

ZÁRÓJELENTÉS

Projekt címe: Behurcolt, megtelepedett és új *Phytophthora*-fajok vizsgálata

OTKA-azonosító: K101914

Projekt időtartama: 2012. március 1. – 2017. február 28. (4 + 1 év)

OTKA-támogatás: 27,44 MFt

Készítette: Dr. Bakonyi József CSc, témavezető

Budapest, 2017. március 30.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	2
2. VÁLTOZÁSOK A RÉSZTVEVŐK SZEMÉLYI ÖSSZETÉTELÉBEN	2
3. VÁLTOZÁSOK A PROJEKT MUNKATERVÉBEN	3
4. A PÁLYÁZAT CÉLKITŰZÉSEI	3
5. EREDMÉNYEK ÉS PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG	4
5.1. A <i>Phytophthora cambivora</i> <i>genetikai változékonysága</i>	4
5.2. A <i>fitoftórák</i> 6-os ITS kládjába tartozó izolátumok <i>filogenetikája</i>	6
5.3. Fás szárú dísznövényekről izolált <i>fitoftórák</i> azonosítása	7
5.4. A <i>fitoftórák</i> 7-es ITS kládjába tartozó új fajok és közeli rokon <i>fitoftórák</i> <i>filogenetikája</i>	8
5.5. <i>Patogenitási/agresszivitási vizsgálatok</i>	9
6. PUBLIKÁCIÓK	12
7. MELLÉKLETEK	14

1. BEVEZETÉS

A gombaszerű, de algákkal rokon, elsősorban talajlakó növénykórokozó *Phytophthora*-fajok világszerte súlyos károkat okoznak mezőgazdasági, kertészeti, erdészeti kultúrákban és természetes élőhelyeken. Pályázatunk kezdetekor (2012) a világon kevéssel több, mint 100 fitoftórafajt ismertünk, de csak alig néhányuk hazai előfordulásáról volt adat. A legtöbb fitoftórafaj őshonos élőhelyét nem ismerjük, ugyanakkor az egyre intenzívebb nemzetközi kereskedelem jelentősen hozzájárul az egzotikus növények és kórokozók globális terjedéséhez. Számos olyan fitoftórát ismerünk, melyek Európába történő bekerülésük után súlyos károkat okoztak. A kórokozócsoport gazdasági és ökológiai szerepe feltétlenül indokolja alapos tanulmányozásukat.

2. VÁLTOZÁSOK A RÉSZTVEVŐK SZEMÉLYI ÖSSZETÉTELÉBEN

Szabó Lászlóné asszisztens, kinek feladatául a mintegy félezer izolátumból álló fitoftóra törzsgyűjtemény fenntartását terveztük, a pályázat megkezdése előtt nyugdíjba vonult. Szigethy András tudományos segédmunkatárs váratlanul távozott intézetünkéből a 2. munkaszakasz elején (2013 áprilisában). A kieső munkatársak feladatait a többi résztvevő és a témavezető vette át, ill. két hónapig alkalmaztuk Németh Márk egyetemi hallgatót, valamint 2013 szeptemberétől az EIK-2697/2013.04.26. sz. engedély alapján csatlakozott hozzánk Seress Diána MSc diplomás asszisztensként. A személyi változások jártak bizonyos hátrányokkal, pl. Seress Diána belépéséig 1 fővel kevesebben dolgoztunk a témán, ill. az új munkatársaknak hozzá kellett szokni laboratóriumunk környezetéhez. E hátrányokat igyekeztünk kompenzálni, a tervezett laboratóriumi munkákat sikerült elvégezni, de vannak még nem publikált eredmények. Ennek oka részben a tudományos segédmunkatárs távozása, részben pedig az, hogy az utolsó munkaszakaszban végzett fertőzési tesztek eredményeit is szeretnénk beépíteni a tervezett cikkekbe.

3. VÁLTOZÁSOK A PROJEKT MUNKATERVÉBEN

A második munkaszakaszban, a *Phytophthora cambivora* populációinak vizsgálata során pozitív meglepetésként ért bennünket, hogy gyűjteményünkben egy olyan izolátumra bukkantunk, amely morfológiailag hasonló a *P. cambivora* fajhoz, de izoenzim genotípusa egyedi. Emellett Dr. Thomas Jung (Phytophthora Research and Consultancy, Nußdorf, Németország) küldött munkánkhoz olyan izolátumokat, amelyekről kiderült, hogy a *P. cambivora* közeli rokonai és több új fajt képviselnek. Az új fajok formális leírásához szükséges vizsgálatokat célszerű volt gyorsan elvégezni, s mivel ez jelentős többletfeladatot jelentett, a projektet az EIK-7355/2014.12.19. sz. engedély alapján egy évvel meghosszabbítottuk, az eredeti éves munkaterveket pedig oly módon módosítottuk, hogy a fajok leírásával kapcsolatos új feladat képezte a módosított 3. munkaszakaszt, az eredeti 3. és 4. munkaszakaszokat pedig egy évvel eltoltuk.

4. A PÁLYÁZAT CÉLKITŰZÉSEI

- Az idegenhonos, sokgazdás és világszerte elterjedt *Phytophthora cambivora* genetikai változékonyságának vizsgálata.
- Hazai égeresek gyökérszónájából származó, a fitoftórák ún. 6-os ITS kládjának egy új fajtát képviselő izolátumaink filogenetikai pozíciójának megállapítása, patogenitásuk/agresszivitásuk vizsgálata.
- Fás szárú dísznövényekről korábbi években izolált fitoftóráink azonosítása és patogenitásuk/agresszivitásuk vizsgálata, különös tekintettel a *P. xpelgrandis* természetes fajhibridre.
- A fitoftórák ún. 7-es ITS kládjába tartozó új fajok és közelrokon fitoftórák többgénese filogenetikai elemzése, és az új fajok formális leírása.

5. EREDMÉNYEK ÉS PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

5.1 A *Phytophthora cambivora* *genetikai változékonysága*

A *P. cambivora* valamennyi lakott kontinensen előforduló inváziós fajnak tekintett polifág talajlakó kórokozó. Európába a XVIII. században hurcolták be, megtelepedését követően a szelídgesztenye tintafolyásos betegségének egyik okozójaként vált ismertté, de számos növényfajra is károsító hatású. A fás szárú fajokon okoz kéréregelhalásokat a gyökéren, törzsön és hajtásokon. Előfordul csemetekertekben, gyümölcsösökben, faiskolákban, erdőkben stb. Mindezek ellenére eddig kevés figyelmet szenteltek e kórokozó populációszerkezetének és genetikai polimorfizmusainak vizsgálatára. Mi a COST FP0801 'Established and Emerging *Phytophthora*: Increasing Threats to Woodland and Forest Ecosystems in Europe' projekt résztvevőiként tanulmányoztuk az izoenzim- és mitokondriális DNS-polimorfizmusokat mintegy 130 *P. cambivora* izolátumban, melyek 4 földrészt (Ausztrália, Ázsia, Európa, Észak-Amerika), 16 országot és 23 élőhely-típust/gazdanövényt képviseltek. Emellett különböző földrészekről származó 14 izolátum sejtmagi riboszomális DNS ITS, β -tub és hsp90 génszakaszának szekvencialízisét végeztük el.

Az izoenzimeket és alléljeiket cellulóz-acetát-gélelektroforézissel választottuk el. Összesen 11 izoenzimet (adenilát-kináz, akonitáz, almasav-dehidrogenáz, fruktóz-1-6-difoszfátáz, glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, glükóz-6-foszfát-izomeráz, hexokináz, izocitrát-dehidrogenáz, peptidáz, szuperoxid-dizmutáz és tejsav-dehidrogenáz) teszteltünk 5 különböző pufferben. A módszer 5 lokusz alléljeinek elválasztását tette lehetővé. Jellemző volt egy-egy izoenzim genotípus dominanciája valamennyi lokuszban. Az 5 lokusz együttese alapján 11 többlokuszos genotípust azonosítottunk, melyek közül kettő a minták 75 százalékában fordult elő a vizsgált kontinensek többségén. A fennmaradó, kisebb gyakoriságú többlokuszos genotípusok eltérő földrészekről származtak. Hasonló megfigyelést tettünk a mitokondriális DNS-haplotípusok eloszlására vonatkozóan. Egyetlen haplotípus képviselte az izolátumok 60 százalékát, a fennmaradók döntő hányada pedig csak egyszer fordult elő. A domináns haplotípus azokon a kontinenseken volt gyakori, ahol a domináns izoenzim genotípusok.

Úgy tűnik, hogy a *P. cambivora* néhány genotípusa terjedt el világszerte, míg egyes kevésbé gyakori genotípusai bizonyos földrajzi régiókra jellemzőek. A gyakoribb genotípusokat számos különböző növényfajról gyűjtöttük, ezért valószínűbbnek tartjuk, hogy nem gazdaspecifikusság, hanem más tényező(k) (pl. nagyobb agresszivitás) miatt alakulhatott ki ez a struktúra. Kísérleteink a *P. cambivora* vonatkozásában a világon az első nagyobb léptékű populációs vizsgálatok.

Mivel a téma része volt a kutatást közvetlenül nem támogató COST FP0801 projektben vállalt feladatainknak, az időigényes előkészítő jellegű munkákat (pl. izolátumok tenyésztése, micéliumpor készítése) pályázatunk 2011-es benyújtása és a projekt 2012-es kezdete közötti időszakban sikerült elvégezni. Ez lehetővé tette, hogy részeredményeinket bemutassuk az V. Magyar Mikológiai Konferencián (Budapest, 2012) egy poszteren (Szigethy és mtsai 2012; 1. melléklet), valamint egy idegen nyelvű előadásban a COST FP0801 projekt záróértekezletén (Brüsszel, 2012. november). Utóbbiról nem készült absztraktfüzet vagy kiadvány, ezért nem tüntettük föl publikációs listánkban sem. Tervezzük egy angol nyelvű impakt faktoros folyóiratcikk megjelentetését is a projekt zárását követő két éven belül, hogy a végső minősítéskor azt is figyelembe lehessen venni.

Meglepő módon a 14 kiválasztott izolátumban a sejtmagi DNS-szakaszok nagymértékű polimorfizmusait figyeltük meg. Hipotézisünk szerint, a *P. cambivora* inkább lehet fajhibrid eredetű, mintsem heterozigóta diploid faj. Ezért javasoltuk a hibrid eredetre utaló „*P. xcambivora* (Petri) Buisman (pro sp.)” elnevezést a kórokozóra, melynek egy új típusizolátumát is leírtuk (Jung és mtsai 2017a).

Nem tartozik a genetikai változékonyság témaköréhez, de említésre érdemesnek tartom azt, hogy 2016 őszén Dr. Koltay Andrással (NÉBIH, ERTI) közösen azonosítottuk a *P. cambivora* fajt az Északi-középhegységben súlyos kéregnekrózisoktól szenvedő bükkfáról. Tudomásunk szerint ez a kórokozó első hazai megfigyelése ezen a gazdanövényen. Úgy tűnik, jelenleg ez csak tudományos érdekesség, mert a környező fák egészségesnek tűntek.

5.2. A fitoftórák 6-os ITS kládjába tartozó izolátumok filogenetikája

A fitoftórák 6-os ITS kládjába tartozó taxonok néhány szántóföldön, többsége azonban főleg vízzel borított, ill. nedves élőhelyeken, patakpartok közelében, erdőkben és ember által kevésbé bolygatott ökoszisztémákban fordul elő. Egyesek súlyos növényi betegségek okozói, mások kevésbé veszélyesek. Vizsgálataink tárgyát a mások által korábban elnevezett „*P. taxon forestsoil*” és a hozzá morfológiailag nagyon hasonló, de tőle az rDNS ITS négy pozíciójában különböző „*P. taxon hungarica*” informálisan elnevezett taxonok képezték. Mindkettejüknek csupán néhány izolátuma ismert. Előbbit egy franciaországi gyertyános-tölgyesből gyűjtötték 1998-ban, majd magunk is izoláltuk hazai égeresből. Utóbbi szintén hazai égeresekben találtuk meg, majd azonosították alaszakai éger- és lengyelországi kőrisállományokban. Pályázatunkban a két taxon és közelrokon fajok filogenetikai elemzését végeztük. Összességében 18 taxon több mint 30 izolátumának rDNS ITS, β -tub, tef1a, hsp90, nadh1 és cox1 régióinak direkt vagy klónozást követő DNS-szekvenciaanalízise alapján készítettünk maximális parszimónián és Bayes-i statisztikán alapuló törzsfákat. A szekvenciák döntő hányada saját, kisebb része génbanki adat volt.

Az új filogenetikai, valamint korábbi morfológiai és telepnövekedési adataink együttes figyelembevételére alapján föltételezzük, hogy a „*P. taxon forestsoil*” és „*P. taxon hungarica*” valójában ugyanannak a fajnak két genetikai vonalát képviselik. Sőt, az egyikésként ismert β -tub és hsp90 génjeikben azonosított több egyedi és rekombináns haplotípus felveti annak lehetőségét, hogy valójában egy fajhibrid, melynek szülőfajai egyelőre ismeretlenek. Sajátos morfológiai jegyük az oospóráikban található több nagy ooplaszt, ezért a „*Phytophthora xmultiglobulosa*” néven tervezzük a fajt leírni. Eredményeinket részletesebben a 60. Növényvédelmi Tudományos Napokon (Bakonyi és mtsai 2014; 2. melléklet) és egy nemzetközi IUFRO-konferencián (Córdoba, 2012) mutattuk be. Természetesen ebből a munkából is tervezzük egy angol nyelvű impakt faktoros folyóiratcikket a projekt zárását követő két éven belül. A kézirat jelenleg 70%-os készültségi állapotban van.

5.3 Fás szárú dísznövényekről izolált fitoftórák azonosítása

Feladataink között szerepelt korábbi hazai gyűjtéseinkből visszamaradó, fás szárú dísznövényekről izolált 150 fitoftóraizolátum fajszerű azonosítása a célból, hogy a már meglévő adatainkkal együtt felmérjük a hazai fitoftórák fajösszetételét, elterjedését és gazdanövényeit elsősorban fás szárú dísznövények között. A morfológiai jegyek és rDNA ITS vagy Cox1 szekvenciák alapján valamennyi izolátumunkat sikerült valamelyik ismert fajhoz vagy leírás előtt álló fitoftórához sorolni. Jó hír, hogy hazánkban még mindig nem találtuk meg a Nyugat-Európában számos dísznövényt károsító, igen veszélyes inváziós *P. ramorum* fajt. Rossz hír viszont, hogy egy kereskedelmi áruházlánc által importált dísznövényen azonosítottuk a világ 100 legveszélyesebb inváziós faja közé sorolt *P. cinnamomi*. Meglátásom szerint most már összegyűlt annyi adat, amely elegendő egy impakt faktoros közleményhez a hazai fás dísznövényeken előforduló fitoftórákról. A kézirat összeállítása folyamatban van. Ugyanakkor saját adataink révén társszerzők vagyunk egy Európában mérföldkőnek tekinthető tanulmány elkészítésében, amely a fás szárú növényeket előállító európai csemetekertek fitoftórák fertőzöttségéről és annak kihatásairól nyújt átfogó képet. A *Forest Pathology* folyóiratban megjelent tanulmány (Jung és mtsai 2016) az említett COST FP0801 projekt keretein belül készült, országonkénti alapadatokat nem közöl, ezért a nemzeti kutatásokat támogató szervezetek feltüntetésére sajnos nem volt mód.

Kiemelt figyelmet fordítottunk a *P. xpelgrandis* (*P. nicotianae* x *P. cactorum* természetes fajhibridje) első hazai izolátumaira, melyeket hamisciprusról, levenduláról és puszpángról gyűjtöttünk 2008–2009-ben. Hollandiai dísznövényeken figyeltek fel először a *P. nicotianae* x *P. cactorum* fajhibridre a 2000-es évek elején, majd írták le muskátliról származó német izolátumait *P. xpelgrandis* néven 2009-ben. A fajleírás azonban nem teljesen illett sem a hollandiai, sem pedig saját hazai izolátumainkra. Ezért a *P. xpelgrandis* típusizolátumát, 4 hazai, 5 hollandiai, 2 olaszországi és 2 tajvani autentikus *P. nicotianae* x *P. cactorum* törzset, valamint a szülőfajok 2-2 izolátumát részletes morfológiai, fiziológiai (telepnövekedés és hőmérséklet viszonya) és molekuláris genetikai (izoenzimanalízis, ITS-RFLP, ITS-klónok szekvenálása, mtDNA-RFLP, β -tub szekvenálása) vizsgálatoknak vetettük alá, részben hogy jellemezzük hazai izolátumainkat, részben pedig hogy tisztázzuk a *P. xpelgrandis* morfológiai leírása körüli ellentmondásokat. Próbálkoztunk további

hazai hibridizolátumok gyűjtésével fás dísznövényekről 8 helyszínen, de a kitenyésztett 57 fitoftóraizolátum egyike sem tartozott a keresett patogénhez. Úgy tűnik, ennek a hibridnek a hazai előfordulása jelenleg még korlátozott.

A *P. xpelgrandis* hazai előfordulását a *Plant Disease* folyóirat "Disease Notes" rovatában közzétettük (Szigethy és mtsai 2013). Az ilyen jellegű tudományos közlemények impakt faktorát a hazai szakma ma már nem tekinti beszámíthatónak, ezért az IF-értéket nem tüntettem fel a jelentésünkben. Az olasz izolátumokra vonatkozó részeredményeinket egy impakt faktoros folyóiratcikk társszerzőiként publikáltuk a *Plant Disease* szaklapban (Faedda és mtsai 2013). A *P. xpelgrandis* fajleírásával és a különböző országokból és gazdanövényekről származó hibridizolátumok összehasonlításával kapcsolatos eredményeinkről pedig egy impakt faktoros saját folyóiratcikket tervezünk készíteni a közeljövőben.

Szintén a fás szárú dísznövényekről izolált fitoftórák témaköréhez kapcsolódik, hogy társszerzőként részt vettünk a *P. niederhauserii* sp. nov. faj leíró nemzetközi csoport munkájában. Jelen pályázat során további 4 olasz izolátum részletes morfológiai és fiziológiai jellemzését végeztük, valamint a kézirat véglegesítésébe vettünk részt, amely mostanra nyomtatott formában is megjelent a *Mycologia* folyóiratban (Abad és mtsai 2014).

5.4 A fitoftórák 7-es ITS kládjába tartozó új fajok és közelrokon fitoftórák filogenetikája

A módosított munkaterv feladata volt a fitoftórák 7-es ITS kládjába tartozó új fajok filogenetikájának tanulmányozása. Az új fajok izolátumai tajvani természetes ökoszisztémákból származtak, ahol nem okoztak jelentős károkat, valószínűleg a gazda–patogén koevolúció következtében. Egyes vélemények szerint Ázsiában lehet számos fitoftóra géncentruma.

Három sejtmagi (rDNS ITS, β -tub, hsp90) és két mitokondriális (cox1 és nadh1) génszakasz vizsgáltunk. Tizenhat fitoftórafaj 88 izolátumából összesen 688 szekvenciát határoztunk meg, beleértve a polimorf 3 sejtmagi génszakasz 284 klónját. Összesítettük az intra- és interspecifikus polimorfizmusokat, az egyes szekvencia-haplotípusok gyakoriságát, ill. „Maximum Likelihood” és Bayes-i

filogenetikai elemzéseket végeztünk. A törzsfák elkészítésében Dr. Kovács M. Gábor (ELTE, Biológiai Intézet, Növény szervezettani Tanszék) volt segítségünkre.

Az eredmények igazolták 4 új fitoftórafaj és 2 ismeretlen eredetű fajhibrid önálló filogenetikai státusát, megerősítvén számos erdészeti fitoftóra ázsiai eredetével kapcsolatos elképzeléseket. Adatainkat a *Persoonia* és *Plant Pathology* folyóiratokban közöltük, valamint egy poszteren mutattuk be (Jung és mtsai 2017a,b,c).

Csoportunk nemrég kapott meghívást a Katániai, Sassari-i és Algarve-i egyetemek részéről, hogy vegyen részt további három 7. ITS-kládba tartozó új fitoftórafaj filogenetikai vizsgálatában. Ehhez összesen 28 izolátum fent említett 5 génszakaszát szekvenáltuk és készítettük elő génbanki deponálásra. E kisebb munkából várhatóan egy társszerzős folyóiratcikk fog születni a közeljövőben.

5.5 Patogenitási/agresszivitási vizsgálatok

Az utolsó munkaszakaszban vizsgáltuk a 6-os ITS-kládba tartozó, valamint a fás szárú dísznövényekről izolált fitoftóráink patogenitását/agresszivitását laboratóriumi/üvegházi kísérletekben gyökerek sebzés nélküli és/vagy szárdarabok sebzéses fertőzésével. Előbbi esetben az ültetőközegbe előre kialakított lyukakba juttattunk micéliummal benőtt köles magokat, utóbbiban pedig a sebekbe micéliumos agarkorongokat helyeztünk. Izolátumaink agresszivitását száraz gyökértömegmérésekkel, illetve a kéregszövetben okozott nekrozis mérete alapján határoztuk meg. Adatainkat a fentiekben már említett publikációinkba fogjuk beépíteni.

Összesen 18 fitoftóra 37 izolátumával fertőztünk (1. táblázat). Megfigyeléseink szerint

- néhány faj (*P. citrophthora*, *P. citricola* „E”, *P. cinnamomi*, *P. plurivora*, *P. cambivora*) viselkedett a legagresszívebben a tesztnövények többségén,
- a 6-os ITS-kládba tartozó fajok (*P. gonapodyides*, *P. inundata*, *P. lacustris*, *P. megasperma* és *P. xmultiglobulosa* nom. prov.) csak gyengén fertőzték a növényeket, ami jó hír, mert a klád tagjainak többsége meglehetősen gyakori erdők és természetes élőhelyek talajaiban, patakvizekben és egyéb nedves környezetben,

- a *P. xpelgrandis* fajhibrid a legsúlyosabb fertőzést muskátlin és babérmeggyen okozta, egyértelműen erősebben fertőzte a muskátlit, mint szülőfajai (*P. cactorum* és *P. nicotianae*), az egyéb tesztnövények többségét pedig alig fertőzte.

1. táblázat. Fitóftórák patogenitása/agresszivitása (1=gyenge; 3=közepes; 5=erős) gazdanövényenként legalább két független kísérlet átlaga alapján¹

Fitóftórafaj (izolátumok száma)	alma	aranyvessző	babérmeggy	bükk	éger	gesztenye	hamisciprus	kocsánytalan tölgy	körte	levendula	muskáti	orgona	puszpáng	szil	szilva	tiszafa
<i>P. cactorum</i> * (2)	3	1	3	2	1,5	2,5	2	2	2	1,5	1	1	1,5	2	1,5	2
<i>P. cambivora</i> * (2)	3	1	3	3	2	3	2	3	2	nt	nt	2,5	2	3	2	2
<i>P. cinnamomi</i> * (2)	3	3	3,5	2	2	3,5	3,5	3	2,5	nt	nt	2,5	3	1	2	3
<i>P. citricola</i> * „E” (1)	2	3	4	3	2,5	2,5	3	2	2,5	nt	nt	3	3	3	2,5	3
<i>P. citrophthora</i> * (2)	2,5	3,5	4	3	2	3	3	2	2	nt	nt	4	3	3	2	3
<i>P. cryptogea</i> * (2)	2	3,5	2,5	2	1,5	2,5	2	2	2	nt	nt	3,5	2,5	3,5	1,5	3
<i>P. gonapodyides</i> * (2)	1	1	2	1	1	1	1	1	1	nt	nt	1,5	1	1	1	1
<i>P. inundata</i> (2)	1,5	1,5	1	1	1	1	1	1	1	nt	nt	2	2	1	1,5	1
<i>P. lacustris</i> (1)	1,5	1	2	1	1	1	1	1	1	nt	nt	1	1	2	1	1
<i>P. megasperma</i> (2)	2	3	2	1	1,5	1,5	2	2	2	nt	nt	2,5	1	1	2	2
<i>P. xmultiglobulosa</i> nom. prov. (5)	1,5	2,5	2	1	1,5	1,5	1	2	1,5	nt	nt	3	1	1	2	1
<i>P. multivora</i> (1)	2,5	3	3	1	2	2	2	2	2,5	nt	nt	3	2	2	2,5	3
<i>P. nicotianae</i> (2)	2	1	2	1	1	1,5	2	1	1,5	1,5	1	1	1	1	1	1
<i>P. pini</i> (2)	2	2	2	2	1	2	2	1	2	nt	nt	3	2	1	1,5	2
<i>P. xpelgrandis</i> (4)	1,5	1,5	3	1	1	1	2	1	1	2,5	3	1,5	2	1	1	1
<i>P. plurivora</i> * (2)	2,5	2,5	3,5	3	2	2,5	3	2	2,5	nt	nt	2	3,5	2,5	2	3
<i>P. pseudosyringae</i> (1)	1	1	2	1	1	1	1	1	1	nt	nt	1	1	1	1	1
<i>P. syringae</i> (2).	1	1	1	1	1	1	1	1	1	nt	nt	1	1	1	1	1

¹ A levendulát és a muskátlit talajinokulációval fertőztük, a többi növényfajt szárdarabok sebzéses inokulációjával; nt=nem tesztelt.

* Európában inváziós vagy idegenhonos fajok (forrás: <http://www.europe-aliens.org/default.do>).


6. PUBLIKÁCIÓK (a pályázat résztvevői félkövér betűvel jelölve)

- Abad, Z.G., Abad, J.A., Cacciola, S.O., Pane, A., Faedda, R., Moralejo, E., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., Alvarez-Bernaola, L.A., **Bakonyi, J.**, Józsa, A., Herrero, M.L., Burgess, T.I., Cunningham, J.H., Smith, I.W., Balci, Y., Blomquist, C., Henricot, B., Denton, G., Spies, C., McLeod, A., Belbahri, L., Cooke, D., Kageyama, K., Uematsu, S., Kurbetli, I. and Değirmenci, K. 2014. *Phytophthora niederhauserii* sp. nov., a polyphagous species associated with ornamentals, fruit trees and native plants in 13 countries. *Mycologia* 106 (3), 431–447. DOI: 10.3852/12-119. **IF:2,471**
- Bakonyi, J.**, **Nagy, Z.Á.**, Burgess, T., **Szigethy, A.**, Nechwatal, J., Koltay, A., Woodward, S., Belbahri, L. and Jung, T. 2012. Characterisation of the two informally designated ITS Clade 6 taxa *Phytophthora* taxon Forestsoil and *P. sp. hungarica*. 6th IUFRO Meeting Working Party 7.02.09 *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*, Córdoba, Spain, 9–14 September, 2012. Poster abstract, p. 83. http://iufrophytophthora2012.org/downloads/IUFRO2012_BookofAbstracts.pdf
- Bakonyi, J.**, **Nagy, Z.Á.**, Burgess, T., **Szigethy, A.**, Nechwatal, J., Koltay, A., Belbahri, L. és Jung, T. 2014. Két informális fitoftóra, a „*P. taxon Forestsoil*” és a „*P. taxon hungarica*” fenotípusos és molekuláris genetikai jellemzése. In: Horváth, J., Haltrich, A. és Molnár, J. (szerk.) 60. *Növényvédelmi Tudományos Napok*, Budapest, 2014. február 18–19., összefoglaló (abstract), p. 100. <http://www.magyarovenyvedelmitarsasag.hu/60NTN/NTN60Kiadvany.pdf>
- Faedda, R., Cacciola, S.O., **Szigethy, A.**, **Bakonyi, J.**, Man in't Veld, W.A., Martini, P., Pane, A., Schena, L. and Magnano di San Lio, G. 2013. *Phytophthora* × *pelgrandis* causes root and collar rot of *Lavandula stoechas* in Italy. *Plant Disease* 97 (8), p. 1091–1096. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1035-RE>. **IF:2,742**
- Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A.G., Aguín Casal, O., **Bakonyi, J.**, Cacciola, S.O., Cech, T., Chavarriaga, D., Corcobado, T., Cravador, A., Decourcelle, T., Denton, G., Diamandis, S., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Franceschini, A., Ginetti, B., Green, S., Glavendekić, M., Hantula, J., Hartmann, G., Herrero, M., Ivic, D., Horta Jung, M., Lilja, A., Keca, N., Kramarets, V., Lyubenova, A., Machado, H., Magnano di San Lio, G., Mansilla Vázquez, P. J., Marçais, B., Matsiakh, I., Milenkovic, I., Moricca, S., **Nagy, Z.Á.**, Nechwatal, J., Olsson, C., Oszako, T., Pane, A., Paplomatas, E. J., Pintos Varela, C., Prospero, S., Rial Martínez, C., Rigling, D., Robin, C., Rytönen, A., Sánchez, M.E., Sanz Ros, A.V., Scanu, B., Schlenzig, A., Schumacher, J., Slavov, S., Solla, A., Sousa, E., Stenlid, J., Talgø, V., Tomic, Z., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettrano, A.M., Wenneker, M., Woodward, S., Pérez-Sierra, A. 2016. Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathology* 46 (2), 134–163. doi: 10.1111/efp.12239, 2016. **IF:1,437**

- Jung, T., Jung, M.H., Scanu, B., **Seress**, D., Kovács, G.M., Maia, C., Pérez-Sierra, A., Chang, T-T., Chandelier, A., Heungens, K., van Poucke, K., Abad-Campos, P., Léon, M., Cacciola, S.O., **Bakonyi**, J. 2017a. Six new *Phytophthora* species from ITS Clade 7a including two sexually functional heterothallic hybrid species detected in natural ecosystems in Taiwan. *Persoonia* 38: 100–135. DOI: 10.3767/003158517X693615. **IF:5,725**
- Jung, T., Jung, M.H., Scanu, B., **Seress**, D., Kovács, G.M., Maia, C., Pérez-Sierra, A., Chang, T-T., Chandelier, A., Heungens, K., van Poucke, K., Abad-Campos, P., Léon, M., Cacciola, S.O., **Bakonyi**, J. 2017b. Hat új fitoftórafaj természetes ökoszisztémákból. In: Horváth, J., Haltrich, A. és Molnár, J. (szerk.) *63. Növényvédelmi Tudományos Napok*, Budapest, 2017. február 21–22., p. 90. (poszter összefoglaló).
- http://www.magyarovenyvedelmitarsasag.hu/63NTN/NTN_63_kiadvany.pdf
- Jung, T., Chang, T.T., **Bakonyi**, J., **Seress**, D., Pérez-Sierra, A., Yang, X., Hong, C., Scanu, B., Fu, C. H., Hsueh, K.L., Maia, C., Abad-Campos, P., Léon, M., Horta Jung M. 2017c. Diversity of *Phytophthora* species in natural ecosystems of Taiwan and association with disease symptoms. *Plant Pathology* 66, 194–211. doi:10.1111/ppa.12564. **IF:2,383**
- Szigethy**, A, **Nagy**, Z.Á., Werres, S. és **Bakonyi**, J. 2012. A *Phytophthora cambivora* genetikai változékonysága izoenzim- és mitokondriális DNS RFLP-vizsgálatok alapján. V. Magyar Mikológiai Konferencia. 2012. május 23–25. Budapest. *Mikológiai Közlemények – Clusiana*. 51 (1), 83–84. (poszter összefoglaló).
- Szigethy**, A., **Nagy**, Z.Á., Vettraino, A.M., Józsa, A., Cacciola, S.O., Faedda, R. and **Bakonyi**, J. 2013. First report of *Phytophthora* × *pelgrandis* causing root rot and lower stem necrosis of common box, lavender and Port-Orford-cedar in Hungary. *Plant Disease (Disease Note)* 97 (1), p. 152. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0662-PDN>

7. MELLÉKLETEK

1. melléklet (Szigethy és mtsai 2012)





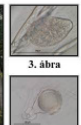

A *PHYTOPHTHORA CAMBIVORA* GENETIKAI VÁLTOZÉKONYSÁGA IZOENZIM- ÉS MITOKONDRIÁLIS DNS RFLP-VIZSGÁLATOK ALAPJÁN

Szigethy András¹, Nagy Zoltán Árpád¹, Werres Sabine², Bakonyi József¹

¹MTA ATK Növényvédelmi Intézet, 1022 Budapest, Herman Ottó út 15.; bakonyi.jozsef@agrar.mta.hu
²Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Julius Kühn Institute - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig, Germany

A *Phytophthora cambivora* (Petr) Buisman (Oomycota-törzs) számos növénynemzettség fajtát fertőző, világszerte előforduló talajlakó kórokozó (1). Életmódjából adódóan elsősorban gyökérrothadást, törzs- és szárszöveti nekrotizásokat okoz erdők, kertészetek, gyümölcsösök, faiskolák és egyéb élőhelyek fasszárú növényein. Európában leginkább a szelídgesztenye tintafolyásos betegsége, *Prunus*- és *Malus*-fajok gyökér- és gyökérnyaki rothadása, valamint bükkösök pusztulásában (1. és 2. ábrák) betöltött jelentős szerepe miatt ismert. A kórokozó talaj- és felszíni vizekben elsősorban ivartalan képletekkel, sporangiumokkal (3. ábra) és zoospórákkal terjed, gazdanövény hiányában hosszú távú életképességét pedig kompatibilis párosodási típusú (A1 és A2) izolátumainak ivaros kölcsönhatásakor képződő oospórái (4. ábra) biztosíthatják.


A *P. cambivora* populációról, egyes genotípusai terjedéséről és gyakoriságáról rendkívül kevés ismeretünk van. Tekintettel gazdasági jelentőségére európai kutatócsoportok közösen vizsgálják a kórokozó genetikai változékonyságát különböző földrajzi régiók, gazdanövények és élőhelyek vonatkozásában. E folyamatban lévő kutatásban csoportunk feladata izoenzim- és mitokondriális DNS-polimorfizmusok tanulmányozása.

1. ábra 2. ábra 4. ábra

Az allélok és genotípusok kis változatosságát állapítottuk meg 5 izoenzimlokuszban, 131 – főleg európai, észak-amerikai és ausztrál eredetű – izolátumot tanulmányozva. Egy-egy genotípus dominanciája valamennyi lokuszra jellemző volt. Az 5 lokusz együttese alapján 11 többlokuszos izoenzim-genotípust azonosítottunk, melyek közül kettő a minták 75 százalékában és mindhárom említett kontinensen előfordult. A fennmaradó, kisebb gyakoriságú genotípusok többségét eltérő kontinensekről azonosítottuk.

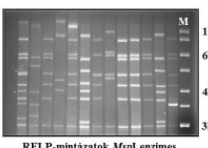
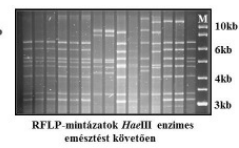
Lokusz	Lokusz-1	Lokusz-2	Lokusz-3	Lokusz-4	Lokusz-5
Allélszám	2	3	3	2	2
Izoenzim-genotípusok és (számuk)	AA (3) AB (5) BB (123)	BB (8) BD (82) CC (35) DD (6)	BC (10) CC (120) BCD (1)	BC (5) CC (126)	AB (5) BB (126)



Lokusz-1 Lokusz-2 Lokusz-3 Lokusz-4 Lokusz-5

P. cambivora izolátumok izoenzim-mintázatai

127 izolátum összenemű DNS-ének restriktációs enzim hasításával 18 *MspI* és 10 *HaeIII* RFLP-mintázatot azonosítottunk, melyek kombinációja összesen 22 'mitokondriális' DNS-haplotípust eredményezett. Egyetlen haplotípus képviselte az izolátumok 60 százalékát, a fennmaradók döntő többsége pedig csak egyszer fordult elő. A domináns haplotípus egyaránt előfordult amerikai, európai és ausztrál élőhelyeken.

RFLP-mintázatok *MspI* enzim hasítását követően RFLP-mintázatok *HaeIII* enzim hasítását követően




Vizsgálataink egy jelentősen nagyobb méretű izolátumgyűjteményre alapozva megerősítik mások (2) korábbi megfigyelését, hogy a *P. cambivora* néhány genotípusa világszerte elterjedt, míg egyes kevésbé gyakori genotípusai bizonyos földrajzi régiókra jellemzőek lehetnek. Hasonló megállapítást tehetünk a gyakoribb gazdanövények vonatkozásában is. Mindez arra utalhat, hogy a kórokozó valószínűleg a növények globális kereskedelme révén eljuthat távoli kontinensekre, s ott képes megtelepedni.

Adataink, majdan kiegészülve a folyamatban lévő mikroszatellit-vizsgálatok eredményeivel, remélhetőleg segítik a patogén populációszerkezetének alaposabb megismerését, esetlegesen egyes genotípusai terjedésének nyomon követését, s így módon terjedési útvonalainak feltárását.

Irodalom

(1) ERWIN, D.C., RIREIRO, O.K. (1996): *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
(2) OUDEMANS, P., COFFEY, M.D. (1991): Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. – *Mycol. Res.* 95: 19–30.

A kutatást az OTKA K61107 és K101914 pályázat támogatja. Köszönetünket fejezzük ki a COST FP0801 'Established and Emerging *Phytophthora*: Increasing Threats to Woodland and Forest Ecosystems in Europe' projekt részvevőinek az izolátumok egy részének biztosításáért.

2. melléklet (Bakonyi és mtsi 2014)

Két informális fitoftóra, a „*P. taxon Forestsoil*” és a „*P. taxon hungarica*” fenotípusos és molekuláris genetikai jellemzése

Bakonyi József¹, Nagy Zoltán Árpád¹, Trenea Burgess², Szigethy András¹, Jan Nechwatal³, Koltay András⁴, Lassaad Belbahri⁵ és Thomas Jung^{6,7}

¹MTA ATK Növényvédelmi Intézet, 1022 Budapest, Herman Ottó út 15.

²Murdoch University, Murdoch, Australia

³Bavarian State Research Center for Agriculture, Freising, Germany

⁴ERTI, Erdővédelmi Osztály, Mátafüred

⁵University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland

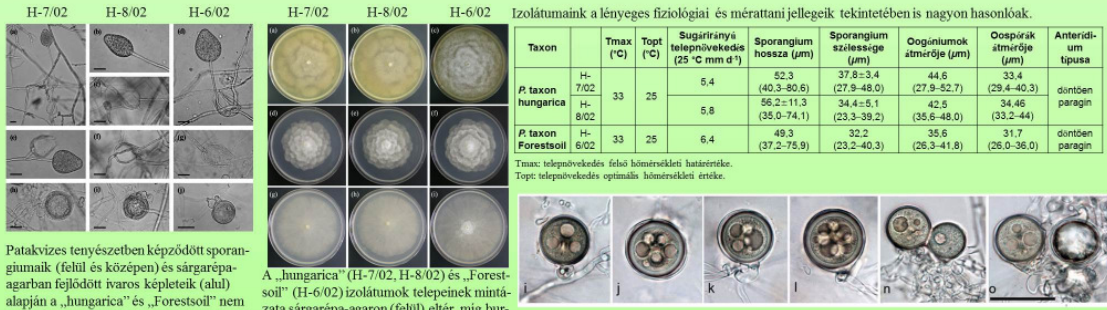
⁶Phytophthora Research and Consultancy, Bramenburg, Germany

⁷University of Algarve, Faro, Portugal

A megközelítőleg 100 fajtszámú *Phytophthora*-nemzetség egyik filogenetikai csoportja, az ún. 6. ITS-klád, számos korábbi és nemrégiben leírt új fajt, valamint leírásra váró „informális” taxont foglal magába (<http://www.phytophthora-db.org/>). E csoportba tartozó fitofórák néhány szántóföldön, többsége azonban főleg vízzel borított, ill. nedves élőhelyeken, patakpartok közelében, erdőkben és ember által kevésbé bolygatott ökoszisztémákban fordul elő. Gazdasági jelentőségük elterjedt, egyesek súlyos növényi betegségek kórokozói, mások gyengén patogének, ill. a még élő szerves anyagok lebontásában vehetnek részt.

Munkánk során a korábban már ismert „*P. taxon Forestsoil*” és az előzetes vizsgálatok alapján főleg telepmorfológiában, valamint az rDNA ITS1-régióban 4 helyen eltérő, általában azonosított „*P. taxon hungarica*” összehasonlító morfológiai, élettani, izoenzim és többégenes filogenetikai jellemzését végeztük.

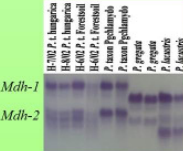
A vizsgálataink tárgyát képező két taxonnak világszerte csupán néhány izolátuma, ill. génbanki szekvenciája ismert. Tanulmányoztuk a „*P. taxon Forestsoil*” legelső tenyésztését (P1054), melyet egy franciaországi gyertyános-tölgyesből gyűjtöttek 1998-ban [1], valamint annak egy hazai égeres talajából általunk 2002-ben izolált másik törzsét (H-6/02). A „*P. taxon hungarica*” két tenyésztését (H-7/02 és H-8/02) szintén hazai égeres talajból izoláltuk 2002-ben, közel a „*Forestsoil*” lelőhelyéhez. A „*hungarica*” taxon lengyelországi kórszállományokból nemrégiben izolált két tenyésztését (IBL/2012/9/7 és IBL/2012/9/8) Ivan Milenković (Belgrádi Egyetem Erdészeti Kar, Belgrád, Szerbia) bocsátotta rendelkezésünkre. Filogenetikai vizsgálatainkba bevontunk továbbá NCBI génbankban deponált szekvenciákat is.



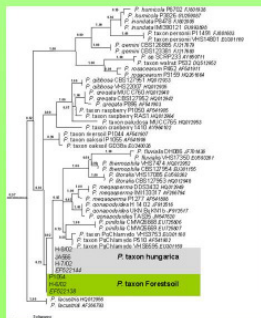
Patakvizetben tenyésztetben képződött sporangiumok (felül és középen) és sárgarépa-agarban fejlődött ivaros kepletek (alul) alapján a „*hungarica*” és „*Forestsoil*” nem különíthető el. Méréle: 20 µm.

A „*hungarica*” (H-7/02, H-8/02) és „*Forestsoil*” (H-6/02) izolátumok telepeinek mintáza sárgarépa-agaron (felül) elterjedt, míg burgonya-dextróz-agaron (középső sor) és szűrt VS-dzusz-agaron (alul) hasonló.

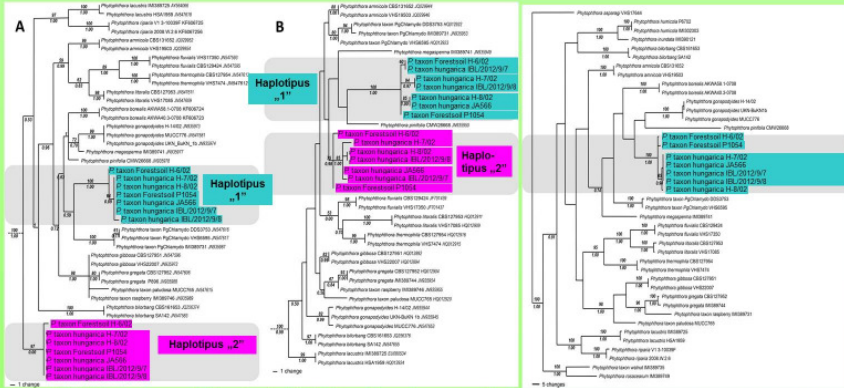
A *P. taxon hungarica* (i–l) és *P. taxon Forestsoil* (n és o) valamennyi izolátuma jelentős számban képezett több ooplasztot tartalmazó oospórákat. Méréle: 50 µm.



A „*hungarica*” és „*Forestsoil*” almaszvedihidrogenáz izozimintázata azonos, de más közeli rokon fitofórakétól eltér.



Riboszomális DNS ITS-szakaszában található, a fajhatárt síróló 4 egyponos nukleotidpolimorfizmus (SNP) miatt a „*P. taxon hungarica*” és „*P. taxon Forestsoil*” két elkülönült csoportot alkot a 6. ITS-kládban.



Klónozást követően a „*hungarica*” és „*Forestsoil*” izolátumokban a kromoszomális β -Mitochondriális Cox1 és Nadh1 génszekvenciák alapján tubulin (A) és HSP90 (B) gének összesen 11, ill. 13 haplotípusát azonosítottuk. A két-két leggyakoribb haplotípus jelentősen eltért egymástól (lásd törzsfák), de nem különítette el a „*hungarica*” és „*Forestsoil*” izolátumokat. A fennmaradó haplotípusok pedig a két-két fő haplotípus rekombináns változatai (nincs ábrázolva a törzsfán). Valamennyi haplotípus eltér ismert fitofórák hasonló szekvenciáitól. Izolátumaink ilyen típusú változékonyságának pontos okát még nem ismerjük.

Következtetés

Feltételezzük, hogy a „*P. taxon Forestsoil*” és „*P. taxon hungarica*” valójában ugyanahhoz a taxonómiai egységhez tartoznak. Nagyfokú morfológiai hasonlóságuk, hasonló élőhelyük, valamint a molekuláris genetikai adatok összességében ezt a nézetet támogatják. Az ismert fitofórakétól elsősorban oospóráikban található több ooplaszt alapján különíthető el, ezért a „*P. multiglobulosa*” nom. prov. elnevezés alkalmazását javasoljuk e taxonokra. Leírásuk új fajként folyamatban van.

[1] Brasier, C.M., Cooke, D.E.L., Duncan, J.M. and Hansen, E.M. Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides*-*P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycol. Res.* 107, 277–90 (2003).

Munkánkat az OTKA K101914 sz. pályázat támogatta.

