúziójával, illetve ivaros keresztezéssel sikerült is hibrideket előállítani.

Az elmúlt két évtizedben több gombafajjal kapcsolatban is felmerült a gyanú, hogy létük interspecifikus kölcsönhatás eredménye, mint például a szilfavészt okozó *Ophiostoma*-fajok, vagy a nyárfa rozsdabetegségét kiváltó *Melampsora*-fajok estében. A *Phytophthora*-nemzetségben szintén bizonyított interspecifikus hibridek természetes kialakulása. Hidroponikus rendszerben termesztett kankalinról és vitorlavirágról izoláltak egy addig

ismeretlen fitoftórát, amelyről izozimelemzéssel, RAPD-PCR-termékek vizsgálatával és Southern-féle hibridizációjukkal kimutatták, hogy az a *Ph. cactorum* és a *Ph. nicotianae* hibridje. A hibrid képes volt megbetegíteni a cikláment is, amely egyik szülőfajnak sem gazdanövénye. Sejtani adatok alapján a *Ph. meadii*ről is feltételezhető, hogy nem önálló faj, hanem valójában egy interspecifikus hibrid.

Az égerfitoftórára először 1993-94-ben Nagy-Britannia déli részén bukkantak, amikor a folyóparti égerfák (*Alnus glutinosa*) törzsén nekrotikus sebeket, azok körül pedig sűrű, fekete nedvfolyásokat (kátrányfoltokat) észleltek. Mindez általában együtt járt a lombkorona megritkulásával. A nekrozisokból izolált kórokozó egy addig ismeretlen fitoftóra volt, egyben ez volt az első adat égerek fitoftóras betegségéről. A kórokozó egyes izolátumai morfológiai tulajdonságaikban (pl. szemölcsös oogónium) hasonlítottak a *Ph. cambivorára*, amely számos fafajon okoz betegséget, de az égert nem támadja meg; viszont a heterotallikus *Ph. cambivorával* ellentétben ez a fitoftóra homotallikusnak bizonyult. Ugyanezt a kórokozót figyelték meg jó néhány európai országban, így 1999-ben hazánkban is. Magyarországon a hegyi és síkvidéki égeresek felmérésekor kiderült, hogy egyes állományoknak akár 80%-a is mutatja a jellegzetes tüneteket, noha a kórokozó izolálása nem mindenhol sikerült.

ITS-szekvenciák elemzésével brit kutatók megállapították, hogy a kórokozó egy interspecifikus kölcsönhatás során létrejött fajhibrid, szülőfajai a *Ph. cambivora* és a *Ph. fragariae* (vagy egy ahhoz közel álló ismeretlen taxon). A hibridnek több típusa van, ezek egyebek közt kromoszómaszámuk alapján is elkülönülnek egymástól. Az égerfitoftóra izolátumai a *Ph. cambivorában*, illetve a *Ph. fragariae*ban tapasztalt 5–6 kromoszómapárhoz képest jóval többet tartalmaznak, általában közel tetraploidok. Mivel a kromoszómakészlet több fajtól származik (aneuploidok), ezért szabályos meiózis ritkán játszódik le és a keletkező petesporák jórészt csírázásra képtelenek.

Újabban az égerfitoftórát önálló, *Phytophthora alni* Brasier & S. A. Kirk néven leírt fajnak tekintik, különböző morfortípusait pedig alfajokként tartják számon. A legagresszívabb, genetikailag legegységesebb és szemölcsös oogóniumot képező, ún. standard típus a *Ph. alni* subsp. *alni*, a sima oogóniumú, ún. svéd típusú variáns pedig *Ph. alni* subsp. *uniformis* néven került be az irodalomba. A változatos morfológiájú, de egyöntetűen szemölcsös oogóniumú, valamint genetikailag kevésbé stabil és a legkevésbé agresszív törzseket tartalmazó német és holland variáns – a mindössze egy izolátum által képviselt brit variánssal együtt – a *Ph. alni* subsp. *multiformis* nevet kapta.

1. 4. Célkitűzések

Amellett, hogy növényi kórokozóként a *Phytophthora* jelentős gazdasági károk forrásai, nemzetségük rendkívül változatos. Sokszínűségük kialakításában mind a fajon belüli (intraspecifikus), mind fajok közötti (interspecifikus) kölcsönhatások szerepet kapnak. E munka célja ezért két, Magyarországon is előforduló és jelentékeny károkat okozó fajuk populációs diverzitásának feno- és genotípusos elemzése volt.

A hazai *Ph. infestans*-populációk vizsgálatakor arra kerestük a választ, hogy milyen azok szerkezete, fellelhetők-e bennük ivaros kölcsönhatások, illetve a kapott adatok mennyire hasonlítanak más országok eredményeihez.

Az éger újonnan felbukkant kórokozója a magyarországi égerekre is komoly fenyegetést jelent. Ezért céljaink között szerepelt a kórokozó izolálása, valamint a begyűjtött izolátumok morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel való elemzése, hogy megállapíthassuk a magyarországi populációk összetételét, illetve hogy a hibrid különböző típusainak elkülönítésére felhasználható genetikai markereket azonosíthassunk.

A doktori munka tehát a *Ph. infestans* populációinak szerkezetében napjainkban végbemenő intraspecifikus átalakulásra, illetve az interspecifikus kölcsönhatásban kialakult új fajhibrid, az éger-*Phytophthora* genetikai elemzésére összpontosít.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2. 1. Felhasznált izolátumok

A *Ph. infestans*-izolátumok a betegség tüneteit mutató burgonya és paradicsomültetvényeken véletlenszerűen kiválasztott levelekről származtak. Az összehasonlító vizsgálatokhoz négy, burgonyáról származó referenciaizolátumot használtunk, amelyeket W. E. Fry laboratóriumából (Cornell Egyetem, Ithaca, NY, Egyesült Államok), illetve G. A. Forbestól (Nemzeti Burgonyakutatási Központ, Quito, Ecuador) kaptunk.

Az éger-*Phytophthora*-t a Dél-Hansági Erdészet Csíkos éger nevű területéről (hansági minták), valamint a Hévízi-tó környékén található égeres lápterületről (hévízi minták) gyűjtöttük és izoláltuk. Morfológiai és élettani tulajdonságainak összehasonlító vizsgálatához az égerfitofórát és annak szülőfajait, a *Ph. cambivorát* és a *Ph. fragariae* var. *rubit* képviselő referenciaizolátumokat C. M. Brasier-től (Forest Research Agency, Farnham, Surrey, Nagy-Britannia) szereztük be.

2. 2. Táptalajok

A tenyészetek fenntartására háromféle, természetes anyagokból készült táptalajt használtunk, amelyek zöldborsóból, sárgarépből illetve nyolcféle zöldségnövény levét tartalmazó konzervből (V8-dzsúsz) készültek. A kórokozók izolálására a fenti táptalajokat antibiotikumokkal (pimaricin, ampicillin, rifampicin, himexazol, pentakloro-nitro-benzol) egészítettük ki és előzetes felületi fertőtlenítés után erre helyeztük a tüneteket mutató növényi szövetdarabokat, illetve a belőlük kifejlődő micéliumot.

2. 3. A *Phytophthora infestans* fenotípusos tulajdonságainak meghatározása

Phytophthora infestans-izolátumaink párosodási típusát az izolátumok mikroszkópos azonosítása során ismert párosodási típusú referenciatörzsek segítségével határoztuk meg. Metalaxilérzékenységüket *in vitro* körülmények között 5 és 100 ppm metalaxil-koncentrációnál vizsgáltuk. Valamennyi kísérletre több ismétlésben került sor.

2. 4. Az éger-*Phytophthora* azonosítása és élettani tulajdonságai

A fitofórák azonosításához ivartalan és ivaros szaporítóképleteik ismerete szükséges. Sporangiumképződést a tenyészeteknek nem steril talajszűrletben való inkubálásával indukáltunk. A sporangiumok keletkezési módját, szerkezetét, méreteit, az oogónium és az anteridium alakját, méretét és kapcsolódásuk módját fénymikroszkópos vizsgálattal állapítottuk meg; emellett az oogóniumok felületi mintázatát pásztázó elektronmikroszkóppal is vizsgáltuk.

Izolátumaink telepmorfológiáját különböző összetételű táptalajon (borsó, sárgarépa, illetve V8-dzsúsz), 9 cm átmérőjű Petri-csészében, a telepnövekedéshez optimális hőmérsékleten tanulmányoztuk. Az optimális hőmérsékletet az izolátumokat különböző hőmérsékleteken tenyésztve a növekedés napi sebessége alapján határoztuk meg.

2. 5. Izozim- és DNS-vizsgálatok

Minden molekuláris biológiai vizsgálatához fagyasztva szárított tenyészetekből micéliumport készítettünk. Ebből vizes kivonóoldatok segítségével nyertük ki az izozimelemzéshez az enzimeket, a DNS-t pedig a hagyományos fenol-kloroformos eljárással vontuk ki. Az izozimeket cellulóz-acetát-gélelektroforézissel választottuk el, és agar-felülrétegzéses festéssel tettük láthatóvá.

A *Ph. infestans* ún. RG57-genotípusát az összgenomi DNS *EcoRI* endonukleázos emésztését és a termékek agarózgélés elválasztását követően a digoxigeninnel jelölt, 1,2 kb nagyságú, ún. RG57-próba Southern-féle hibridizációjával állapítottuk meg.

Az éger-*Phytophthora* ITS1–ITS4-régióját a megfelelő univerzális indítószekvenciapárral, polimeráz láncreakció segítségével szaporítottuk fel, majd restriktív endonukleázos kezelést követően a DNS-termékeket elektroforézissel választottuk el agarózgélben. Teljes genomjának vizsgálatára véletlenszerű bázissorrendű indítószekvenciákkal végeztünk polimeráz láncreakciót (RAPD-PCR). A *Ph. cambivora* és az éger-*Phytophthora* rokonságának elemzésére az egyik keletkezett RAPD-PCR-terméket – digoxigeninnel jelölve – próbaként használtuk fel Southern-féle hibridizációban.

2. 6. Adatelemzés

A *Ph. infestans* populációjának vizsgálatára az izozimlokuszokon megfigyelt allélgyakoriságot használtuk fel a statisztikai számításokhoz. A genotípusos változatosságot Nei-féle diverzitás-elemzéssel vizsgáltuk a *Ph. infestans* gazdanövény, illetve párosodási típus alapján elkülönített alpopulációi között. Az elemzést kiegészítettük a Nei-féle genetikai távolság kiszámításával is. A populáció teljes változatosságának elemzésére a párosodási típusból, a *Pep* (peptidáz) és az RG57-genotípusból egyetlen multilokuszos genotípussá kombinált adatsorokat vettünk figyelembe. A populációk változatosságának mérésére a Shannon-index szolgált.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

3. 1. *Phytophthora infestans*-izolátumok fenó- és genotípusos jellemzői

A 2001–2002-es vegetációs időszakban összesen 118 izolátumot gyűjtöttünk burgonyáról, illetve kisebb részben paradicsomról. Mintáink nagyobb része a 2002. évi gyűjtés eredménye és főleg két nagyobb burgonyatermő régióból származik; a Nógrád megyei Ludányhalásziból 20, a Veszprém megyei Zirc térségéből (Borzavár, Porva, Olaszfalu, Tündérmajor) pedig 39 izolátum állt rendelkezésünkre.

A betegség elleni védekezés szempontjából a legfontosabb eredmény, hogy izolátumaink több mint fele (62%) toleránsnak (rezisztensnek vagy átmeneti érzékenységűnek) bizonyult a leggyakrabban alkalmazott növényvédő szerrel, a metalaxillal szemben. A főleg burgonyáról származó metalaxil-toleráns izolátumok nagy száma miatt nem elég csupán erre a szerre alapozni a kémiai védekezést, hanem tanácsos eltérő hatásmechanizmusú szerek kombinációját használni.

Mindkét gazdanövényen mintegy fele-fele arányban találtuk meg az A1 és az A2 párosodási típust. A két párosodási típus jelenléte lehetővé teszi az ivaros rekombinációt és a talajban gazdanövény nélkül is sokáig csírázóképes oospórák kialakulását. Mindez a genotípusos variabilitás növekedésével jár.

Valamennyi izolátum homozigóta 100/100 genotípusú volt a *Gpi* lokuszon, ezzel szemben a *Pep* lokuszon 3 allél összesen négy kombinációja, a 100/100 (34%), a 96/96 (32%), a 96/100 (27%) és a 83/96 (7%) jelent meg. Ez utóbbi genotípus Európában nagyon ritka, és csak az A1-es párosodási típust képviseli.

Izolátumaink jelentős része egyedi RG57-mintázatot mutatott, még a leggyakoribb is mindössze 9 alkalommal fordult elő. Bár nagy változatoságú populációk nem csak Magyarországon figyelhetők meg, hazánkban – ellentétben más területekkel – nincs egyetlen domináns genotípus sem. Ráadásul a kórokozó populációjában meghatározott RG57-mintázatok – tizenkettő kivételével – sehol máshol nem fordulnak elő Európában.

A *Ph. infestans*-populáció jellemzésére általánosan használt, ún. multilokuszos genotípusok (a párosodási típus [amelyet hol fenotípusos, hol genotípusos tulajdonságként kezelnek], izozim-genotípusok és az RG57-

mintázatok kombinációja) tekintetében még nagyobb a változatosság: a leggyakoribbat is csupán hatszor azonosítottuk. Ilyen mértékű változatosságra eddig csak Közép-Mexikóban volt példa, ahol szinte minden izolátumnak más és más genotípusa van.

A kórokozó izolátumainak párosodási típus és gazdanövény alapján elkülöníthető alcsoportjai között a Nei-féle genetikai távolság kicsi volt. Az izolátumok izozimgenotípusainak statisztikai elemzése sem mutatott ki jelentős különbségeket közöttük. Ezek szerint ezen csoportoknak a megkülönböztetése nem indokolt, legalábbis izozimmarkerek alapján. Ehhez hasonlóan minden alcsoportban nagy volt a multilokuszos genotípusok változatossága is és közöttük a Shannon-indexben nem volt szignifikáns eltérés. Mindez azt jelzi, hogy a *Ph. infestans* hazai populációiban az ivaros rekombináció szerepe igen jelentős. Így azokat a korábbi – jórészt a párosodási típusok megoszlására és az izolátumok agresszivitására alapozott – megfigyeléseket, miszerint paradicsomon és burgonyán a kórokozónak két elkülönülő populációja alakult ki, molekuláris adatokkal nem lehetett alátámasztani.

Még nem tisztázott teljes mértékben a petespórák szerepe a *Ph. infestans* populációinak évenkénti megújulásában és változékonyságának kialakításában. Képződésük mesterséges fertőzést követően sem mindig megy végbe, de a korlátozott oospóráképződés ellenére a kórokozó megfelelő korú vagy fajú/fajtájú gazdanövényen nehézség nélkül áttelelhet. Az Európában mezőgazdasági területeken gyomként előforduló *Solanum*-fajok szintén szolgálhatnak inokulumforrásként. Ha a kórokozó döntően az áttelelő oospórákból újul meg a következő vegetációs időszakban, az ivaros rekombináció során keletkezett új nemzedék akár gyökeresen is eltérhet a megelőző évitől.

A hazai *Ph. infestans*-populáció nagy genetikai változatossága több hatás eredményeként alakulhatott ki, de jelentős szerepet játszanak benne az ivartalan szaporodás domináns szerepet játszik, akkor egy élőhelyen és egy vegetációs időszakban genetikailag döntően homogén populációnak kell kialakulnia. Ha a hazai *Ph. infestans*-populációk a szomszédos burgonya-termő területekkel szoros kapcsolatban állnának a két élőhely között fel lépő migráció miatt, akkor a Magyarországon oly gyakori *Pep 96*-os allélnak is meg kellene jelennie más területeken vagy – ha a populáció főleg ivartalanul szaporodik – azonos RG57-genotípusokat kellene megfigyelni. Mivel egyik eset sem tapasztalható, az eredményeink azt sugallják, hogy a hazai *Ph. infestans*-populációk elszigetelten fejlődnek, a nagy ge-

netikai változékonyság pedig arra enged következtetni, hogy az ivaros kölcsönhatás döntő szerepet játszik a kórokozó életében.

3. 2. Az éger-*Phytophthora* (*Ph. alni*) morfológiája és molekuláris jellemzői

Az égerpusztulás tüneteit mutató fák kéreg- vagy gyökérszövetéből, illetve gyökérszónájából kitenyésztett kórokozó az előzetes vizsgálatok alapján égerfitoftórának mutatkozott. Minden izolátumának sporangiuma vékony, sima falú volt, a tartókról nem vált le. (Ugyanez jellemző a *Ph. cambivorára* és a *Ph. fragariaera* is.) Növekedésükhöz a 25 °C-os hőmérséklet volt a legmegfelelőbb.

Homotallikusan képződő ivarszerveinek felépítése alapján két típust különböztettünk meg. A Hanságból származó három izolátum a svéd típusú (*Ph. alni* ssp. *uniformis*) referenciaizolátumra hasonlított, azaz optimális körülmények között sima felszínű oogóniumokat képezett, melyeknek átmérője 24 és 64 µm között volt. Az anterídiumok jobbára kétsejtűek voltak és amfigin módon kapcsolódtak az oogóniumhoz. Kétéves égercsemeték visszafertőzésével patogenitásuk is igazolódott. A Hévízről származó izolátumok 23–54 µm átmérőjű, szemölcsös-rücskös felszínű oogóniumokat képeztek, az anterídium amfigin típusú volt és a hansági izolátumokéhoz viszonyítva gyakrabban volt kétsejtű. Ezen tulajdonságaikban megegyeztek a standard típusú referenciaizolátummal (*Ph. alni* ssp. *alni*) és a heterotallikus *Ph. cambivorával*.

Molekuláris biológiai eredményeink alátámasztották a kórokozó két, hazánkban is előforduló típusának (alfajának) a morfológiai bélyegek alapján tapasztalt elkülönülését. Az izozimelemzésre legalkalmasabbnak talált almasav-dehidrogenáz, glükóz-6-foszfát-izomeráz és leucil-tirozin-peptidáz enzimek mintázataiban egyaránt elkülönültek a svéd, ill. a standard típusnak megfelelő izolátumok, a szülői allélok rekombinálódására utaló jelet azonban e módszerrel nem kaptunk.

A RAPD-PCR-hez kipróbált számos indítószekvencia legtöbbje szintén lehetővé tette izolátumaink fenti csoportosítását. Mindemellet az OPG-02 jelű indítószekvenciával az égerfitoftóra-izolátumokban felszaporodott egy 1,5 kb hosszúságú DNS-szakasz, amely homológnak bizonyult a *Ph. cambivorában* keletkezett hasonló méretű termékkel. Ez a módszer látványos bizonyítékát adta annak, hogy az égerfitoftórák tartalmazzak *Ph. cambivora* eredetű DNS-t. Észleltünk a hibridekben néhány olyan DNS-szakaszt is, amelyik a *Ph. fragariae*ban szintén

megjelent, de ezek nem szaporodtak fel olyan mértékben, hogy a homológiaviszonyt megállapíthassuk.

Az ITS-régióknak az univerzális ITS-1 és ITS-4 indítószekvenciákkal való felszaporítása minden izolátumban a várt, 0,9 kb hosszú PCR-terméket eredményezte, és e termékek endonukleázos emésztését követően a hibrid izolátumok restrikciós mintázatai a kétféle hibridtípus alapján különböztek el. Érdekes módon a hasított DNS-termékek összesített hossza nagyobbak bizonyult, mint a PCR-termék eredeti mérete. Ez egyértelműen annak a jele, hogy az égerfitoftóra ITS-régiójában egynél több, de az azonos hosszúság miatt elektroforetikusán megkülönböztethetetlen szekvencia van jelen, ami – más *Phytophthora*-fajhibridek vizsgálatakor kapott eredményekkel összhangban – a szülőfajok ITS-szekvenciájának jelenlétére utal. Így nem meglepő, hogy például az *MspI* enzimes emésztést követően a hibridek és a két szülő restrikciós mintázataiban nincs lényeges minőségi különbség. Ellenben számottevő az eltérés mennyiségileg, s eszerint a svéd variánsok a *Ph. cambivorára*, a standard típusú izolátumok pedig a *Ph. fragariaera* hasonlítanak.

Az azonos hibridtípusú izolátumok molekuláris homogenitása alátámasztja azt a korábbi megfigyelést, hogy a kórokozó ivaros folyamatai nem mennek végbe tökéletesen, és a kialakuló oospórák jórészt csírázásra képtelenek, ezért valószínű, hogy az éger-*Phytophthora* szaporodása főként ivartalan úton megy végbe. Jelentősen csökkenhet a hibridek kialakulásával kapcsolatos bizonytalanság, ha képesek leszünk megfejteni a hibridizációhoz vezető folyamatokat. Addig is, az ilyen események más fajokra is kiterjedő sikere jelentősen megváltoztathatja egyes ökoszisztémák működését. Hibridek fennmaradára úgy van a legnagyobb esély, ha képesek a szülők eredeti gazdanövénykörét bővíteni vagy új, eddig még meg nem hódított területekre betelepelve kihasználni az üres ökológiai helyeket. Erre jó esélyük van, és bár e folyamatok valószínűleg emberi beavatkozás nélkül is végbemennének, napjaink megváltozott ökológiai viszonyai és a felelőtlen emberi viselkedés jelentősen hozzájárulnak a hibridizációs események előmozdításához.

*

Összegzésként elmondható, hogy a *Phytophthora*-nemzetség mint az egyik legjelentősebb növénykórokozó csoport már a múltban is sok kárt okozott, a közeli jövőben azonban még komolyabb kihívások elé állíthatja az emberiséget. Bizonyos populációinak a megváltozott gazdasági, társadalmi, valamint az ezekre (is) visszavezethető környezeti feltételek következtében megnövekedett intra- és interspecifikus változékonysága hatékony védekezési stratégiák kidolgozására vagy a meglévők megváltoztatá-

sára ösztönöz. Mindehhez nélkülözhetetlen a populációk genetikai szerkezetének ismerete, valamint a szerkezetváltozások követése, amiben ma már a molekuláris módszerek is nagy segítséget nyújtanak. Genetikailag ennyire változékony kórokozók ellen tökéletes védelmet szinte lehetetlen biztosítani. Az már a metalaxil kapcsán (is) kiderült, mennyire kockázatos egyetlen növényvédő szerre alapozni a kémiai védekezést, ezért tanácsos a jövőben az eltérő hatásmechanizmusú növényvédő szerek kombinációját alkalmazni a rezisztencia kialakulási gyakoriságának csökkentésére. Másfelől, bizonyos esetekben – elég az égerfitoftóra kapcsán az erdei ökoszisztémákra gondolni – a vegyszeres védekezés környezetvédelmi szempontból csaknem megvalósíthatatlan. Ilyenkor szinte az egyetlen, más esetekben viszont a kémiai védekezés melletti lehetőség a betegségnek ellenálló fajták nemesítése. De mindenekelőtt lényeges, hogy a vető- vagy szaporítóanyag kórokozótól mentes legyen. A fertőzött növények kiszűréséhez azonban gyors diagnosztikai módszerek szükségesek. Ilyen célú munkát folytatunk jelenleg az égerfitoftóra molekuláris azonosítására.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A doktori munka része, illetve folytatása azoknak az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében végzett kutatásoknak, amelyek az intraspecifikus, illetve az interspecifikus kölcsönhatások okozta populációs változásokra összpontosítanak a burgonya- és paradicsomvést kiváltó *Ph. infestans*-on, illetve az égerpusztulásért felelős *Ph. alni* fajhibriden keresztül. A doktori munka során a következő új tudományos eredmények születtek:

- További bizonyítékokkal szolgáltunk arra vonatkozóan, hogy a magyarországi *Ph. infestans*-populációkban is végbement a teljes kicserélődés, és egy új populáció terjedt el teljesen kiszorítva a régit. Ez a hazai *Ph. infestans*-populáció szerkezetében alig hasonlít a korábbi európai populációkra, annál sokkal nagyobb diverzitású.
- Két hazai élőhelyen azonosítottuk az Európa-szerte pusztító égervész hibrid kórokozójának (legújabbán *Ph. alni* néven leírt) két (újabbán alfajként jegyzett) típusát: a standard típust (*Ph. alni* ssp. *alni*) és az úgynevezett svéd variánst (*Ph. alni* ssp. *uniformis*).
- Izozim- és DNS-markereket azonosítottunk a *Ph. alni* e két leggyakoribb típusának (alfajának) molekuláris jellemzésére és megállapítottuk, hogy a *Ph. alni* két típusa (alfaja) mind izozim-, mind RAPD-markerek alapján elkülöníthető, az egyes típusok ellenben genetikailag homogének.
- Kimutattuk a *Ph. alni* fajhibridben az egyik szülő, a *Ph. cambivora* DNS-ének jelenlétét DNS–DNS hibridizációval.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Lektorált folyóiratban megjelent cikkek

- Szabó I., Nagy Z., Bakonyi J. és Érsek T. (2000): First Report of *Phytophthora* Root and Collar Rot of Alder in Hungary. *Plant Disease*, 84 (11) 1251. p.
- Nagy Z. Á., Szabó I., Bakonyi J., Varga F. és Érsek T. (2000): A mézgás éger fitoftórási betegsége Magyarországon. *Növényvédelem*, 36 (11) 573-579. p.
- Nagy Z. Á., Bakonyi J., Fischl G. és Érsek T. (2002): Egy fitoftórahíbrid két típusa a hazai égeresekben. *Növényvédelem*, 38 (6) 289-293. p.
- Nagy Z. Á., Bakonyi J. és Érsek T. (2003): Standard and Swedish variant types of the hybrid alder *Phytophthora* attacking alder in Hungary. *Pest Management Science*, 59 (4) 484-492. p.
- Nagy Z. Á., Bakonyi J. és Érsek T. (2003): Novel genotypes in *Phytophthora infestans* populations in Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 38 (1-2) 7-11. p.
- Érsek T. és Nagy Z. Á. (2003): Határozókulcs a *Phytophthora*-fajok azonosításához. *Növényvédelem*, 39 (4) 215-221. p.
- Érsek T., Bakonyi J. és Nagy Z. Á. (2005): *Phytophthora*-fajhibridek mint az égervész kórokozói. *Növényvédelem*, 41 (11) 519-529. p.

Előadások, posztterek

- Érsek T., Bakonyi J., Ládai M. és Nagy Z. Á. (2001): Fajhibridek – új kihívás a fitoftóráskutatásban. 12. p. In: *XI. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum*. Keszthely, 2001. január 24–26.
- Bakonyi J., Nagy Z. Á., Vajna L. és Érsek T. (2001): A lilium fitoftórási szártő- és csúcsrothadása. In: Kuroli G., Balázs K. és Szemessy Á. (szerk.): *47. Növényvédelmi Tudományos Napok*. Budapest: s. n. 170 p.
- Érsek T., Nagy Z. Á. és Bakonyi J. (2001): *Phytophthora*-fajhibrid pusztítja a hazai égereket. 36. p. In: *6. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum. A növényvédelem időszerű kérdései az új évezred kezdetén*. Debrecen, 2001. november 6–8.
- Nagy Z. Á., Bakonyi J., Szabó I. és Érsek T. (2001): A mézgás éger károsító *Phytophthora* morfológiai és molekuláris jellemzése. In: Kuroli G., Balázs K. és Szemessy Á. (szerk.): *47. Növényvédelmi Tudományos Napok*. Budapest: s. n. 170 p.
- Nagy Z. Á., Bakonyi J., Fischl G. és Érsek T. (2002): Az égerfitoftóra két híbridváltozata Magyarországon. In: Kuroli G., Balázs K. és Szemessy Á. (szerk.): *48. Növényvédelmi Tudományos Napok*. Budapest: s. n. 156 p.
- Nagy Z. Á., Bakonyi J. és Érsek T. (2002): Interspecific *Phytophthora* hybrids as alder pathogens. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 49 (2-3) 403. p.
- Koltay A., Bakonyi J. és Nagy Z. Á. (2002): Methods used for investigating the incidence of *Phytophthora* disease of alder in Hungary. In: McManus M. L. és Liebhold A. M. (szerk.): *Proceedings Ecology, Survey and Management of Forests Insects*. USDA Forest Service, 2003. 180 p.

- Érsek T., Bakonyi J. és **Nagy Z. Á.** (2003): PCR-based DNA marker for identification of interspecific *Phytophthora* hybrids attacking alder trees. In: Kövics G. J. (szerk.): *Proceedings of 3rd International Plant Protection Symposium*. 85-86. p.
- Nagy Z. Á.**, Bakonyi J. és Érsek T. (2003): Új genotípusok a *Phytophthora infestans* hazai populációiban. In: Kuroli G., Balázs K. és Szemessy Á. (szerk.): *49. Növényvédelmi Tudományos Napok*. Budapest: s. n. 180 p.
- Nagy Z. Á.**, Som V., Bakonyi J. és Érsek T. (2004): Pheno- and genotypic analysis of *Phytophthora infestans* populations in Hungary. In: Duvauchelle, S. (szerk.): Abstracts, E.A.P.R. Pathology Section Meeting, Lille, 11–16 July, 2004.
- Bakonyi J., **Nagy Z. Á.** és Érsek T. (2004): Diagnostic molecular markers of alder *Phytophthora*. In: Abstracts of Posters and Talks. 3rd Workshop of IUFRO Working Party 7.02.09. "Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems". Freising, 2004. szeptember 11–17.
- Nagy Z. Á.**, Bakonyi J. és Érsek T. (2004): A hazai *Phytophthora infestans* populáció jellegzetességei. In: Kuroli G., Balázs K. és Szemessy Á. (szerk.): *50. Növényvédelmi Tudományos Napok*. Budapest: s. n. 168 p.
- Bakonyi J., **Nagy Z. Á.**, és Érsek T. (2005): Molekuláris diagnosztikai módszer az égervészt okozó fitoftóra fajhibrid közvetlen kimutatására és azonosítására. In: Horváth J., Haltrich A. és Molnár J. (szerk.): *51. Növényvédelmi Tudományos Napok*. Budapest: s. n. 105 p.

Egyéb közlemények

- Bakonyi J., **Nagy Z. Á.**, Vajna L. és Érsek T. (2001): A lilium fitoftórási betegsége Magyarországon. *Növényvédelem*, 37 (5) 237-240. p.
- Bakonyi J., **Nagy Z. Á.**, Vajna L. és Érsek T. (2001): *Phytophthora nicotianae* causes blight of lily in Hungary. *Plant Pathology*, 50 (6) 795. p.
- Szőcs G., Kárpáti Zs., **Nagy Z.** és Reiderné Saly K. (2001): Első tapasztalatok az újonnan kifejlesztett vadgesztenyelevél-aknázómoly feromoncsapdával. *A főváros közterületeinek növény- és talajvédelme*. Budapest.
- Szőcs G., Kárpáti Zs., **Nagy Z.**, Kerényiné Nemestóthy K., Sebestyén R., Reiderné Saly K. és Újvári I. (2002): Új hatóanyag, új feromoncsapda, új védekezési stratégia: tudományos együttműködéssel a vadgesztenyefák védelméért. *A főváros közterületeinek növény- és talajvédelme*. Budapest.
- Szőcs G., Kárpáti Zs., **Nagy Z.**, Sebestyén R., Kerényiné Nemestóthy K., Reiderné Saly K. és Újvári I. (2003): Varsás feromoncsapda a vadgesztenyelevél-aknázómoly (*Cameraria ochridella*) rajzásmenetének nyomonkövetésére: Mikor jobb, mint a ragacsos típusú? In: Kuroli G., Balázs K. és Szemessy Á. (szerk.): *49. Növényvédelmi Tudományos napok*. Budapest: s. n. 180 p.
- Bakonyi J., Varga K., **Nagy Z. Á.** és Koltay A. (2003): Occurrence of *Phytophthora citricola* in an alder forest in Hungary. *Plant Pathology*, 52 (6) 807. p.
- Vályi B., Saly K., Kerényiné Nemestóthy K., **Nagy Z.**, Kárpáti Zs. és Szőcs G. (2003): Mikor rajzik a vadgesztenyelevél-aknázómoly? (Feromon csapdázás Budapest több pontján.) *A főváros közterületeinek növény- és talajvédelme*. Budapest.
- Som V., **Nagy Z. Á.**, Bakonyi J. és Érsek T. (2004): Mitokondriális DNS-haplotípusok a hazai *Phytophthora infestans*-populációk jellemzésére. *Növényvédelem*, 40 (8) 393-400. p.
- Bakonyi J., **Nagy Z. Á.**, Koltay A., Nechwatal J. és Varga K. (2005): Hazai égeresekben izolált fitoftórák. In: Horváth J., Haltrich A. és Molnár J. (szerk.): *51. Növényvédelmi Tudományos Napok*. Budapest: s. n. 105 p.