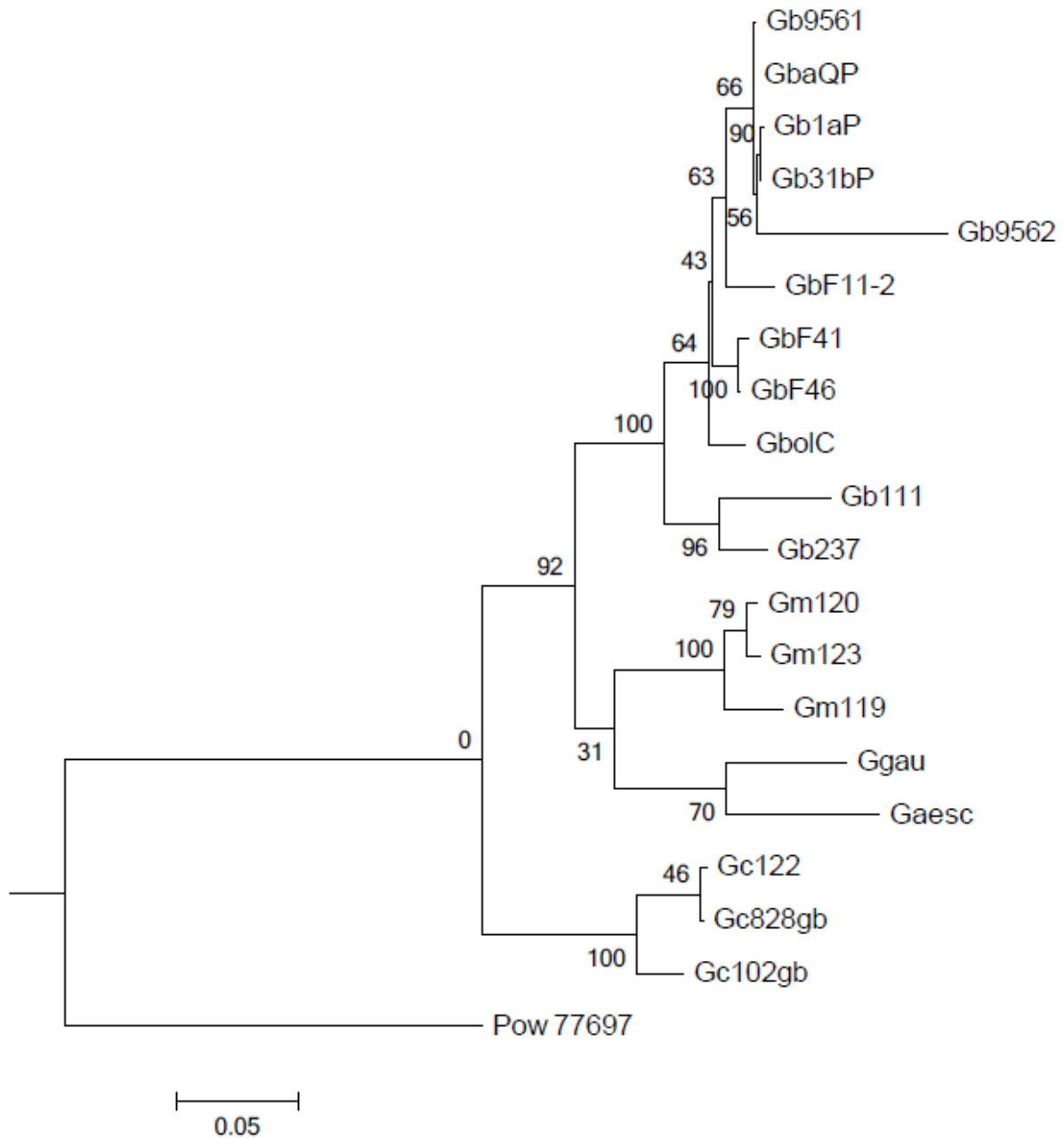


Zárójelentés

A pályázatban tervezett kutatás három részre bontható. Az első részfeladat célja eredetileg a *Guignardia bidwellii* (anamorf alak: *Phyllosticta ampellicida*) taxon filogenetikai elemzése volt. Azért tartottuk szükségesnek "újra definiálni" a szőlő feketerothadásának kórokozóját, mert feltételeztük, hogy a nemzetközi törzsgyűjteményekben deponált *G. bidwellii* törzsek valójában több fajhoz tartoznak. E törzsek túlnyomó részének eredeti gazdanövényei ugyanis vadszőlőfajok (*Parthenocissus* spp.) voltak, nem pedig a bortermő szőlő (*Vitis vinifera*). A molekuláris vizsgálatokhoz mintegy hatvan *Vitis vinifera* gazdanövényről származó *G. bidwellii* törzset szereztünk be Magyarország (Eger, Pécs) illetve Európa (Olaszország, Portugália) különböző borvidékeiről. Meghatároztuk 19 törzs három különböző sejtmagi DNS-régiójának bázissorrendjét, és pedig az nrDNS ITS (Internal Transcribed Spacer) régió teljes, valamint az aktin gén (*act1*) és a transzkripció elongációs faktor gén (*TEF*) egy-egy részének szekvenciáit, majd multilokus-analízis keretében elemeztük a szekvenciákat (1. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy a *Parthenocissus* fajokról illetve a szőlőről származó törzsek két külön csoportot alkotnak és ez igazolni látszott eredeti elképzelésünket. Munkánk megkezdése után néhány hónappal egy svájci kutatócsoport ugyanebben a témában jelentetett meg egy közleményt (Wicht és mtsai, 2012), ezért újra kellett terveznünk a saját kutatásokat. Ezért filogenetikai elemzéseinkbe bevontuk a *Guignardia* nemzetség több fajtát is, emellett a *G. bidwellii* taxonok és gazdanövényeik között keresztfertőzési kísérleteket végeztünk, mivel ilyen eredményekről nem számoltak be Wicht és mtsai (2012).

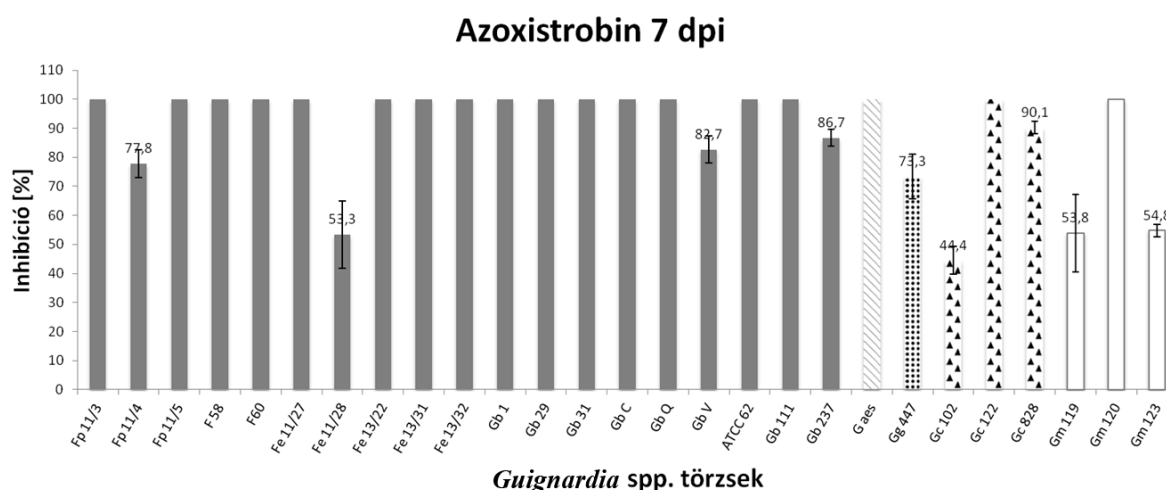
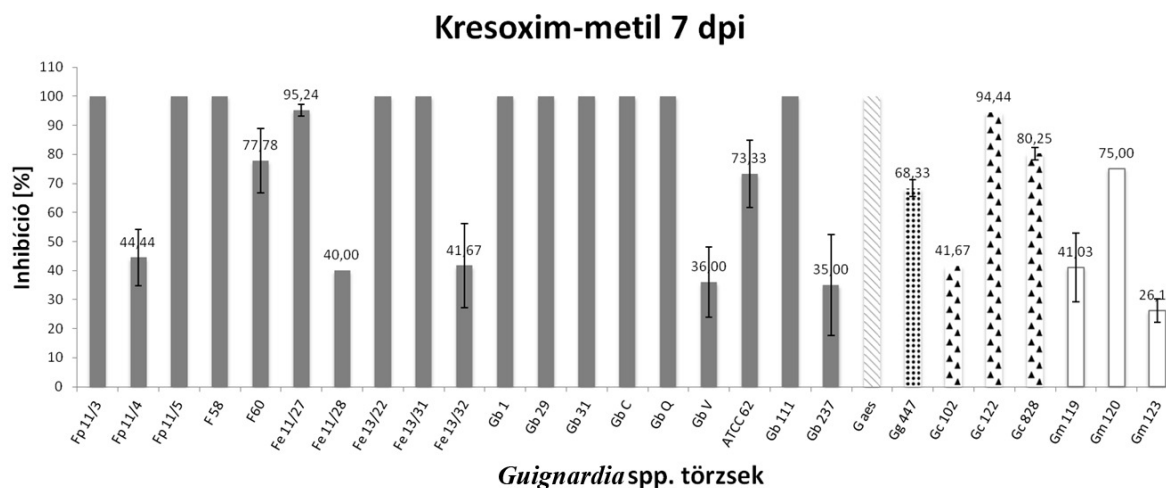


1. ábra nrDNS ITS, *act1* és *TEF* szekvenciákra épülő multilókuszos elemzés eredményeit bemutató törzsfá. Külcsoport: *Phyllosticta owaniana* CBS 776.97. [A törzsek betűkódjainak jelentése: GbF11-2: Pécs (*Guignardia bidwellii*, szőlőről); GbF41 ill. GbF46 Eger (*Guignardia bidwellii*, szőlőről); Gb1aP, GbaQP és Gb31bP: Portugál *Guignardia bidwellii* törzsek (szőlőről); GbolC Olasz *Guignardia bidwellii* törzs (szőlőről); Gb9561 és Gb9562 Törzsgyűjteményből származó *Guignardia bidwellii* (szőlőről) Gb111 és Gb237: Törzsgyűjteményből származó *Guignardia bidwellii* törzsek (vadszőlőről); Gaesc: *Guignardia aesculi*; Ggau: *Guignardia gaultheriae*; Gc122, Gc828gb, Gc102gb: *Guignardia citricarpa* törzsek; Gm120, Gm123, Gm119: *Guignardia mangiferae* törzsek].

A gazdaspecificitás megállapítása azért is szükséges, mert egy taxon több fajra bontásánál általában nem elegendő kizárólag csak molekuláris adatokra hagyatkozni. Kísérleteinkből kiderült, hogy *Vitis vinifera*-ról származó *Guignardia* törzsek nem fertőzik a *Parthenocissus* fajokat. Ez az eredmény alátámasztja ugyan az eredeti feltevést, viszont a bizonyítás úgy lenne teljes értékű, ha sikerülne kimutatni, hogy a vadszőlőről izolált törzs sem képes fertőzni a szőlőt. A *G. bidwellii* kizárólag spórákkal képes terjedni (Molitor és Beyer, 2014), éppen ezért a kísérlet végrehajtásához sporuláló gombatörzsrre volt szükségünk. Erre csak 2016 tavaszán tettünk szert, ugyanis annak ellenére, hogy szőlőről több mint hatvan saját törzssel rendelkezünk, vadszőlőn soha nem találtuk meg a kórokozót, a törzsgyűjteményekből származó tenyészetek pedig több mint 30 évesek voltak és nem sporuláltak. A kísérletes munkát tovább nehezítette, hogy a kórokozóval csak tavasszal (áprilisban és májusban) tudtunk fertőzni. Tulajdonképpen már elhatároztuk, hogy eredményeinket hiányos keresztfertőzési adatokkal is közöljük, viszont a sporuláló törzs birtokában beállítottunk egy jelenleg futó keresztfertőzési kísérletet, amely teljessé teheti a pályázat részfeladatának végrehajtását. Új, nemzetközi, magas IF-értékű folyóiratba közölhető eredmény a három lókuszos filogenetikai elemzés, valamint a keresztfertőzésekből levont következtetések, amelyeket ebben a formában még nem közöltek.

A második részfeladat a fekete-rothadást okozó növénypatogén gomba fungicid-rezisztenciájának vizsgálata volt. Munkánk során a strobilurinokkalszembeni rezisztenciáját vizsgáltuk, mivel (Miessner és mtsai, 2011) szerint ez a hatóanyagcsoport továbbra is hatékony lehet a szőlő fekete-rothadásával szembeni védekezésben. A strobilurin származékok egy ponton ható, felszívódó gombaölő szerek, amelyek a kórokozó mitokondriumaiban a citokróm-b fehérjéhez kapcsolódva a sejtlégzés gátlásával fejtik ki hatásukat. Egész pontosan az ubiquinol-oxidációs központhoz (Qo) kötődik a fungicid-molekula, ezáltal gátolva annak működését, amiért a strobilurin származékokat Qo inhibitoroknak (QoI) is nevezik (Bartlett és mtsai, 2002). A természetben strobilurint a *Strobilurus tenacellus* tobozfülőke faj termel, amely ennek a fungicidnek a segítségével szorítja ki a konkurens gombafajokat a termőterületéről (Kraiczky és mtsai, 1996). Kereskedelmi forgalomban az eredeti molekula szintetikus, továbbfejlesztett változatai kaphatók, amelyeket eredetileg igen nagy volumenben árultak és a növénypatogén gombák többsége ellen kezdetben hatásosnak bizonyultak. Az elvárásokkal ellentétben azonban a növényvédő szerekkel szembeni rezisztencia már alkalmazásuk kezdetén megjelent számos növénypatogén gombafaj populációiban (Heaney és mtsai, 2000; Sierotzki és mtsai, 2000a, 2000b). A nemzetközi szakirodalomban hamarosan

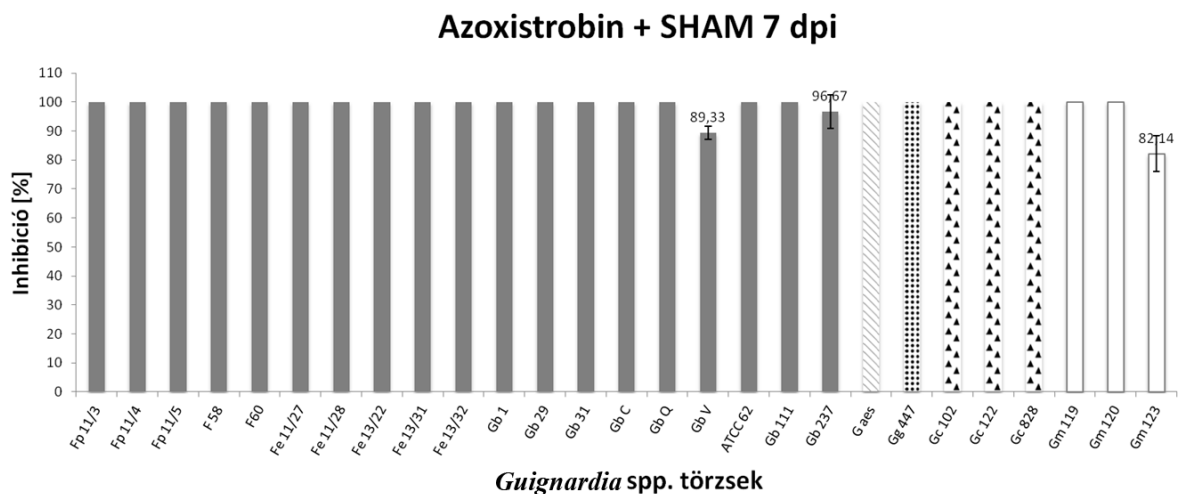
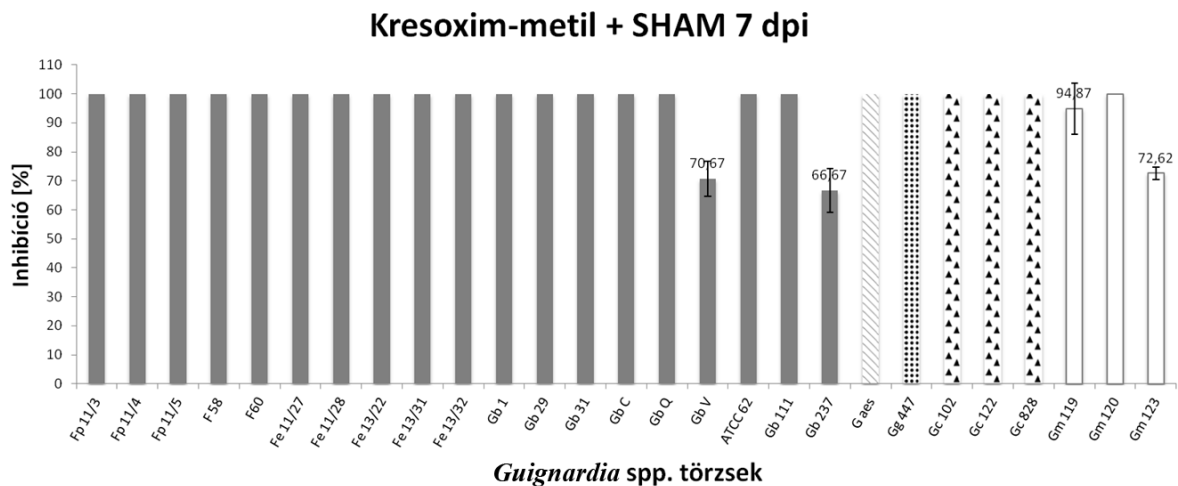
leírták azt az aminosav-cserét (G143A) okozó pontmutációt a citokróm-b fehérjét kódoló gén bázissorrendjében, amely a strobilurin származékokkal szembeni rezisztenciához vezet (Gisi és mtsai, 2000). A későbbiekben további két aminosav-szubsztitúciót találtak (F129L és G137R) amelyek hatása kevésbé markáns, csupán fungicid-toleranciát okoz (Gisi és mtsai, 2002). Lisztharmatgombákban olyan további, kevésbé definiált pontmutációkat is találtak, amelyeknek bizonyos együttes előfordulása a Qo génszakaszon a fungicid-rezisztencia különböző szintjeiért felelős (Fernández-Ortuño és mtsai, 2008). Némely növénypatogén gomba másfajta stratégia segítségével képes túlélni a citokróm-b fehérje funkcióvesztését. *Mycosphaerella graminicola* illetve *Sclerotinia sclerotiorum* gombákban kimutatták, hogy QoI jelenlétében az alternatív oxidázok működtetik a sejtlégzést (Miguez és mtsai. 2004; Xu és mtsai. 2013). A pályázatban vállalt feladatok között nem szerepelt az alternatív oxidázok szerepének tisztázása *Guignardia* fajok fungicid-rezisztenciájában, viszont a kutatás olyan irányba fejlődött, hogy ezek a kísérletek feltétlenül szükségesnek bizonyultak. Munkánk során megvizsgáltuk a rendelkezésünkre álló összes *Guignardia* faj összesen 27 törzsének citokróm-b szekvenciáit, hogy megállapítsuk, tartalmazzák-e az irodalomból ismert mutációk valamelyikét. Ezzel párhuzamosan fungicidet tartalmazó (azoxistrobin és krezoxim-metil, két különböző, kereskedelmi forgalomban kapható strobilurin származék) táptalajon teszteltük *Guignardia* törzseink fungicid-rezisztenciáját, valamint vizsgáltuk az alternatív légzési mechanizmus szerepét a gombák túlélésében. Kísérleteinkből kiderült, hogy az általunk vizsgált fajok egyetlen törzse sem tartalmazza a rezisztenciáért felelős pontmutációk egyikét sem. Egész pontosan semmilyen polimorfizmus nem volt detektálható fajokon belül, és a fajok között is igen kevés eltérést észleltünk. Ennek ellenére azonban a *G. aesculi* kivételével minden faj legalább egy törzse toleránsnak bizonyult az üzemi dózissal megegyező fungicid-koncentrációval szemben. Az ellenálló gombatörzsek mindkét hatóanyag esetében hasonlóan viselkedtek, méréseink szerint általában véve a krezoxim-metil kevésbé volt hatékony a gombák növekedésének gátlásában, mint az azoxistrobin (2. ábra).



2. ábra. A két vizsgált strobilurin hatóanyag *Guignardia* törzsekre gyakorolt gátló hatása. Az gátlási százalék kiszámításához az adott törzs kontrol telepének átmérőjét (7 nap növekedés után) osztottuk a kezelt telep átmérőjével (7 nap növekedés után) és ezt megszoroztuk százzal. Minden adatpont 3 független telep átmérőjének átlagát reprezentálja. [A törzsek betűkódjainak jelentése: Fp: Pécs (*Guignardia bidwellii*, szőlőről); F ill. Fe: Eger (*Guignardia bidwellii*, szőlőről); Gb1-29: Portugál *Guignardia bidwellii* törzsek (szőlőről); GbC-V: Olasz *Guignardia bidwellii* törzsek (szőlőről); ATCC+Gb111+Gb237: Törzsgyűjteményből származó *Guignardia bidwellii* törzsek (vadszőlőről); Gaes: *Guignardia aesculi*; Gg: *Guignardia gaultheriae*; Gc: *Guignardia citricarpa*; Gm: *Guignardia mangiferae*]

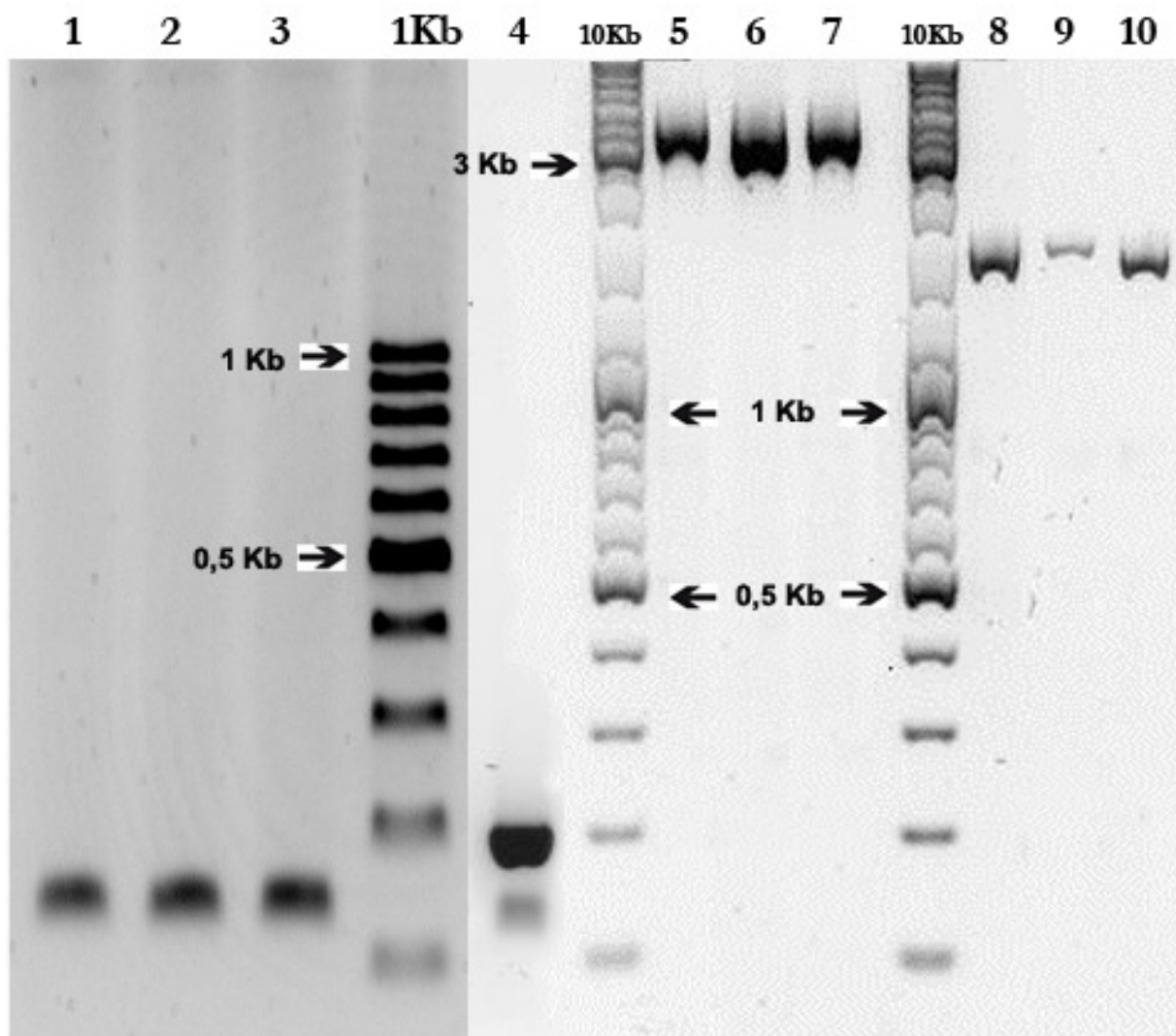
Mivel egy-egy fajon belül, teljesen azonos citokrómszekvenciával rendelkező törzsek mérgezett táptalajon való túlélő-képessége nagyon változó volt, arra a következtetésre jutottunk, hogy valószínűleg nem az elsődleges, hanem valamely alternatív légzési mechanizmus állhat a tapasztalt jelenség hátterében. Ezt a feltevést a másodlagos respiráció hatékony gátlása során vizsgáltuk. Az alternatív oxidázok gátlására irodalmi adatok szerint általánosan használt szer a SHAM (szalicil-hidroxámsav) (Hoffman és Wilcox, 2003).

Fungicid és SHAM együttes jelenléte a táptalajban tökéletesen visszاسzorította az előző kísérletben tapasztalt növényvédőszer-toleranciát és az eleve szenzitív törzsek is érzékenyek maradtak ilyen körülmények között (3. ábra). Következésképpen, a vizsgálatba bevont *Guignardia* fajokban az alternatív oxidázok fontos szerepet töltenek be a túlélésben a mitokondriális légzés elsődleges mechanizmusának sérülésekor.



3. ábra. A két vizsgált strobilurin hatóanyag *Guignardia* törzsekre gyakorolt gátló hatása alternatív légzés gátlószerrel (SHAM) kiegészítve. Az gátlási százalék kiszámításához az adott törzs kontrol telepének átmérőjét (7 nap növekedés után) osztottuk a kezelt telep átmérőjével (7 nap növekedés után) és ezt megszoroztuk százzal. Minden adatpont 3 független telep átmérőjének átlagát reprezentálja. [A törzsek betűkódjainak jelentése: Fp: Pécs (*Guignardia bidwellii*); F ill. Fe: Eger (*Guignardia bidwellii*); Gb1-29: Portugál *Guignardia bidwellii* törzsek; GbC-V: Olasz *Guignardia bidwellii* törzsek; ATCC+Gb111+Gb237: Törzsgyűjteményből származó *Guignardia bidwellii* törzsek; Gaes: *Guignardia aesculi*; Gg: *Guignardia gaultheriae*; Gc: *Guignardia citricarpa*; Gm: *Guignardia mangiferae*]

A fungicid gyártó egyik cég által támogatott kutatócsoport arra a következtetésre jutott, hogy *G. bidwellii*-ben valószínűtlen strobilurin-rezisztencia kialakulása, mivel a *Guignardia* nemzetségben a G143A aminosav-cseréért felelős pontmutáció exon-intron határra esik, ahol a szekvencia megváltozása meggátolná az intron kivágódását, és ez funkcióját veszített citokróm B fehérjét eredményez (Miessner és mtsai, 2011). A közleményben ez a következtetés azonban mindössze két, vadszőlőről izolált *G. bidwellii* törzs vizsgálatára épül, éppen ezért indokoltnak tartottuk a *Guignardia* fajok génszerkezetének alaposabb kutatását. A kérdéses intron köré tervezett fajspecifikus indítószekvenciákkal olyan termékeket állítottunk elő, amelyek elvileg a teljes intront tartalmazzák, majd ezek bázissorrendjét meghatároztuk, igazolva ezáltal, hogy a helyes génszakaszt szaporítottuk fel. Megállapítottuk, hogy Miessner és mtsai (2011) által leírt intron valóban jellemző a *Parthenocissus* fajokon élősködő *Guignardia* törzsekre, továbbá a *Citrus*-féléről izolált fajokra is. Nem találtunk azonban intront *G. aesculi* és *G. gaultheriae* fajokban, valamint a *Vitis vinifera*-ról származó *G. bidwellii* törzsekben (1. kép), tehát itt a fenti közlemény következtetése nem helytálló, ugyanis az intron hiánya miatt itt nem lehet kizárni a strobilurin származékokkal szembeni mutáció meglétét, illetve kialakulását.



1. kép. Különböző *Guignardia* fajokból kinyert genomi DNS-en elvégzett polimeráz láncreakció termékeinek gélelektroforézissel nyert képei. Intron hiányában, fajtól függően 150-200 bázispár hosszú termék keletkezik, ha az intron jelen van a méret több kilobázis (fajonként különbözik). [Genomi DNS eredete (faj és törzs): 1: *Guignardia aesculi* CBS törzs; 2: *Guignardia bidwellii* Fp11/5-ös pécsi törzs; 3: *Guignardia bidwellii* F60-as egri törzs; 4: *Guignardia gaultheriae* CBS törzs; 5-7: *Guignardia citricarpa* CBS törzsek; 8-10: *Guignardia mangiferae* CBS törzsek; 1Kb és 10Kb: molekulásúly markerek].

Összegésképpen kijelenthetjük, hogy kizárólag strobilurin származék hatóanyagú növényvédőszerrel *Guignardia* fertőzés ellen védekezni valószínűleg nem elegendő, viszont más fungiciddal kombinálva még hatékony lehet. A második részfeladat kísérleteiből levont

következtetések szorosan integrálhatók ennek a tudományterületnek a kurrens kutatási eredményei közé.

A harmadik részfeladat patogenitásért felelős gének keresése volt *Guignardia* fajoknál. Szubsztrakciós hibridizáció módszerével hasonlítottunk össze egy nem patogén (*G. mangiferae*) és egy patogén (*G. citricarpa*) *Guignardia* fajt transzkriptóm szinten. A két tesztelt faj filogenetikailag igen közel áll egymáshoz, és mindkét faj megtalálható *Citrus*-féléken, tehát gazdanövényeik köre átfed. Különbség a vizsgált fajok életmódjában mutatkozik, ugyanis a *G. mangiferae* ártalmatlan endofiton, gazdanövényein enyhe tüneteket okoz, ezzel szemben a *G. citricarpa* jelentős kórokozó, melynek fertőzését erős tünetek (nekrózis) és a gazdanövény jelentős termés-csökkenése jellemzik (Gliénke és mtsai, 2011). A szubsztrakciós eljárás lényege, hogy két transzkriptóm összevetése során kizárólag a tesztelt mintában megnyilvánuló szekvenciákat eredményez és minden átfedő cDNS-t eliminál. A detektált különbségek (mintegy 60-70 egyedi szekvenciát izoláltunk) patogenitásban való szerepét a későbbiekben, egy új pályázat keretein belül részletesen tovább szeretnénk vizsgálni.

Összegzésképpen kijelentem, hogy a pályázatban eltervezett munkát elvégeztük, a kitűzött célokat elértük, illetve a második részfeladatnál, a projekt új kérdéseket vetett fel, és ennek megfelelően tovább is léptünk az eredeti terveken, ami által az adott problémát mélyrehatóbban tudjuk prezentálni. Eredményeinket mindenképpen rangos nemzetközi tudományos folyóiratokban szeretnénk közzé tenni, ezért törekedtünk arra, hogy az általunk publikált munka teljes értékű, változatos kísérleteken alapuló következtetésekre épüljön. Mivel a pályázatra szánt időből kifutottunk, élnék azzal a lehetőséggel, hogy munkámat újra bírálják a publikációk megjelenése után.

Irodalomjegyzék

Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., and Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 649–662.

Fernández-Ortuño, D., Torés, J.A., de Vicente, A., and Pérez-García, A. (2008). Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Pest Manag. Sci.* 64, 694–702.

Gisi, U., Chin, K.M., Knapova, G., Küng Färber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H., and Steinfeld, U. (2000). Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Prot.* 19, 863–872.

Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery, A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 859–867.

Glienke, C., Pereira, O.L., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunnington, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z., and Crous, P.W. (2011). Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 26, 47–56.

Heaney, S.P., Hall, A.A., Davies, S.A., and Olaya, G. (2000). Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. (British Crop Protection Council), pp. 755–762.

Hoffman, L.E., and Wilcox, W.F. (2003). Factors Influencing the Efficacy of Myclobutanil and Azoxystrobin for Control of Grape Black Rot. *Plant Dis.* 87, 273–281.

Kraiczky, P., Haase, U., Gencic, S., Flindt, S., Anke, T., Brandt, U., and Von Jagow, G. (1996). The Molecular Basis for the Natural Resistance of the Cytochrome bc₁ Complex from Strobilurin-Producing Basidiomycetes to QoI Inhibitors. *Eur. J. Biochem.* 235, 54–63.

Miessner, S., Mann, W., and Stammler, G. (2011). *Guignardia bidwellii*, The causal agent of black rot on grapevine has a low risk for QoI resistance. *J. Plant Dis. Prot.* 118, 51–53.

Miguez, M., Reeve, C., Wood, P.M., and Hollomon, D.W. (2004). Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest Manag. Sci.* 60, 3–7.

Molitor, D., and Beyer, M. (2014). Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications – a review. *Ann. Appl. Biol.* 165, 305–317.

Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., and Gisi, U. (2000a). Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc₁ enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Manag. Sci.* 56, 833–841.

Sierotzki, H., Wullschleger, J., and Gisi, U. (2000b). Point Mutation in Cytochrome b Gene Conferring Resistance to Strobilurin Fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* Field Isolates. *Pestic. Biochem. Physiol.* *68*, 107–112.

Wicht, B., Petrini, O., Jermini, M., Gessler, C., and Brogini, G.A.L. (2012). Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete *Guignardia bidwellii*, agent of grape black rot: a polyphasic approach to fungal identification. *Mycologia* *104*, 1036–1045.

Xu, T., Wang, Y.-T., Liang, W.-S., Yao, F., Li, Y.-H., Li, D.-R., Wang, H., and Wang, Z.-Y. (2013). Involvement of alternative oxidase in the regulation of sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to the fungicides azoxystrobin and procymidone. *J. Microbiol.* *51*, 352–358.