

**Égerpatogén *Phytophthora*-fajhibridek
mitokondriális genomjainak
tanulmányozása**

**Zárójelentés
K46228
2008**

Bevezetés

A *Phytophthora*-nemzetség termesztett növényeink egyik legpusztítóbb kórokozócsoportja. Az általuk okozott betegségekkel egyaránt találkozhatunk erdészeti, kertészeti és szántóföldi növényeken. Európa déli régióiban súlyos következményei voltak a *P. cinnamomi* és *P. cambivora* fellépésének szelídgesztenyén. Mindkettő behurcolt kórokozó Európában, s jelentős károkat okoznak az ún. tintafolyásos betegség kiváltásával (Peace 1962). Számos fajnak szerepet tulajdonítanak az európai tölgyesek pusztulásában is (Jung és mtsai 1996). Angliában és Walesben pedig az égererdők mintegy 10%-ának elhalását kiváltó fitoftóra, a *P. alni*, egy természetes úton kialakult fajhibrid lépett fel (Brasier és mtsai 1999). E kórokozónak fenotípusukban és genotípusukban is eltérő izolátumait jelenleg 3 klónszerű alfajba sorolják (Brasier és mtsai 2004). A *P. alni* szülőfajai feltehetően az égerre nem patogén *P. cambivora* és a *P. fragariae*. A fitoftórás égervészt hazánkban 1999 nyarán észlelték először egy hansági égeresben (Varga 2000, Szabó és mtsai 2000, Nagy és mtsai 2000), majd ezt követően az ország számos pontján – többek között Hévíz környékén is – megtaláltuk (Koltay 2001, Nagy és mtsai 2002).

Mivel a *P. alni* alfajainak mint természetes fajhibrideknek a morfológiai és citogenetikai változékonyságát, valamint DNS polimorfizmusait sejtmag szinten pályázatunk kezdetéig már viszonylag behatóan tanulmányozták, elsődleges célunk a hibridek és feltételezett szülőfajaik mitokondriális genomjainak tanulmányozása volt. E extracelluláris örökítőanyagról ugyanis kevés ismerettel bírtunk. Elsősorban az érdekelt bennünket, hogy találunk-e a hibrideken belül polimorfizmusokat e területen is, illetve a hibridek és feltételezett szülőfajaik között pedig azonos típusú mitokondriális (mt)DNS-t.

Eredmények

Mivel a *P. alni*ként leírt égerfitoftóra három alfajba sorolt öt ismert típusa (standard, svéd, angol, német és holland variánsok) közül csak az ún. svéd változat (jelenleg subsp. *uniformis*) azonosítható egyértelműen morfológiai alapokon, először szükségünk volt a standard típus (jelenleg subsp. *alni*), valamint a német és a holland változatok (jelenleg subsp. *multiformis*) elkülönítését lehetővé tevő, nagyszámú izolátumon is alkalmazható gyors molekuláris eljárásra. Ezért a kórokozó egyes típusaira, azok jellemző RAPD-fragmentumai alapján, specifikus *primer*-, vagy indítószekvencia-párokat tervezünk. A kézenfekvőbbnek tűnő riboszomális DNS ITS szakaszai mindezt nem teszik lehetővé a hibridek szülőfajokkal és egymással való nagyfokú hasonlósága miatt. A standard típust, valamint a holland és a

német változatokat egyaránt kimutató, de el nem különítő indítószekvencia-pár (SAP1/SAP2) már a pályázatot megelőzően birtokunkban volt. Ezért a továbbiakban a kórokozó svéd változatából klónoztunk és szekvenáltunk egy olyan RAPD-szakaszt, amely a standard izolátumokban is jelen van, de hiányzik a holland és német változatokból. A rövid RAPD *primer* meghosszabbítása és a PCR-körülmények optimalizálása által elértük, hogy új indítószekvenciáinkkal (SWAP1/SWAP2) csupán a várt hosszúságú termék sokszorozódik a standard és svéd izolátumokban. Keresztreakciókat sem a feltételezett szülőfajok, sem pedig egyéb vizsgált fitoftóra és gomba esetében sem tapasztaltunk. A SAP1/SAP2, ill. a SWAP1/SWAP2 indítószekvenciákkal a specifikus termékek olyan kombinációban szaporodnak fel az egyes hibrid típusokban, hogy az alfajok minden kétséget kizáróan azonosíthatóak. Az általunk kifejlesztett indítószekvenciák képesek voltak a kórokozót fertőzött növényből (égerfák kéregszövetéből és a zoospórák csapdázásához használt babérmeggylevelekből), illetve a patogének rajzospóráit tartalmazó nem steril talajszűrletből szelektív és megismételhető módon kimutatni. Az eljárás alkalmas a kórokozó gyors diagnosztizálására, s ezzel megkönnyítheti az ellene való védekezést. Ezzel kapcsolatos eredményeinket egy szaklapban közöltük (Bakonyi és mtsai 2006).

A fentiekben vázolt munkákkal párhuzamosan gyűjtéseket végeztünk hazai égeresekben, valamint nemzetközi törzsgyűjteményekből és külföldi kollégáktól kértünk és kaptunk számos *P. alni* és *P. cambivora* tenyészetet, illetve a karantén *P. fragariae* izolátumok élettelen, liofilizált micéliumporait. Hazai gyűjtéseink során olyan ismeretlen fitoftórákra leltünk, melyek feltételezhetően új fajok is egyben. E taxonok jellemzését jelen pályázathoz kapcsolódó, nemzetközi együttműködést támogató kiegészítő pályázat keretében végeztük (IN64168, zárójelentés). A külföldről kapott izolátumok többsége, sajnos, baktériummal volt fertőzött. Megtisztításuk több hónapot vett igénybe. Ezt követően kezdhettük el a mtDNS polimorfizmusok vizsgálatát az indítószekvenciáinkkal most már minden kétséget kizáróan ellenőrzött és azonosított *P. alni* izolátumokkal. A *P. cambivora* és *P. fragariae* törzsek identitását mások által kidolgozott specifikus indítószekvenciákkal ellenőriztük PCR módszerrel.

A **mtDNS-polimorfizmusokat** összgenomi DNS *HaeIII* és *MspI* restrikciós endonukleázokkal történő hasításával végeztük. Gélelektroforézist követően a sejtmag DNS elkülönül a mitokondriálistól.

A két endonukleáz által generált mintázatok kombinálásával 41 *P. cambivora* izolátum tizenhét, 19 *P. fragariae* izolátum négy, 25 *P. alni* törzs két mtDNS-haplotípust tartalmazott (1. táblázat). A *P. alni*-ban értékelt 25 marker közül 9 a *P. cambivora*-ban, 3 a *P. fragariae*-ban

is jelen volt. Régiók szerinti tagozódást nem figyeltünk meg. A *P. fragariae* szamócáról és málnáról származó tenyészetek egyértelműen elkülönültek egymástól. Nem találtunk olyan mtDNS-mintázatot, amely a hibridekben és a feltételezett szülőkben egyaránt előfordult. A *P. alni* ún. standard izolátumai (ssp. *alni*) kétféle mintázatot tartalmaztak, melyek közül a domináns volt jelen a német és holland változatokban (ssp. *multiformis*) is. Három esetben viszont az egyöntetű svéd változatával (ssp. *uniformis*) azonos RFLP-típust figyeltünk meg standardokban. Az esetleges tévedések kizárása végett összehasonlító RAPD- és izozimelemzést végeztünk, és megismételtük a morfológiai vizsgálatokat is. A szóban forgó izolátumok fenotípusos és nukleárisan kódolt genotípusos tulajdonságai valóban a *P. alni* ssp. *alni*éval egyeztek. Az eredmények egy olyan genetikai kölcsönhatásra utalnak, melynek következményeként egyes törzsek ssp. *alni* típusú sejtmagot és ssp. *uniformis*, vagy ssp. *multiformis* típusú mitokondriumot örökölték (Bakonyi és mtsai 2007). A különböző mtDNS-típusok jelenléte a hibridekben azt sejteti, hogy nem csak egy-egy szülőizolátum között zajlott le a hibridizációs folyamat, hanem valószínűleg több, egymástól független genetikai kölcsönhatás ment végbe különböző szülőizolátumok között.

1. táblázat Mitokondriális RFLP-típusok és a vizsgált izolátumok főbb jellemzői

MspI RFLP	HaeIII RFLP	Kombinált RFLP	Faj	Izolátum	Gazdanövény	Földrajzi eredet, gyűjtés éve
Msp1	Hae3	I	Paa	H-5/02	Alnus glutinosa	Teskánd, Magyarország, 2002
Msp1	Hae3	I	Paa	Hévíz1/a	Alnus glutinosa	Hévíz, Magyarország, 1999
Msp1	Hae3	I	Paa	Hévíz4/2	Alnus glutinosa	Hévíz, Magyarország, 1999
Msp1	Hae3	I	Paa	Hévíz6	Alnus glutinosa	Hévíz, Magyarország, 1999
Msp1	Hae3	I	Paa	Hévíz8	Alnus glutinosa	Hévíz, Magyarország, 1999
Msp1	Hae3	I	Paa	Hévíz9	Alnus glutinosa	Hévíz, Magyarország, 1999
Msp1	Hae3	I	Paa	P56/04	Alnus glutinosa	Franciaország
Msp1	Hae3	I	Pam	P68/04	Alnus sp.	Wageningen, Hollandia
Msp1	Hae3	I	Pam	P69/04	Alnus sp.	Freising, Németország
Msp1	Hae3	I	Pam	P98/04	Alnus glutinosa	Belgium, 2001
Msp1	Hae3	I	Paa	H-88/04	Alnus glutinosa	Magyarország, 2005
Msp1	Hae3	I	Paa	H-89/04	Alnus glutinosa	Magyarország, 2005
Msp1	Hae3	I	Paa	P100/04	Alnus incana	Belgium, 2002
Msp1	Hae3	I	Paa	P101/04	Alnus glutinosa	Belgium, 2000
Msp1	Hae3	I	Paa	P4/00	Alnus sp.	South Yorkshire, UK
Msp1	Hae3	I	Paa	P57/04	Alnus glutinosa	Franciaország
Msp3	Hae1	II	Paa	H-95/04	Alnus glutinosa	Szokolya, Magyarország, 2005
Msp3	Hae1	II	Paa	H-97/04	Alnus glutinosa	Szokolya, Magyarország, 2005
Msp3	Hae1	II	Paa	H-98/04	Alnus glutinosa	Szokolya, Magyarország, 2005
Msp1	Hae3	II	Pau	P5/00	Alnus sp.	Svédország
Msp3	Hae1	II	Pau	155a	Alnus glutinosa	Hanság, Magyarország, 1999
Msp3	Hae1	II	Pau	155b	Alnus glutinosa	Hanság, Magyarország, 1999
Msp3	Hae1	II	Pau	155c	Alnus glutinosa	Hanság, Magyarország, 1999
Msp3	Hae1	II	Pau	P70/04	Alnus sp.	Partille, Svédország
Msp3	Hae1	II	Pau	P99/04	Alnus incana	Belgium, 2001
egyedi	Hae4	III	Pc	P75/04	Castanea sativa	Görögország, 1967
Msp15	Hae4	IV	Pc	P147	Lawson cypress	UK
Msp16	Hae4	V	Pc	P151	Prunus sp.	USA
Msp19	Hae4	VI	Pc	P7/04	Abies procera	Oregon, USA
Msp22	Hae4	VII	Pc	P9/04	Malus pumila	
Msp5	Hae4	VIII	Pc	P1/00	Quercus sp.	Northamptonshire, UK, 1998
Msp5	Hae4	VIII	Pc	P123	Chamaecyparis sp.	Belgium, 1978
Msp5	Hae4	VIII	Pc	P2/00	Quercus sp.	
Msp5	Hae4	VIII	Pc	P64/04	Fagus sp.	UK
Msp6	Hae4	IX	Pc	P10/04	Malus sp.	Ausztrália
Msp6	Hae4	IX	Pc	P5/04	Malus sp.	Ausztrália, 1983
Msp7	Hae4	X	Pc	P113	Castanea sativa	Ardèche, Lalevade, Franciaország, 1960
Msp7	Hae4	X	Pc	P153	Malus sp.	Ausztrália
Msp7	Hae4	X	Pc	P6/04	Malus sp.	Ausztrália, 1985
Msp8	Hae4	XI	Pc	P104/04	Fagus sp.	Németország
Msp8	Hae4	XI	Pc	P105/04	Fagus sp.	Németország
Msp8	Hae4	XI	Pc	P11/04	Rubus idaeus	Skócia
Msp8	Hae4	XI	Pc	P111		
Msp8	Hae4	XI	Pc	P112		
Msp8	Hae4	XI	Pc	P143	Rubus idaeus	Skócia
Msp8	Hae4	XI	Pc	P144	Rubus idaeus	Skócia
Msp8	Hae4	XI	Pc	P154	Quercus petraea	
Msp8	Hae4	XI	Pc	P2/04	Fagus sylvatica	UK
Msp8	Hae4	XI	Pc	P3/04	Prunus avium	Michigan
Msp8	Hae4	XI	Pc	P43/04	Acer	Franciaország (Jura), 1982

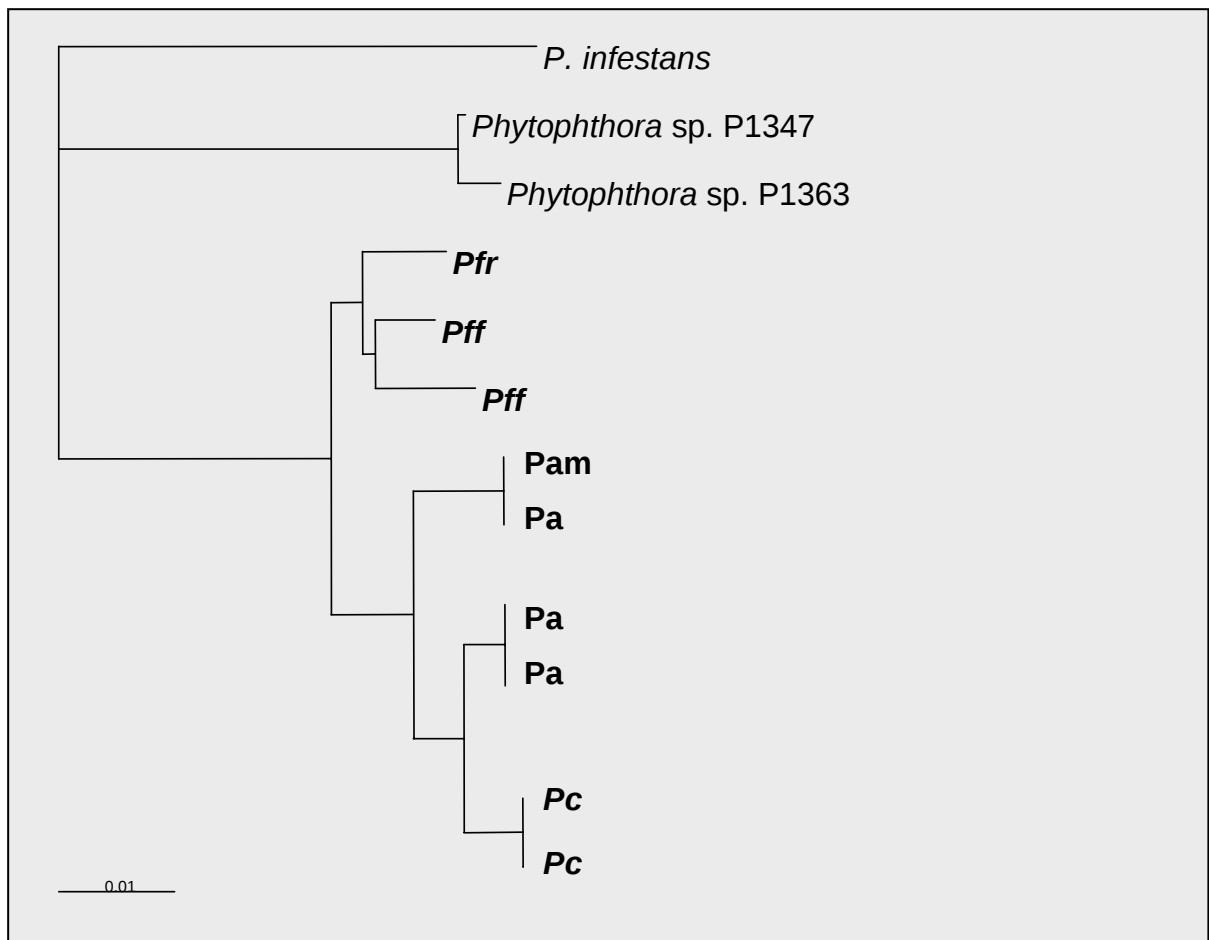
					pseudoplatanus	
Msp8	Hae4	XI	Pc	P51/04	Castanea soil	Franciaország
Msp8	Hae4	XI	Pc	P52/04	Castanea soil	Franciaország
Msp8	Hae4	XI	Pc	P63/04	Rubus sp.	Skócia
						Pont-de La Maye Bordeaux, Franciaország,
Msp9	Hae4	XII	Pc	P118	Acer sp.	1989
Msp9	Hae4	XII	Pc	P146	Rubus idaeus	Skócia
Msp9	Hae4	XII	Pc	P148	Castanea sativa	Olaszország
Msp9	Hae4	XII	Pc	P149	Prunus sp.	Ausztrália
Msp9	Hae4	XII	Pc	P150		Ausztrália
Msp9	Hae4	XII	Pc	P4/04	Prunus avium	Adelaide Hills, Ausztrália
Msp10	Hae5	XIII	Pc	P1/04	Prunus amygdalus	Ausztrália
Msp14	Hae5	XIV	Pc	P117	Prunus amygdalus	Ausztrália, 1983
Msp18	Hae5	XV	Pc	P59/04	Prunus amygdalus	Ausztrália, Willunga., 1985
					Andromeda	
Msp11	Hae6	XVI	Pc	P114	floribunda	Lengyelország, 1961
Msp12	Hae7	XVII	Pc	P115	Malus pumila	Korea, 1996
Msp21	Hae8	XVIII	Pc	P8/04	Malus sylvestris	Ausztrália
Msp13	Hae9	XIX	Pc	P116	Abies procera	Írország
Mspfrag1	Haefrag2	XX	Pfr	P13/04	Rubus idaeus	New York
Mspfrag1	Haefrag2	XX	Pfr	P14/04	Rubus idaeus	Ohio
Mspfrag1	Haefrag2	XX	Pfr	P3/00	Rubus sp.	Skócia
Mspfrag1	Haefrag1	XXI	Pfr	P55/04	Rubus sp.	Franciaország
Mspfrag1	Haefrag1	XXI	Pfr	P67/04	Rubus idaeus	Skócia
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P12/04	Fragaria sp.	UK
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P15/04	Fragaria sp.	Németország
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P16/04	Fragaria sp.	Skócia
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P17/04	Fragaria sp.	Skócia
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P19/04	Fragaria sp.	Kanada
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P20/04	Fragaria sp.	Skócia
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P24/04	Fragaria sp.	Maryland
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P25/04	Fragaria sp.	California
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P26/04	Fragaria sp.	UK
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P18/04	Fragaria sp.	Skócia
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P66/04		
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P21/04	Fragaria sp.	Hollandia
Mspfrag2	Haefrag3	XXII	Pff	P65/04		
Mspfrag3	Haefrag4	XXIII	Pff	P23/04	Fragaria sp.	Oregon

Jelmagyarázat: Paa = *P. alni* ssp. *alni*, Pau = *P. alni* ssp. *uniformis*, Pam = *P. alni* ssp. *multiformis*, Pc = *P. cambivora*, Pff = *P. fragariae* var. *rubi*, Pff = *P. fragariae* var. *fragariae*.

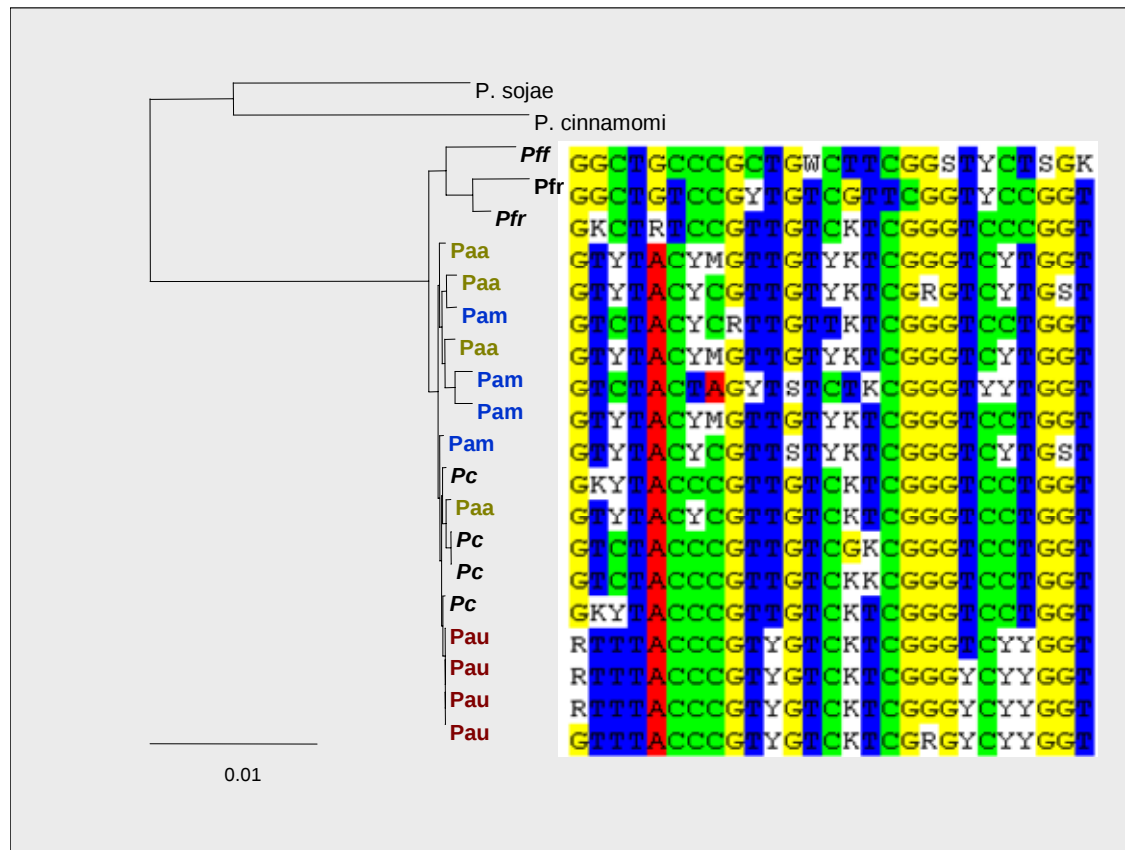
RFLP eredményeinket szeretnénk volna közzétenni „impakt faktoros” szakfolyóiratban, de egy francia kutatócsoport időközben, velünk azonos módszert alkalmazva, hasonló eredményeket publikált (Ioos és mtsai 2006). Sőt, a *P. alni* 3 alfajának kialakulására a korábbi nézetnek ellentmondó evolúciós modellt vázoltak. Ezért szükségesnek tartottuk eddigi eredményeink publikálását elhalasztani, hogy újabb adatokkal erősíthessük meg munkánkat. Eredeti vállalkásunk a pályázat harmadik évére (2006) a kórokozók mitokondriális DNS-einek fizikai térképezése volt. Jóllehet elkezdtük a magi DNS-től megtisztított mtDNS preparátumok készítését centrifugálással cézium-klorid grádiensben, a fenti okok miatt inkább olyan feladatokra összpontosítottunk, melyekkel a két, egymásnak ellentmondó evolúciós modell helytállóságát vizsgáljuk új megközelítésben. Mindez azt jelenti, hogy a fizikai térképezés helyett áttértünk izolátumaink több, sejtmagban (elongációs faktor, β -tubulin) és mitokondriumban (citokróm-c oxidáz, NADH1) kódolt génszakaszának szekvenciaelemzésére. A szóban forgó szakaszokat PCR során sokszorozítjuk mások módszerét követve (Kroon és mtsai 2004). Eddig az elongációs faktor, citokróm-c oxidáz és NADH1 génszakaszok mintegy 1400 klónját állítottuk elő a hibridek és feltételezett szülőfajaik különböző mtDNS RFLP mintázatú törzseiből PGEM-T vektorba történő klónozással. A nagyszámú klónra a di- és poliploid izolátumokon belüli változékonyság megállapítása miatt is szükség van. Két génszakasz (NADH1 és elongációs faktor) több száz klónját már szekvenáltuk, jelenleg további klónok szekvenálása és a szekvenciák elemzése folyik. E vizsgálatok, valamint a már meglévő szekvenciák teljes kiértékelése tehát még nem zárult le. Előzetesként elmondható, hogy a NADH1 nukleotidsorrendje alapján kapott csoportosítás teljes összhangban volt az RFLP-adatokkal: a *P. alni* ssp. *alni* izolátumokban megfigyelt kétféle mtDNS-haplotípus egyike a ssp. *multiformis*, a másik pedig a ssp. *uniformis* változatokban van jelen (1. ábra). Két vagy több haplotípus egy izolátumban való előfordulására utaló jeleket nem találtunk. A különböző NADH1-klónok között legfeljebb 12 ponton találtunk eltéréseket. A *P. alni*, *P. cambivora* és *P. fragariae* vizsgált izolátumai jól elhatárolható csoportokat alkottak. Ezzel szemben az eddig összesen 25 polimorf helyet tartalmazó, sejtmagban található elongációs faktor gén akár egy adott izolátumon belül is különböző alléleket tartalmazott (2. ábra), ami rekombinációs (netán mutációs) eseményekre utal. A *P. alni* és *P. cambivora* törzsek e jelleg tekintetében nem különültek el, a *P. fragariae* viszont jól elhatárolódott tőlük. Valószínű, hogy a *P. cambivora* genomja dominál a hibridekben.

Munkánkat csoportunk személyi összetételében, ill. a pályázati résztvevők számának csökkenésében bekövetkezett változások lassították. Som Virág PhD hallgató a futamidő

felénél abbahagyta tanulmányait. Nagy Zoltán tudományos munkatárs összesen 9 hónapot töltött külföldön, nem a pályázati témán tevékenykedve. Érsek Tibor pedig a korábbi teljes munkaidős foglalkoztatás helyett 4 órás munkaviszonyban dolgozott 2006 szeptemberétől. A már meglévő adatok és a hamarosan megszülető újabb szekvencia adatok birtokában a futamidő lejártát követő 2 éven belül szeretnénk publikálni eredményeinket. Ezért kérem a jelentés ismételt értékelését kiegészítő eljárás keretében a későbbiek során.



1. ábra. NADH1-szekvenciák alapján felállított előzetes törzsfa. Paa = *P. alni* ssp. *alni*, Pau = *P. alni* ssp. *uniformis*, Pam = *P. alni* ssp. *multiformis*, Pc = *P. cambivora*, Pff = *P. fragariae* var. *rubi*, Pff = *P. fragariae* var. *fragariae*.



2. ábra. Elongációs faktor szekvenciák alapján felállított előzetes törzsfa és a polimorfizmusok jellege a sokszorosított szakaszokban. Paa = *P. alni* ssp. *alni*, Pau = *P. alni* ssp. *uniformis*, Pam = *P. alni* ssp. *multiformis*, Pc = *P. cambivora*, Pff = *P. fragariae* var. *rubi*, Pfr = *P. fragariae* var. *fragariae*.

Irodalomjegyzék

Bakonyi, J., Nagy, Z. Á. and Érsek, T. (2006): PCR-based DNA markers for identifying hybrids within *Phytophthora alni*. J Phytopath. 154: 168–177.

Bakonyi, J., Nagy, Z. Á. and Érsek, T. (2007): A novel hybrid with the nuclear background of *Phytophthora alni* subsp. *alni* exhibits a mitochondrial DNA profile characteristic of *P. alni* subsp. *uniformis*. Acta Phytopath. Entom. Hungarica 42: 1–7.

Brasier, C. M., Cooke, D. E. L. and Duncan, J. M. (1999): Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5878–5883.

Brasier, C. M., Kirk, S. A., Delcan, J., Cooke, D.L., Jung, T. and Man in't Veld, W. (2004): *Phytophythora alni* sp. nov. and its variants: designation of a group of emerging heteroploid hybrid pathogens. Mycol. Res. 108: 1172–1184.

Ioos, R., Andrieux, A., Marcais, B. and Frey, P. (2006): Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. Fungal Genet. Biol. 43: 511–529.

Jung, T., Blaschke, H. and Neumann, P. (1996): Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. Eur. J. For. Pathol. 26: 253–272.

Koltay, A. (2001): A mézgás éger pusztulása a hazai állományokban. Növényvédelmi Tanácsok 10: 36–38.

Kroon, L. P. N. M., Bakker, F. T., van den Bosch, G. B. M., Bonants, P. J. M. and Flier, W. G. (2004): Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Fung. Genet. Biol. 41: 766–782.

Nagy, Z. Á., Szabó, I., Bakonyi, J. és Érsek T. (2000): A mézgás éger fitoftórási betegsége Magyarországon. Növényvédelem 36: 573–579.

Nagy, Z. Á., Bakonyi, J., Fischl, G. és Érsek, T. (2002): Egy fitoftórahíbrid két típusa a hazai égerekben. Növényvédelem. 38: 289–294.

Peace, T. R. (1962): Pathology of trees and shrubs. Oxford University Press, Oxford, UK.

Szabó, I., Nagy, Z. Á., Bakonyi, J. and Érsek, T. (2000): First report of *Phytophthora* root and collar rot of alder in Hungary. Plant Dis. 84: p. 1251.

Varga, F. (2000): A mézgás éger fitoftórási betegségének megjelenése Magyarországon. Összefoglaló 46. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, p. 126.