

## ZÁRÓJELENTÉS

Az F67908 sz. "Növénykórokozó és toxin-termelő gombák levegőmikológiai vizsgálata" c.

OTKA pályázat tudományos eredményei

Futamidő: 2007-07-01 - 2011-06-30

A légkör szilárd összetevőinek közel egynegyedét biológiai eredetű részecskék alkotják, melynek jelentős része gombáktól származik. A gombafajok túlnyomó része fejlődésének valamely szakaszában kilép a légkörbe, mely, különböző meteorológiai tényezők közreműködésével a gomba terjedését szolgálja. Ennek következtében a légkör gombafajokban igen gazdag. A növénykórokozó gombák esetében a légköri terjedés vizsgálata és az eredmények gyakorlati felhasználása az előrejelzésben jelentős gazdasági hasznot jelenthet. Célul tűztük ki a légköri gombafaj összetétel, a spórakoncentráció, a csírázási képesség, a méreteloszlás, a toxintartalom, valamint a meteorológiai tényezők hatásának vizsgálatát, melyet két különböző mintavételi magasságban végeztünk. Első, e témában támogatást nyert OTKA pályázat révén alkalom nyílt arra, hogy korábban nem vizsgált, hazánk mezőgazdasága, valamint a környezetvédelem szempontjából fontos témákban folytassunk vizsgálatokat. Az elmúlt években kiépített, egyedülálló aerobiológiai műszerpark is biztosította a feltételeket e feladat elvégzéséhez.

### **A munkaterv megvalósítása**

A munkát három fő területre tagoltuk, a kutatás céljainak megfelelően:

1. *Fusarium*-fajok levegőbiológiai vizsgálata kukoricaültetvényben
2. Raktári növényvédelem szempontjából jelentős gombafajok vizsgálata
3. A légköri biodiverzitás vizsgálata

A pályázat első évenagyrészt levegő mintavételezéssel és mintafeldolgozással telt. E feladat a további évek során is a munka jelentős részét képezte. A pályázat ideje alatt összesen 342 levegőmintát gyűjtöttünk különböző módszerekkel, melyekből 301 gomba esetében morfológiai, míg 52 izolátum esetében molekuláris biológiai módszerekkel végeztük el az azonosítást. Az izolátumokat hazai és nemzetközi törzsgyűjteményekben, a szekvenciaadatokat pedig DNS-szekvencia adatbázisokba helyeztük el. 2008-ban

kutatóhelyváltásra került sor, ez azonban nem jelentett lényegi változást a tervezett munka elvégzésében, kutatómunka zavartalanul haladt. Az átállás miatt kisebb pénzügyi módosításokat kellett végrehajtani (autokláv és termosztát beszerzését, ill. három alkalommal asszisztensi munka díjának kifizetését kérvényeztük, melyeket az OTKA engedélyezett is). Az új kutatóhely részéről elvárássá vált, hogy a vizsgált gombafajok esetében említessék meg azok humán egészségügyi vonatkozása is, ezért a további közleményeinkben e szempontokat is megvitattuk. 2010-ben pályázati időszak egy éves meghosszabbítását kértük, mivel megvolt még az anyagi fedezet arra, hogy a vizsgálatokat tovább folytatva színvonalasabb lapban publikáljuk az eredményeket. Eredményeinkkel 3 angol, 1 olasz és 9 magyar nyelvű konferencián szerepeltünk. A pályázat eredményeként 6 angol nyelvű folyóiratcikket közzeltünk, ezek közül négy impakt faktoros lapban jelent meg. Kiadásra került továbbá négy, absztraktkötetben megjelent összefoglaló, egy sikeres TDK és OTDK dolgozat, valamint elkészült a levegőmintákban található spórák határozókönyvének kézirat. A határozókönyvben szereplő anyag egy része a pályázat kereteiben gyűjtött levegőmintákból származik. (e munkát a B. Kendrick-Mycologue Publications kiadó felkérésére végeztük, a kézirat jelenleg a kiadónál van).

### **Tudományos eredmények**

A három felsorolt témában folytatott kutatások eredményeit az alábbiakban ismertetem:

1. *Fusarium*-fajok légköri eloszlási adatait és a meteorológiai tényezők hatását elemeztük az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetének martonvásári kukoricaültetvényében, két mintavételi magasságban (10 és 150 cm). A levegőmintákat Andersen-féle spóracsapdával *Fusarium*-szelektív táptalajokra gyűjtöttük. A táptalajokon kinőtt telepeket tiszta tenyészetbe vittük át, majd meghatároztuk a fajösszetételt, továbbá 30 légköri izolátumon a fumonizin-termelő képességet kódoló gén jelenlétét is megvizsgáltuk. E munkába később az Egerfood Regionális Tudásközpont is bekapcsolódott. A méreteloszlás vizsgálata azt mutatta, hogy a kis, közepes és nagy méretű *Fusarium*-gombaelemek eloszlása csak magas légköri csíraszám esetén különbözött szignifikáns mértékben. A mintavételi magasság és az időjárás nem befolyásolta szignifikáns mértékben a koncentrációt. A gombaelemek morfológiai azonosítását egy csíráztatási módszer segítségével végeztük el közvetlenül a levegőmintákon. Ennek segítségével azonosítani tudtuk a légkörben előforduló spóratípusokat, melyek közül a magános mikrokonídiumok, a rövid mikrokonídiumláncok, a mikrokonídium-csomók és a fertőzött növénymaradványok töltenek be fontos szerepet a gomba kukoricaültetvényben való terjedésében. A fajok meghatározását a molekuláris módszerek eredményei is megerősítették.

Vizsgálataink szerint valamennyi léghőből izolált *F. verticillioides* hordozta a fumonizin termeléséért felelős genetikai információt (VERTIF 1/2).

2. A növény-egészségügyi jelentőséggel bíró őszi búza üszögök és raktári penészgombák vizsgálatát a Csepeli Szabadkikötő Gabonatárházának levegőjében folytattuk Hirst-típusú térfogatoss spóracsapdával, az MgSzhK-NTI Központi Károsító Diagnosztikai Laboratóriumával közös munka keretében. E kutatás eredményei jelenleg közlés alatt állnak, ezért azokat részletesebben ismertetjük. A magtár levegőjében magas koncentrációban mutattuk ki a *Tilletia caries* (DC.) Tul. & C. Tul. (átlag: 253,3 db/m<sup>3</sup>; max.: 410; szórás: 113,6) és a *Tilletia laevis* J.G. Kühn [syn: *T. foetida* (Wallr.) Liro] (átlag: 195,0; max.: 240, szórás: 50,1) üszöggomba fajokat. A magtári levegőmintákban nagy mennyiségben előforduló *Tilletia* spórákról valószínűleg azért nem volt korábban tudomásunk, mert a beltéri vizsgálatokhoz tenyésztéses rendszerű spóracsapdákat használtak. A Hirst-típusú spóracsapdákkal viszont nehezen vagy egyáltalán nem tenyészthető részecskék jelenlétét is kimutathatjuk a tárolók légteréből. (A *Tilletia*-fajok kísérletekkel alátámasztottan, szigorúan betartott körülmények között is nehezen hozhatók táptalajon tenyésztetbe). A kimutatott spórák 50,4%-a töredezett ill. sérült volt, a levegőmintákon végzett csíráztatási tesztek során nem találtunk egyetlen csíráképes spórákat sem. Gondot okozhat azonban a *Tilletia* spórák pusztaság jelenléte is a beltéri levegőben, mivel ez alapján a szennyezett, exporthoz szánt szállítmányok visszautasításra kerülhetnek. Akár esetlegesen jelenlévő zárlati növénykórokozók is átjuthatnak a légáramlatok közvetítésével az egyik tételből a másikba, mivel a tároló belsejében a spórák a gabonatárház azonos emeletein tárolt (különböző eredetű) tételekben keveredhetnek, elsősorban a cellatöltés -ürítés során fellépő turbulens légáramlatok révén. Ezt támasztja alá az az eredményünk, hogy az egy emeleten gyűjtött levegőminták *Tilletia* koncentrációja között nem volt szignifikáns különbség, és a mintavételi magasság sem befolyásolta szignifikánsan a spórákoncentrációt. A spóráterjedés megakadályozását célzó műszaki alkalmazások (porleválasztás, zárt cellás tárolás) mérlegeléséhez további vizsgálatok szükségesek. Jelenleg a *Tilletia*-nemzetség levegőmintából való kimutatására egy PCR módszert fejlesztünk, mely várhatóan gyorsabbá és megbízhatóbbá teszi a minták kiértékelését, és akár 20-100 db spórából is biztonsággal izolál DNS-t. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a *Tilletia* teliospórákból időigényes, nehézkes folyamat a DNS kinyerése. Eddigi eredményeink alapján 0,1-0,5 µg mennyiségű *Tilletia* teliospórából sikerült DNS-t izolálnunk.

A Gabonatarházban tenyésztéses rendszerű levegőmintavevővel is végeztünk vizsgálatokat. A mintavételhez MEA és DG18 táptalajra 100-100 liter levegőt ütköztettünk. A légköri össz-csírászám (MEA) 80,5%-át a beltéri, míg 19,5%-át a kültéri mintavételek adták. Az *Aspergillus flavus*, a *Cladosporium cladosporioides* és *Penicillium chrysogenum* valamennyi beltéri (MEA) mintában előfordult. A beltéri koncentráció e fajok esetében magasabb volt, mint a kültérben, amely azt bizonyítja, hogy a gombaspórák a beltéri szennyezőforrásból származnak. A fenti fajok mellett gyakori volt még az *Alternaria* spp., *Aspergillus clavatus* és az *Epicoccum nigrum*. Az össz-csírászám 10,8%, 28,7% és 60,5%-a (MEA) ill. 9,2%, 18,6 és 72,2%-a (DG18) esett a >7 µm, 7-3.3 µm és <3.3 µm mérettartományba. Az anyagmozgatási műveletek gátolják a kisméretű spórák kiülepedését valamint nagy mennyiségű gombaelemet juttatnak a levegőbe.

### 3. A légköri biodiverzitás vizsgálata

A pályázat első évében az időjárási tényezőknek a Simpson és a Shannon indexekre gyakorolt hatását elemeztük olaszországi szőlőültetvényből származó retrospektív adatbázison. Elsőként vizsgáltuk légkör biodiverzitását az ökológiában széles körben alkalmazott indexek segítségével. Kimutattuk, hogy a Simpson index érzékenyen reagál a meteorológiai változásokra: a napfényes órák száma jelentős mértékben csökkenti a légköri gombafajok diverzitását. Ennek oka a derült, napos időjárásban szóródó *Cladosporium*-fajok erős dominanciája.

A légkör fajösszetételét az ELTE Botanikus Kertjének (Füvészkert) orchideagyűjteményében is megvizsgáltuk. Az üvegházak légköréből származó izolátum gyűjtemény molekuláris fajmeghatározását az MTA SzTE Mikrobiológiai Kutatócsoport közreműködésével végeztük. A Füvészkert orchideagyűjteményének biztonságos fenntartása nem csupán a növények gazdasági értéke, hanem a veszélyeztetett fajok megőrzése miatt is fontos feladat. A levegőből 58 nemzetség jelenlétét mutattunk ki. Növénykórokozó gombákat 17 orchideanemzetség esetén izoláltunk, összesen 20 fajt, melyek közül a leggyakrabban a *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Myrothecium roridum*, *Phoma cucurbitacearum* és a *Colletotrichum gloeosporioides* fordult elő. Mikotoxin-termelő fajok (*Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. sydowii*, *Fusarium* spp.) csak kisebb mennyiségben voltak jelen a levegőmintákban. Egy újszerű módszer segítségével a nehezen tenyészthető fajokat is sikerült kimutatnunk (közvetlenül a levegőmintákban csíráztatott gombák esetében végeztünk monospora izolálást). E módszer használatával egy, hazánkra nézve új gomba (*Zygosporium*

*masonii*) előfordulását is jeleztük. Az eredmények arra utalnak, hogy az orchideagyűjtemény gombafaj összetételét döntően a gazdanövények és a mesterséges klíma határozza meg.

A kültéri levegőmintákból számos esetben kimutattunk egy ismeretlen spóratípust, melyet a sporuláló gombatelep felfedezésével a tudományra új fajként és új nemzetséggé írtunk le (*Pyrigemmula aurantiaca*). Adataink szerint e faj szőlő kérgén igen gyakori, de más növényeken: körtén, naspolyán, nyírfán, platánon, tölgyön, juharon és ezüsthán is megtalálható (az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet bejáratánál lévő fákon is előfordul). A gombanemzetséggel kapcsolatos kutatást kanadai és holland együttműködés keretében végeztük. Kidolgoztunk egy, a spórák légköri terjedésre vonatkozó statisztikai modellt, amit a jelen pályázat keretében gyűjtött nagy mennyiségű levegőminta feldolgozása tett lehetővé.

A gombák terjedésében a spóra morfológiai adottságai (alak, felszíni mintázatok és méret) fontos szerephez jutnak a szedimentációt/fertőzést megelőzően, mint azt a kukoricaültetvényben, a gabonatarházban és az orchideagyűjteményben folytatott munkák során tapasztaltuk. A légköri spórák terjedés modelljét (aerobiological path) az eredményeink alapján továbbfejlesztettük. A hagyományos modell szerint a kiszóródási és a szállítódási folyamatokat a lerakódás zárja, melyet a spórák csírázása ill. a fertőzés követ. Ezt az elméletet módosítottuk, mivel megfigyeléseink alapján gyakori, hogy a spóraterjedés a lerakódás után sem ér véget, hanem további szakaszok következnek (másodlagos terjedés). Ilyen a visszaszóródás (főként szél hatására), ill. a kistávú (microscale) másodlagos terjedés (főként esővízzel), melybe mint végleges vagy átmeneti állomásként fontos szerepet tölt be a gazdanövény felszíne. A lomb ill. a kéreg természetes spóracsapdának tekinthető, melyen felhalmozódási helyeket figyeltünk meg („spórabank”). A kéregrepedésekben kialakult „spórabankok” a gombák túlélését ill. felszaporodását is szolgálhatják, mivel igen nagy tömegben tartalmaznak szabad spórákat és tápanyagokat (pollen, mikroszkópikus növénymaradványok). A természetes spóracsapdák szerepének és a spórabankoknak (mint számos gombafajt tartalmazó, magas biodiverzitású élőhelyeknek) a vizsgálata újabb fontos ökológiai és növényvédelmi alapkutatási kérdéseket vet fel.

### **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton is szeretném hálás köszönetemet kifejezni az OTKA döntéshozóinak, hogy e fiatal kutatói pályázat támogatásával hazánkban elsőként segítették elő a levegőmikológia fejlődését. E segítséggel a nemzetközi alapkutatás szintjén is nagy előrelépés történt a mezőgazdaság és a környezetvédelem szempontjából jelentős gombák terjedésének megismerésében.