



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A NAPRAFORGÓT FERTŐZŐ *PLASMOPARA*-FAJOK POPULÁCIÓINAK
FENOTÍPUSOS ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKAI JELLEMZÉSE**

Doktori értekezés tézisei

KOMJÁTI HEDVIG

GÖDÖLLŐ

2010

A doktori iskola

Megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője: Dr. Heszky László egyetemi tanár
az MTA rendes tagja
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

Témavezető: Dr. Virányi Ferenc egyetemi tanár
az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

Hazánkban a napraforgó termesztése során fellépő betegségek közül jelentős termés kiesést idézhet elő a *Plasmopara halstedii*, a napraforgó-peronoszpóra. Irodalmi adatok szerint a kórokozó széles gazdanövénykörrel rendelkező fajkomplexum, mely az *Asteraceae*-családon belül számos gazdanövényt fertőz. Így például, a termesztett napraforgó mellett fertőzi a nálunk is gyakori gyomnövényként ismert parlagfűvet (*Ambrosia artemisiifolia* L.), szerbtövist (*Xanthium strumarium* L.) és ívát (*Iva xanthifolia* Nutt.). A talajból fertőző biotróf kórokozó a növény szisztémikus megbetegedését okozza, melynek következtében a növény törpül, virágzata sterillé válik, illetve léha kaszátot fejleszt. A beteg növény nem gyógyítható. A napraforgó-peronoszpóra ellen csávázással és a genetikai rezisztencia együttes alkalmazásával lehet eredményesen védekezni.

A kórokozó az 1940-es évekre tehető európai elterjedését követően hosszú ideig patológiailag egységes volt, azonban a rezisztens fajták megbetegedése új patotípusok kialakulását jelezte. Először Amerikában, a hetvenes években, majd ezt követően, egy évtizeddel később Európában is új patotípusokra (rasszokra) figyeltek fel. Mára világviszonylatban több mint 30féle patotípust azonosítottak, míg hazánkban eddig öt jelenléte ismert. A kórokozó nagyfokú változékonysága a termesztésbe került, egyre újabb rezisztenciafaktorokat tartalmazó fajták okozta szelekciós nyomással hozható összefüggésbe.

Emellett a *P. halstedii* populációiban egy másik jelentős változás is végbement, ami az általánosan használt metalaxil hatóanyaggal szembeni toleranciában nyilvánult meg. Ezt a hatékonyságcsökkenést először Franciaországban és Észak-Amerikában, majd Spanyolországban és Németországban is bizonyították.

A korszerű növénytermesztéshez hosszú távon elengedhetetlen a kórokozó helyi populációinak ismeretére alapozott fajtaválasztás. A populációk virulenciafenotípus-összetételének meghatározását, továbbá nemzetközi összehasonlítását egy széles körben elfogadott, egységesített eljárás tette lehetővé. A módszer meghatározott differenciáló vonalak fertőzésre adott válaszára alapszik. A vizsgálat azonban idő-, hely- és munkaigényes. Nehézséget jelent még, hogy folyamatosan gondoskodni kell a differenciáló vonalak tiszta fenntartásáról is, valamint a kiértékelést olykor nehezíti a környezeti körülmények függvényében változó, nem tipikus növényi válasz is.

A molekuláris biológia eszköztárának fejlődése lehetővé tette a növényi kórokozók molekuláris szintű tanulmányozását. A fenotípusos jellemzésen túl napjainkra a genetikai variabilitás vizsgálata egyre szélesebb körben vált kivitelezhetővé. A *P. halstedii* változékonyságáról molekuláris szinten keveset tudunk. Korábbi RAPD- (Randomly Amplified Polymorphic DNA) és RFLP- (Restriction Fragment Length Polymorphism) vizsgálatok alapján a

kórokozó populációira alacsony genetikai változékonyság jellemző, miközben a természetben egyre nagyobb számban jelennek meg változatos virulenciakarakterekkel jellemezhető izolátumok.

Munkám során arra törekedtem, hogy genetikai és molekuláris megközelítéssel jellemezzem a hazánkban napraforgón élősködő *P. halstedii* kórokozó változékonyságát, valamint az újabb változatok nyomon követésére molekuláris módszereken alapuló, megbízható eljárást találjak. Ennek eléréséhez az alábbi közvetlen célokat tűztem ki:

- Hazai és külföldről származó *P. halstedii* izolátumok virulencia-fenotípus meghatározása és kiválasztása a további vizsgálatokhoz;
- Szerbtövisről gyűjtött *Plasmopara* sp. izolátumok fenotípusos jellemzése: virulencia-fenotípus, morfológiai jellemzők, zsírsavmintázatok elemzése, metalaxilérzékenység-vizsgálat, valamint patogenitásvizsgálatok;
- Genetikailag tiszta egysporangium-tenyészetek előállítása, felszaporítása és virulenciakarakterük fenotípusos jellemzése;
- A napraforgóról és szerbtövisről származó *Plasmopara*-populációk változékonyságának vizsgálata nukleinsav alapú RAPD-, iSSR- (inter Simple Sequence Repeat) és S-SAP- (Sequence Specific Amplified Polymorphism) módszerek alkalmazásával;
- A kórokozók fajszerű azonosításának megerősítéséhez ITS- (Internal Transcribed Spacer) és LSU- (Large Subunit) szekvenciák meghatározása és jellemzése;
- Izoenzimmintázatok jellemzése a populációs változékonyság nyomon követésére.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A *Plasmopara*-izolátumok és fenotípusos jellemzőik

A magyarországi napraforgóról és szerbtövisről gyűjtött szántóföldi izolátumok a Szent István Egyetem Növényvédelemtani Tanszék gyűjteményéből származtak, a külföldi izolátumok forrása a Hohenheim Egyetem Botanikai Intézetének gyűjteménye.

A napraforgóról származó izolátumokat az általánosan fogékony, rezisztenciagént nem tartalmazó GK-70 szabad elvirágzású napraforgófajtán, a szerbtövisről gyűjtött izolátumokat pedig a HA-335 beltenyésztett vonalon szaporítottam fel, Cohen és Sackston (1973) módszerét alkalmazva. Genetikailag **tiszta tenyészeteket** Spring és munkatársai (1998) egysporangium-izolálási módszere alapján hoztam létre, amit teljes csíranövény fertőzésével felszaporítottam. A **patotípus-azonosítást** a nemzetközileg elfogadott differenciáló fajtasor fertőzésre adott rezisztencia/fogékonysági reakciói alapján határoztam meg a Tourvieille és munkatársai (2000) által kidolgozott módszerrel.

A **szerbtövisről származó izolátumok patogenitását** a kórokozó izolálási helyén gyűjtött *X. strumarium* terméseiből nevelt növények fertőzésével igazoltam. A patotípus meghatározáshoz a napraforgó differenciáló vonalakat használtam. A **metalaxil-érzékenységi vizsgálatot** sziklevel-fertőzéses és teljes csíranövény-fertőzéses módszerekkel végeztem Rozynek és Spring (2001) módszere szerint. A szerbtövisről származó izolátum **zsírsavmintázatát** frissen sporuláltatott mintákból Spring és Haas (2002) módszere alapján jellemeztük. A zsírsavkivonást és a gázkromatográfiás vizsgálatot a Hohenheim Egyetemen végeztük. A zsírsavösszetétel-mintázatot Spring és Haas (2002) által publikált különböző földrajzi eredetű, napraforgón szaporított *P. halstedii*-minták átlagáéhoz viszonyítottuk.

Nukleinsav alapú polimorfizmus kimutatása

DNS-kivonáshoz mintánként 25-30 mg sporangiumot használtam fel. A sporangiumok roncsolását IKA ultra turrax készülék segítségével végeztem. A teljes nukleinsav kivonására a Genomic DNA Purification Kitet használtam (Fermentas) a gyártó által megadott leírás szerint.

A **RAPD-vizsgálathoz** összesen tíz, a hazai öt patotípust képviselő izolátumot választottam ki. Az UBC (University of British Columbia, Kanada) 100-as és 700-as primersorozatából 66 féle, tíz nukleotid hosszúságú indítószekvenciát használtam, a PCR-hez szükséges egyéb összetevők a

Fermentas cégtől származtak. A PCR-terméket Biometra Thermocycler3 készüléken szaporítottam fel, majd UV-átvilágító készüléken szemrevételeztem. Statisztikai számításhoz bináris kóddal értékeltem a termék meglétét vagy hiányát. Az izolátumokat MDS- (MultiDimensional Scaling Analysis) módszerrel értékeltem az SPSS 8.0 szoftver segítségével.

Az **iSSR-vizsgálatot** magyarországi, német, francia és egy amerikai termőhelyről származó szántóföldi izolátumokon, illetve azok egysporangium-tenyészetein végeztem, melyek napraforgóról, évelő napraforgóról és szerbtövisről származtak. Hét mikroszatellit primert: (CAC)₄RC, (GTG)₅, (GATA)₄, (GT)₇YG, (GAG)₄RC, (GTC)₅, (CT)₈T, valamint M13 és T3B miniszatellit primereket használtam Intelmann és Spring (2002) alapján.

A napraforgóról származó *Plasmopara*-izolátumok teljes **ITS-bázissorrendjének meghatározását** M. Thines-sel (Hohenheim Egyetem, Németország) közösen végeztem (Thines és munkatársai, 2005). A szerbtövisről származó izolátum ITS-régiójának bázissorrend-meghatározása Komjáti és munkatársai (2007) alapján történt. Szerbtövisről és napraforgóról származó izolátumok **ITS-szakaszainak restriktív mintázatát** ITS-RFLP- (ITS-Restriction Fragment Length Polymorphism) módszerrel hasonlítottam össze. Az ITS-régió felszaporítása során kapott PCR-termékeket 11 féle enzimmel hasítottam: *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *AvaIII*, *HinfI*, *Hin6I*, *EcoR5*, *MbiI*, *PstI*, *SmaI*, és *Cfr13I* a gyártó (Fermentas) útmutatása szerint.

Retrotranszpozon LTR- (Long Terminal Repeat) régió meghatározását a reverz transzkriptáz gén konzervatív régiójára tervezett általános indítószekvenciákkal kezdtem Flavell és munkatársai (1992) módszere alapján, majd kromoszómasétálás-módszerrel jutottam el egy fajspecifikus LTR-régióba. Az általam kapott szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisában található szekvenciákhoz hasonlítottam a Blastx-kereső alkalmazásával. A retrotranszpozonszerű szekvenciákat a DNASTar programcsomag (Lasergene) SeqMan programjával illesztettem össze. Az **S-SAP-vizsgálatot** Waugh és munkatársai (1997) szerint, az általam meghatározott LTR-régióra tervezett próbával harminc napraforgóról, szerbtövisről és évelő napraforgóról származó egysporangium-vonalakon végeztem el.

Izoenzimintázatok összehasonlító vizsgálata

Harmincöt egysporangium-vonalat és tíz szántóföldi izolátumot vizsgáltam, amelyekből 41 minta napraforgóról, három szerbtövisről és egy évelő napraforgóról származott. A vizsgálatot a Helena Laboratories (Beaumont, Texas) Super Z-12 applikátor egységcsomag eszközeivel végeztem a Ládai és munkatársai (2000) módszerével előkészített mintákon. A reagenseket a

Sigma-Aldrich Kft-től szereztem be, a Titan III cellulóz-acetát-géleket (Helena Laboratories) készen vásároltam. Az elektroforézist Hebert és Beaton (1993) leírása szerint végeztem. Összesen 16 különböző enzimreakciót agartartalmú festőelegy felülrétegzéses módszerrel vizsgáltam. A különböző enzimreakciók kimutatását a Helena Laboratories által kiadott kézikönyv alapján végeztem (Hebert és Beaton, 1993). A polimorfizmust mutató enzimek egyes alléljait a felvitel helyétől számított relatív futási távolságuk (relatív mobilitásuk, RM) alapján neveztem meg. A mintákat végül az egyes enzimekkel kapott RM-értékek alapján multilokusz-fenotípus (MLP) csoportokba soroltam.

EREDMÉNYEK

Napraforgóról származó *Plasmopara halstedii* virulenciaváltozékonysága

A napraforgóról származó, hazai gyűjtésű 100, 330, 700, 710 és 730-as virulenciafenotípusba tartozó tíz izolátum egysporangium-vonalai között a szülői, azaz a kiindulási virulenciakarakter mellett eltérő típusok is megjelentek, azaz a szántóföldi minták virulenciaösszetétel szempontjából szegregálódtak. Továbbá, kimutathatók voltak közöttük hazai szántóföldi minták elemzésekor eddig még nem izolált virulenciafenotípusok, mint például a 300-as és a 310-es patotípus.

Szerbtövisről származó *Plasmopara*-fajok fenotípusos jellemzése

*Xanthium strumarium*ról, azaz a szerbtövisről gyűjtött X03 izolátum fertőzte a napraforgót, és a kórokozó sporulált a megbetegített növényi részekben. A fertőzött napraforgónövények erősen törpültek, a hipokotilon barnás elszíneződés, szöveti nekrozis alakult ki. A növények egy részén gyökér- és csíranövényelhalás, az ún. damping-off tünetei jelentkeztek. A fertőzés azonban a sziklevelekre korlátozódó maradt, és a kórokozó nem kolonizálta a sziklevelel fölött található valódi szöveteket, így a tipikus peronoszpórástünet, a lomblevél klorózisa nem alakult ki.

Az X03 izolátum napraforgón képződött sporangiumaival sikeresen visszafertőztük az eredeti gazdanövényét, a szerbtövist, ahol kialakultak a peronoszpórástünetekre utaló tünetek, a sporuláció és a klorózis. A szerbtövisről származó X03 izolátum sporangiumtartóját monopodiális elágazásúnak találtam. A rajzospórák kifejlődése kevesebb mint egy órát vett igénybe és sporangiumonként 4–13, átlagosan 6 darab rajzospóra fejlődött. Ez az izolátum laboratóriumi körülmények között a napraforgót csíranövénykorban szisztemikusan megfertőzte. A fertőzött napraforgó gyökérszövetében kialakult a kórokozó ivaros szaporítóképlete, az oospóra. Az X03 izolátum a differenciáló fajtáson 717 (CLI) típusú virulenciakaraktert mutatott és érzékenynek bizonyult a metalaxillal szemben. Az izolátum zsírsavmintázata statisztikailag eltért a napraforgót fertőző *Plasmopara*-fajra jellemzőktől.

A különböző gazdanövényekről származó izolátumok molekuláris genetikai vizsgálata

A **RAPD-mintázatok** multidimenziós értékelése négy csoportba különítette el a hazai napraforgóról származó izolátumokat. Az első csoportba tartozó izolátumok között az eredeti európai 100-as patotípus kivételével megtalálható volt mindegyik nálunk előforduló virulenciatípust képviselő izolátum, nevezetesen a 330, 700, 710 és 730. A második csoportba tartozó izolátumok a 100-as és a 700-as patotípust képviselték, míg a harmadik csoport a 330-as és 730-as izolátumot tartalmazta. Egy negyedik, különálló csoportot alkotott a 100-as patotípust képviselő, 2001-ben izolált minta.

Az **iSSR-módszerrel** mindhárom gazdanövényről, a napraforgóról, a szerbtövisről, illetve a *Helianthus × laetiflorus*-ról származó izolátumok esetében is jól reprodukálható mintázatot kaptam a PCR-termékek agarózgél-elektroforézises elválasztását követően. Jelentős genetikai távolságot tapasztaltam a napraforgóról, illetve a szerbtövisről származó izolátumok között. A szerbtövisről izolált X03 és annak egysporangium klónja, az X/21 teljesen elkülönült a többi vizsgált izolátumtól, viszont a szerbtövisről izolált X04-es minta iSSR-mintázata a napraforgóról származó izolátumokhoz hasonlított. A *H. × laetiflorus*-ról származó izolátum (LAE) mintázata bár közelebb állt a napraforgóról származó izolátumokhoz mint a szerbtövisről származó X03 minta, mégis elkülönült a termesztett napraforgóról gyűjtött izolátumoktól. A legtöbb izolátumot tartalmazó, alacsony variabilitást mutató csoport, változatos földrajzi eredetű, patotípusú, metalaxilérzékeny és -toleráns mintákat egyaránt tartalmazott. Bár a napraforgóról származó izolátumok között azonosítható volt adott izolátumra jellemző egyedi mintázat, a módszerrel kapott változékonyságot nem lehetett virulencia fenotípussal összefüggésbe hozni a vizsgált minták esetében.

Az **LTR-retrotranszpozon izolálásakor** a reverz transzkriptáz génre tervezett degenerált primerekkel felszaporított szakaszok fehérje szinten hasonlóságot mutattak a közeli rokon *Phytophthora infestans*-ból izolált reverz transzkriptáz génszekvenciákkal. A napraforgó-peronoszpórából származó reverz transzkriptáz génszakaszokból kiindulva lehetővé vált a fajspecifikus LTR-régió meghatározása és S-SAP-próba tervezése. A retrotranszpozonok inszerciók polimorfizmusán alapuló módszerrel szántóföldi izolátumokhoz köthető specifikus mintázat volt megfigyelhető a vizsgált minták körében. A szerbtövisről és a *H. × laetiflorus*-ról származó izolátumok gazdanövényeik alapján elkülönültek a többi, napraforgóról származó izolátumok csoportjától. Tehát az S-SAP-módszer lehetőséget adott a különböző gazdanövényekről származó, a napraforgót fertőző *P. halstedii*-től eltérő virulencijelleget mutató izolátumok azonosítására.

Az **ITS-régió** eltérő hosszúságú szakaszokat eredményezett a napraforgóról, illetve a szerbtövisről származó izolátumok esetében. Az előbbi ITS-régiója egy kb. 2600 bp hosszúságú szekvenciát eredményezett, ahol az ITS2-régió tartalmazott egy olyan 1822 bázis hosszúságú pluszszakaszt, ami más fajok ITS-szakaszaira nem jellemző, továbbá egyéb, az NCBI-adatbázisban megtalálható szakaszokkal sem mutatott hasonlóságot. Ez az ITS-ekre nem jellemző darab feltételezhetően négy, egymáshoz 87%–91%-ban hasonló, ismétlődő (repetitív) szakaszból épült fel.

A szerbtövisről gyűjtött X03 izolátum esetében az ITS-felszaporítás még a korábbinál is hosszabb, mintegy 3225 bázis méretű terméket eredményezett. A két különböző gazdanövényről származó *Plasmopara*-izolátum ITS1-régiója 92,7%-ban hasonlított egymásra, míg a konzervatív 5,8S régió 100%-ban megegyezett a két mintában. A szerbtövisről származó ITS extrém hosszúságát a mintegy 2010 bázis hosszúságú, más fajokban eddig még nem azonosított pluszszakasz, azaz inszerció okozta. A kétféle gazdanövényről származó minta különbözött egymástól a repetitív elemek bázisösszetételében és struktúrájában egyaránt. Az X03 izolátum ITS alapján monofiletikus leszármazásúnak tekinthető a napraforgót fertőző *P. halstedii*-fajjal, de attól különbözik.

A **cellulóz-acetát-gélelektroforézises vizsgálatok** kivitelezéséhez elegendő volt összesen 25 mg minta. Reakciónként mintegy 30–100 µg sporangium és sporangiumtartó kivonatát használtuk fel. Az enzimek elválasztása 20–40 percet vett igénybe. A vizsgált 16 izoenzim értékelhetőség alapján négy csoportot alkotott: nem festődő, gyenge jelet adó, rosszul reprodukálható és végül a jól festődő csoportot.

A vizsgált izoenzimek közül ötlet kaptunk jól értékelhető reakciót, nevezetesen az almasav-dehidrogenáz (MDH), az izocitromsav-dehidrogenáz (IDH), a foszfoglükomutáz (PGM), a savas foszfátáz (APH), és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) enzimekkel, melyek közül a PGM, IDH és az MDH enzimeknél találtunk allélikus eltérésekre utaló jeleket. A mintázatok alapján a mintákat négy multilokusz-fenotípusba (MLP) lehetett sorolni. Az 1-es MLP tartalmazta az izolátumok többségét, többek között két szerbtövisről származó izolátumot is. A 2-es MLP-re jellemző mintázatot egy magyar és egy szerbiai izolátum 2-2 egysporangium-tenyészetéből származó izolátumai mellett ötödikként egy németországi minta mutatott. A 3-as MLP-be egy izolátum tartozott, mely a *H. × laetiflorus*-ról származott, míg a 4-es MLP-t a *Xanthium*-ról származó X03 izolátum alkotta.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként bizonyítottuk, hogy a napraforgót a *P. halstedii* Farl. (Berl. et de Toni) mellett a szerbtövis kórokozójaként leírt *P. angustiterminalis* Novot. is fertőzheti, és azon ivaros és ivartalan úton egyaránt szaporodik. Megállapítottuk továbbá, hogy szerbtövisen mind a *Plasmopara halstedii*, mind a *P. angustiterminalis* egyaránt előfordul.
2. Megállapítottuk, hogy a *Plasmopara halstedii* egysporangium-tenyészetei a szántóföldi izolátumra jellemző kiindulási virulencia-fenotípushoz képest szegregálódtak.
3. Kimutattuk, hogy a *Plasmopara halstedii* ITS-mérete közel 2600 bázis hosszú, melynek oka az ITS2-régióban található többszörös inszerció. Megállapítottuk, hogy a *Plasmopara angustiterminalis* ITS-mérete 3225 bázis, mely a *Plasmopara halstedii*hez hasonlóan szintén az ITS2-régióban tartalmaz inszerciót, azonban ennek bázisösszetétele, valamint struktúrája eltér a *P. halstedii*re jellemzőktől.
4. Elsőként mutattuk ki a *P. halstedii*ben *Ty-copia* típusú retrotranszpozon elemet, mely LTR-régióját sikeresen alkalmaztuk inszerciók polimorfizmus vizsgálatára S-SAP-módszerrel.
5. Elsőként vizsgáltuk a *P. halstedii* izoenzimintázatát cellulóz-acetát-gélelektroforézises (CAE) módszerrel, ami alapján négy multilokuszos fenotípuscsoportba soroltuk a mintákat. A módszerrel a kórokozó nagyfokú homozigotását támasztottuk alá.
6. Elsőként jellemeztük a szerbtövist fertőző *Plasmopara angustiterminalis* Novot. izolátumot molekuláris genetikai módszerek (ITS, iSSR, izoenzim) alkalmazásával.
7. Kimutattuk, hogy a szerbtövistről származó *Plasmopara angustiterminalis* Novot. izolátumok a hazai *P. halstedii*vel szemben rezisztens differenciáló vonalakat is fertőzik, azok sziklevelén sporulációra képesek.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A fénymikroszkópos megfigyelések eltérést mutattak ki a napraforgóról és a szerbtövisről származó (X03) izolátumok között a sporangiummorfológia, a zoosporogenezis ideje és a sporangiumonként képződő rajzóspórák száma tekintetében. Az utóbbinál tapasztalt rövidebb inkubációs idő összefüggésben lehet az X03 izolátum agresszivitásával, utalhat annak fokozottabb életképességére, hiszen rövidebb ideig kell fennállnia a fertőzést elindító speciális körülményeknek. Az X03 jelű izolátum megfertőzte a napraforgót, azaz patogénnek bizonyult ezen a természetett növényen, azonban a fertőzés a sziklevelekre korlátozódó maradt, vagyis a kórokozó nem kolonizálta a napraforgó másodlagos szöveteit. Ez a jelenség kérdésessé tette az X03 izolátum faji elkülönítését, illetve azonosságát a *Plasmopara halstedii*-vel. További vizsgálatok alátámasztották ezt a felvetést, amelyeknek eredményeképpen ezt az X03-as izolátumot egy másik *Plasmopara*-faj, a *P. angustiterminalis* Novot. tagjának tekintettük.

Vizsgálataink során a szerbtövisről további, patológiailag eltérő mintákat is jellemeztünk, az egyik *P. angustiterminalis* (X03), míg másik kettő (X02 és X04) *P. halstedii* típusúnak mutatkozott. Ez az eredmény alátámasztotta azt a korábbi megfigyelést, miszerint a szerbtövis természetes gazdanövénye a napraforgó-peronoszpóra kórokozójának. Mindezek figyelembevételével, joggal feltételezhetjük tehát, hogy a szerbtövisen található *P. angustiterminalis* fertőzési forrásként szolgál a napraforgó peronoszpórák megbetegítéséhez. Nem zárható ki továbbá annak a lehetősége sem, hogy a szerbtövisen, illetve az árvakelésű napraforgón a kétféle *Plasmopara*-faj együttes fertőzése esetén alkalom adódhat a fajok közötti genetikai kölcsönhatásra, utat nyitva ezzel új, virulens kombinációk kialakulásához.

A kísérletekbe vont, hazai gyűjtésű, napraforgóról származó *P. halstedii* szántóföldi izolátumainak egysporangium-vonalai a szülői, azaz kiindulási izolátum virulenciakaraktere mellett, attól eltérő típusokat is tartalmaztak, sőt hazánkban eddig szántóföldön nem izolált virulenciafenotípusokat is azonosítottunk. Ezen eredmények értelmében egyes szántóföldi izolátumok kevert mikropopulációnak tekinthetők virulencia-fenotípus szempontjából. A virulenciában tapasztalt ilyen mértékű változékonyság egyben széles körű forrást biztosít a gazdanövényfüggő kórokozó túlélésére. A kórokozó változékonyságából adódó veszélyforrásnak hathatós ellenszere lehet a tartós rezisztenciára irányuló nemesítés, valamint a kémiai védelem hatékonyságának megőrzése, illetve e kettő együttes alkalmazása.

A zsírsavmintázat-vizsgálatok során különbséget kaptunk a kétféle *Plasmopara*-izolátum között, ez azonban nem bizonyult elegendőnek sem a fajon belüli változatok, sem a közelrokon fajok határainak tisztázására, ezért célszerűnek tartottuk más módszerekkel is alátámasztani eredményeinket.

A kísérleteinkben alkalmazott molekuláris módszerek (RAPD, iSSR, S-SAP és CAE) a napraforgót fertőző *P. halstedii*-izolátumok nagyfokú genetikai hasonlóságára világítottak rá a változatos virulenciakombinációjú izolátumok körében. Ebből a szempontból nem mutatkozott eltérés a csak hazai izolátumok változékonyságát vizsgáló RAPD-módszernél tapasztaltak és a külföldi minták bevonásával készült további vizsgálatok között. Ebből arra következtethetünk, hogy az izolátumok közötti virulenciaeltérések háttérében minimális genetikai változások állnak, melyet korábban már gabonarozsák esetében is megfigyeltek. Ugyanakkor mindegyik molekuláris módszerrel alcsoportok elkülönülését lehetett megfigyelni az amúgy nagy hasonlóságát mutató izolátumok között. Ennek jelentősége lehet a kórokozó térben és időben történő monitorozásában annak ellenére, hogy virulencia-fenotípusra nem tudunk következtetni az eredmények alapján.

Mind az iSSR-, mind az S-SAP- és a CAE-módszerek bizonyították a napraforgót fertőző, azonban patológiai és virulencia szempontból eltérő tulajdonságokat mutató, egyéb (szerbtövis, évelő napraforgó) gazdanövényekről származó *P. angustiterminalis*-izolátumok genetikai távolságát a termesztett napraforgóról származó izolátumoktól. Úgy tűnik tehát, hogy az általunk alkalmazott módszerek lehetőséget teremtenek a morfológiailag hasonló *P. halstedii*-fajkomplexumba tartozó izolátumok fajsztintú, illetve patológiai jellemzőinek meghatározására.

A faji hovatartozás kérdéskörének tisztázásában különösen informatív lehet a konzervatív és változékonny szakaszokat egyaránt tartalmazó ITS jellemzése. A *Plasmopara*-izolátumok esetében az ITS-vizsgálatokat nehezítette, hogy az eddig tanulmányozott fajokhoz képest a *P. halstedii* 3–4-szer hosszabb ITS-szakasz jellemezte. A hosszú szakaszok vizsgálatához jó minőségű és megfelelő mennyiségű DNS-re van szükség, ami a gazdanövényfüggő, biotróf kórokozók esetében a fenntartás és a szaporítás miatt egyaránt nehézségekbe ütközik. Herbáriumai anyagok vizsgálata szélesebb körben adna alkalmat a *Plasmopara*-fajkomplex különböző gazdanövényekről származó mintáinak összehasonlítására. Azonban a kinyerhető nukleinsav minősége meghatározza a felszaporítható szakaszok méretét. Így például a teljes ITS vizsgálata, méretéből adódóan, kétséges lehet a jelenleg ismert PCR-technikákkal.

Kísérleteink alapján elmondható, hogy a konzervatív LSU-szakasz részleges jellemzése alkalmasnak mutatkozik fajsztintú filogenetikai vizsgálatokra, amely esetünkben is rávilágított a *P. angustiterminalis* és a *P. halstedii* közötti genetikai különbségekre.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Cohen, Y., Sackston, W.E. (1973) Factors affecting infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Botany, 51: 15-22.
- Flavell, A.J., Smith, D.B., Kumar, A. (1992) Extreme heterogeneity of *Ty1-copia* group retrotransposons in plants. Molecular and General Genetics, 231: 233-242.
- Hebert, P.D.N., Beaton, M.J. (1993) Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. A practical handbook. Helena Laboratories.
- Intelmann, F., Spring, O. (2002) Analysis of total DNA by minisatellite and simple sequence repeat primers for the use of population studies in *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Microbiology, 48: 555-559.
- Komjáti, H., Walcz, I., Virányi, F., Zipper, R., Thines, M. and Spring, O. (2007) Characteristics of a *Plasmopara angustiterminalis* isolate from *Xanthium strumarium*. European Journal of Plant Pathology, 119: 421-428.
- Láday, M., Bagi, F., Mesterházy, Á., Szécsi, Á. (2000). Isozyme evidence for two groups of *Fusarium graminearum*. Mycological Research, 104: 788-793.
- Spring, O., Haas, K. (2002) The fatty acid composition of *Plasmopara halstedii* and its taxonomic significance. European Journal of Plant Pathology, 108: 263-267.
- Spring, O., Rozynek, B., Zipper, R. (1998) Single spore infections with sunflower downy mildew. Journal of Phytopathology, 146: 577-579.
- Rozynek, B., Spring, O. (2001) Leaf disc inoculation, a fast and precise test for the screening of metalaxyl tolerance in sunflower downy mildew. Journal of Phytopathology, 149: 309-312.
- Thines, M., Komjáti, H., Spring, O. (2005) Exceptional length of ITS in *Plasmopara halstedii* is due to multiple repetitions in the ITS-2 region. European Journal of Plant Pathology, 112: 395-398.
- Tourvieille, L.D., Gulya, T.J., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K.Y., Virányi, F. (2000) New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). Proc. 15th International Sunflower Conference, Toulouse, Vol.II, I: 61-65.
- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A.J., Pearce, S.R., Kumar, A., Thomas, B.B.T., Powell, W. (1997) Genetic distribution of BARE-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Molecular and General Genetics, 253: 687-694.

A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Angol nyelvű, teljes terjedelmű cikkek:

Komjáti, H., Fekete, Cs. and Virányi, F. (2004) Genetic and molecular characterisation of *Plasmopara halstedii* isolates from Hungary. In: Advances in Downy Mildew Research Vol . 2, Spencer-Phillips, P. and Jeger, M. (Eds.) pp. 193-201.

Komjáti, H., Walcz, I., Virányi, F., Zipper, R., Thines, M. and Spring, O. (2007) Characteristics of a *Plasmopara angustiterminalis* isolate from *Xanthium strumarium*. European Journal of Plant Pathology, 119: 421-428.

Komjáti, H., Bakonyi, J., Spring, O. and Virányi, F. (2008) Isozyme analysis of *Plasmopara halstedii* using cellulose-acetate gel electrophoresis. Plant Pathology, 57: 57-63.

Angol nyelvű rövid közlemény:

Thines, M., Komjáti, H., and Spring, O. (2005) Exceptional length of ITS in *Plasmopara halstedii* is due to multiple repetitions in the ITS-2 region. European Journal of Plant Pathology, 112: 395-398.

Magyar nyelvű tudományos közlemény:

Komjáti H., Bakonyi J. és Virányi F. (2006) A napraforgó-peronoszpóra (*Plasmopara halstedii*) hazai izolátumainak izoenzim vizsgálata. Növényvédelem, 42: 241-246.

Konferencia kiadványok (Proceedings):

Komjáti, H., Bakonyi, J. and Virányi, F. (2004) Isozyme analysis as a tool for characterising subpopulations of *Plasmopara halstedii*, the downy mildew of sunflower. Proc. 16th. Int. Sunflower Conference, Fargo, USA. Vol. 2, pp. 93-97.

Thines, M., Komjáti, H., Bachofer, M. and Spring, O. (2005) Unusual insertions of phylogenetic relevance in the nuclear ITS region of some Peronosporaceae (Oomycetes). Proc. 23rd Fungal Genetic Conference, Fungal Genetics Newsletter 52, 72.

Előadások, poszterek összefoglalói:

Komjáti H., Zipper R. és Virányi F. (2001) Hatékony módszer *Plasmopara halstedii* egysporangium-tenyészet előállítására. Tiszántúl Növényvédelmi Fórum, Debrecen, 2001. november 6-8. p.55.

Komjáti H., Fekete Cs. és Virányi F. (2002) Előzetes módszertani vizsgálatok a napraforgó-peronoszpóra (*Plasmopara halstedii*) molekuláris alapon történő tanulmányozására. 48. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2002. március 6-7. p. 83.

Komjáti, H., Fekete, Cs. and Virányi, F. (2003) Genetic and molecular characterisation of *Plasmopara halstedii* isolates from Hungary. Int. Congress of Plant Pathology, New Zealand 2003. p.223/16.35

Komjáti, H., Bakonyi J. and Virányi F. (2004) A *Plasmopara halstedii* magyarországi izolátumainak izoenzimes vizsgálata. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2004. február 24-25. p. 92.

Komjáti H. és Virányi F. (2005) Napraforgó-peronoszpóra (*Plasmopara halstedii*) szubpopulációk változékonyságának vizsgálata iSSR módszerrel. 51. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2005. február 22-23. p. 27.

Komjáti H., Virányi F. és Lee D. (2005) A napraforgó-peronoszpóra *Plasmopara halstedii* (Farl.) et de Toni molekuláris változékonyságának vizsgálata LTR-retrotranszpozon alapú próbával. III. Magyar Mikológiai Konferencia, Mátraháza, 2005. május 26-27. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52. (Suppl.)

Komjáti H., Spring O., Zipper R., Virányi F. és Walcz I. (2007) A napraforgót fertőző *Plasmopara angustiterminalis* Novot. izolátum jellemzése molekuláris módszerekkel. 53. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2007. február 20-21. p. 54.

A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Angol nyelvű, teljes terjedelmű tudományos cikk:

Pasquali, M., Komjáti, H., Lee, D., Bayles, R. (2010) SRAP technique efficiently generates polymorphisms in *Puccinia striiformis* isolates. Journal of Phytopathology, 158:708-711.

Előadások, posztterek összefoglalói:

Komjáti H. (2000) Patogén szuppresszív gabonatalaj vizsgálata. 46. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2000. február 22-23. p. 105.

Bán, R., Virányi, F. and Komjáti, H. (2003) Benzothiodiazole-induced resistance to *Plasmopara halstedii*. Int. Congress of Plant Pathology, New Zealand, 2003. p.179/13.12

Ortner E., Komjáti H. és Virányi F. (2003) Egy kísérleti parcella napraforgó-peronoszpóra mikropopulációjának virulencia összetétele. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2003. február 25-26. p. 111.

Komjáti, H., Pasquali, M., Hubbard, A., Lee, D. and Bayles, R. (2004) IGS, SSR and SRAP analysis of *Puccinia striiformis* isolates. Cereal Rusts and Mildew Conf., UK, 2004.