

Az OTKA Tudományos Iskola pályázat keretében az alábbi hallgatók nyújtottak be vagy védtek meg sikeresen a 2003-2005 periódusban Ph.D. értekezéseket:

Béky Emese, Divéki Zoltán, Huppert Emese, Hegedűs Krisztina, Józsa Rita (sikeresen védett hallgatók) Gellért Ákos, Jeney Apor, Mihálka Virág, (értekezés benyújtva- védelem alatt). A fenti hallgatók a tudományos Iskola pályázat keretében megfogalmazott kutatási feladatok végrehajtásában vettek részt.

A kutatási eredmények ismertetése:

A burgonya Y vírus köpenyfehérje hibridjeinek előállításának és fertőzőképességük vizsgálata alprogram

A burgonya Y vírus [Potato virus Y (PVY)] fertőzi a Solanaceae családba tartozó fontos haszonnövényeket, legjelentősebb kártételei a burgonya esetében ismertek. Legalább három általánosan elterjedt, klasszikus értelemben vett törzse létezik, de ennél több patotípust írtak le. A hazánkban legnagyobb károkat okozó és a többihez képest túlnyomó részt jelen lévő törzs a PVY-NTN. Ez a törzs a burgonya gumó nekrotikus gyűrűsfoltosság, az egyik legsúlyosabb vírusos burgonyabetegség okozója. A vírusok elleni modern védekezéshez a rezisztenciára való nemesítés a legígéretesebb út. Ehhez azonban elengedhetetlen az adott vírus alapos ismerete, amely modern molekuláris módszerek alkalmazása nélkül nem tekinthető kielégítőnek. Különösen az RNS vírusok esetén alapvető fontosságú az, hogy rendelkezésre álljon a vírus fertőzőképes cDNS klónja, amely így a vírusgenomot manipulálható formában tartalmazza. A PVY-ből egészen 1997-ig nem sikerült ilyen teljes cDNS klónt előállítani, és tudomásunk szerint a kész klón felhasználásával kapcsolatos további közlemények még nem születtek. Célunk az volt, hogy a PVY köpenyfehérjéjének (coat protein - CP) szerepét megvizsgáljuk a vírus egyes törzseire jellemző különböző tünetek kialakításában. Ehhez olyan hibrid vírusokat állítottunk elő, amelyek háttérét a PVY-N törzs genomja alkotja, a köpenyfehérje régió pedig más törzsek (PVY-NTN, PVY-O, ill. PVY-N-Wilga) CP-iből származik. Ezután *Nicotiana benthamiana* növények génpuskával való inokulálásával ellenőriztük, hogy a kimérák megtartották-e fertőzőképességüket. Több párhuzamos kísérlet után elmondható, hogy az NTN és az O hibrid biztosan megőrizte, míg az N-Wilga hibrid esetén ez még nem bizonyított. A két új fertőzőképes hibrid és a három szülői törzs (PVY-N, PVY-NTN, PVY-O) birtokában ezután széleskörű gazdanövény fertőzési

kísérletet indítottunk. Ennek során elsősorban olyan fajokat kerestünk, amelyeken a hibridek egymáshoz képest eltérő, vagy a szülői vírussal azonos tüneteket okoznak. Négy *Nicotiana* fajt (*N. tabacum* cv. Xanthi, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica*), négy *Physalis* fajt (*Ph. floridana*, *Ph. pubescens*, *Ph. peruviana*, *Ph. alkekengi*), négy paradicsom fajtát (*L. esculentum* cv. Manó, Marmande, Mobil, Zömök), négy burgonya fajtát (*S. tuberosum* cv. Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Gülbaba, Russet Burbank) és néhány *Chenopodium* fajt inokuláltunk. Az eddigi eredmények alapján a 'Mindenés' burgonyafajta a hibrid klónokkal nem, míg a szülői törzsekkel fertőzhető. A *Physalis floridana* mint a legtöbb megvizsgált faj mindegyik vírussal fertőzhető volt, ám ebben az egy esetben tapasztaltunk jellegzetes tünetbeli különbségeket is. A PVY-N nagyon enyhe, mozaikszerű tüneteket okozott. Ezzel azonos képet mutatott a PVY-N/NTN hibrid, ami arra utal, hogy az NTN köpenyfehérje nem meghatározó a PVY-NTN szülőre jellemző (erős mozaik) tünetek kialakulásában. Ezzel épp ellenkező eredményt adott a PVY-N/O, amelyen a PVY-O-ra jellemző tünetek pontszerű léziók, melyek később nekrotizálódnak alakultak ki, azt sejtetve, hogy itt viszont a CP befolyásolja a törzsre jellemző tüneteket.

Cucumovírusok betegség tünetben játszott szerepének molekuláris analízise alprogram

Dohány fajokon a legtöbb uborka mozaik vírus (cucumber mosaic virus, CMV) törzs, például az Rs-CMV szisztémikus fertőzést idéz elő. Azonban az Ns-CMV törzs nekrotikus lokális léziót okoz *N. glutinosa*-n és *N. tabacum* L. cv. Xanthi-nc-n, míg *N. clevelandii*-n (Gray) szisztémikus nekrozist, végül csúcselhalást idéz elő. Munkánk során előállítottuk az uborka mozaik vírus Ns és Rs törzseinek teljes hosszúságú genomi cDNS klónjait (N1, N2 és N3, valamint R1, R2 és R3). A klónokról *in vitro* szintetizált RNS-ek fertőzőképesnek bizonyultak, és az eredeti vírusokra jellemző tüneteket indukálták. Meghatároztuk a genomi cDNS klónok teljes nukleotidsorrendjét. A kapott adatokat az alábbi hivatkozási számokon helyeztük el az EMBL nukleotid adatbázisában: N1: AJ580953, N2: AJ511989, N3: AJ511990, R1: AJ511988, R2: AJ517801, R3: AJ517802. Előállítottuk mind a hat lehetséges Ns/Rs reasszortáns vírust. Segítségükkel megállapítottuk, hogy az Ns törzs nekrozist okozó képessége kizárólag az RNS 1 molekulához köthető. Kiméra vírusok létrehozásával behatároztuk a nekrozis indukálásáért felelős genetikai determinánst a cDNS 1 Csp45I EcoRV endonukleáz hasítóhelyek közötti 175 nt hosszúságú szakaszára. A két törzs 1a fehérjéjének aminosavsorrendje a cDNS 1 Csp45I EcoRV szakaszának megfelelő régióban öt helyen tér el. Létrehoztuk az R1-en alapuló rL456F, rR461C, rV462Q, rV467A és rH469R mutánsokat,

melyek az adott aminosav pozíciókban az Ns 1a megfelelő aminosavait hordozzák. Ezen mutánsok és az R2, R3 klónok *in vitro* transzkriptumaival *Nicotiana* növényeket koinokulálva az rR461C mutáns léziókat indukált a tesztnövényeken. Az R1 és az rR461C klónok Csp45I EcoRV szakaszának megfelelő RNS szakaszok legvalószínűbb térszerkezetét modellezve megállapítottuk, hogy azok nem térnek el egymástól, így a nekrotikus determináns nagy valószínűséggel fehérje szinten nyilvánul meg. Létrehoztuk az rR461C mutáns N1-en alapuló ellenpárját, az nC461R-t. Az nC461R és az N2, N3 klónok *in vitro* transzkriptumaival *Nicotiana* növényeket koinokulálva az Rs törzsre jellemző tüneteket észleltük, ami azt mutatja, hogy az Ns/Rs kísérleti rendszerben az 1a fehérje 461. aminosava alapvetően meghatározza a vírus tüneteinek típusát. Az R461C mutációt a II. alcsoportba tartozó Trk7 törzs 1a fehérjéjébe beépítve a mutáns a vad típusú vírussal megegyező tüneteket okozott, ami más gazda / virális fehérjék részvételét is valószínűsíti a 461. aminosav által indukált lézió megnyilvánulásában. Az Ns törzs 1a fehérjéből a 461. aminosav kiejtése replikációra képtelen, defektív vírust eredményez. Nem tudtunk számottevő eltérést kimutatni az N1/N2/N3, R1/R2/R3, rR461C/R2/R3, valamint nC461R/N2/N3 genomösszetételű vírusok akkumulációs szintjében *N. clevelandii* protoplasztokban 24 órás inkubálás után. Az N1/N2/N3 és rR461C/R2/R3 genomösszetételű nekrotikus vírusok gyorsabban terjedtek mind rövid, mind hosszú távon *N. clevelandii* növényekben mint a szisztémikus mozaikot indukáló R1/R2/R3 és nC461R/N2/N3 genomösszetételű vírusok. Az 1a fehérje szerkezet részleges számítógépes modellezése után a 461. pozíció elicitor funkcióját vizsgáltuk. Molekuláris modellezéssel hét mutációt terveztünk, amit fertőzőképes klónok felhasználásával építettünk be a CMV genomjába. A mutációk közül három (prolin, glutaminsav, aszparagin) gátolta a vírus replikációját. Két mutációt hordozó vírus (lizin, arginin) szisztémikus tüneteket indukált. Az alanint illetve szerint tartalmazó mutánsok esetén a vírus lokalizációját figyeltük meg, de az Ns-CMV izolátumnál megfigyelt erős nekrotikus tünetek nem jelentek meg. Amennyiben a vírusfertőzéshez extrém magas koncentrációban használtunk tisztított viriont, az Ns-CMV esetén szisztémikus tüneteket figyeltünk meg. A szerint tartalmazó mutáns vírus esetén szintén megfigyeltük a vírust nem fertőzött levelekben, bár csak a csúcsi levelek kisebb szegmenseiben. Az alanint kódoló mutáns vírust a nem fertőzött levelekben soha nem detektáltuk.

Ismert hogy a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedéséhez mind a vírus mozgási fehérjéje (movement protein, MP) mind a köpenyfehérjéje (coat protein, CP) jelenléte szükséges. A cucumovírus család két tagja, az uborka mozaik vírus és a paradicsom magtalanság vírus (tomato aspermy virus, TAV) között ez a két fehérje nem cserélhető ki szabadon. Míg a CMV

mozgási fehérjéjét és a TAV köpenyfehérjéjét hordozó RNS 3 (RT rekombináns) a CMV RNS 1 és 2 jelenlétében növényeket szisztémikusan fertőzni képes vírust hoz létre, addig ennek fordítottja, tehát a TAV mozgási fehérjéjét és a CMV köpenyfehérjéjét hordozó vírus (TR rekombináns) egy sejten belül replikálódik, de a szomszéd sejtekbe nem képes átjutni. Rekombináns köpenyfehérjét illetve mozgási fehérjét hordozó vírusok segítségével kerestünk magyarázatot arra, hogy a TR rekombináns vírus miért nem képes a fertőzött sejtekből a szomszéd sejtekbe jutni. A rekombináns vírusok akkor voltak fertőzőképesek, ha a MP karboxi terminális 29 aminosava és a köpenyfehérje karboxi terminális 150 aminosava azonos vírustól származott. Munkánk alapján feltételezhető hogy a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedéséhez a MP karboxi terminális végének és a köpenyfehérje karboxi terminális kétharmadának kölcsönhatása szükséges.

A köpenyfehérje (coat protein, CP) fő feladata a vírus RNS becsomagolása, de fontos szerepe van a betegségtünetek meghatározásában is. A vírus partikulum 180 CP alegységből épül fel. Homológia modellezéssel három CMV izolátum (Trk7, R, M) köpenyfehérje szerkezetét készítettük el, majd ezeknek a modelleknek a felhasználásával értelmeztük azt, hogy a köpenyfehérje egy-egy aminosavának változás miatt okozhat jelentős változásokat a tünetek fenotípusában illetve a gazdanövénykörben. A modellezett fehérjék szekvenciája a következő hivatkozási számok alapján megtalálható az EMBL adatbázisban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): R-CMV köpenyfehérje: Y18138, M-CMV köpenyfehérje: AF268599, Trk7-CMV köpenyfehérje: L15336. A templátként használt Fny-CMV köpenyfehérje PDB adatbázis kódja: 1F15 (<http://www.rcsb.org/pdb>).

A szekvencia-összerendezéshez a Wisconsin Package Version 10.0 programcsomag GAP elnevezésű programját használtuk. A homológia modellezést a MODELLER 6.1 programmal hajtottuk végre. A homológia modellek molekulamechanikai finomítását a SYBYL 6.5 (1998) programmal hajtottuk végre. Az elektrosztatikai számításokat a GRASP program segítségével végeztük. A modellek sztereokémiai ellenőrzését a PROCHECK program számolta. A funkcionális helyeket a PROSITE adatbázis kereső programja jósolta. (<http://us.expasy.org/prosite>). A molekulagrafikát és a többi ábrát, pedig az alábbi programok segítségével készítettük el: Swiss PDB Viewer 3.7, PyMol (<http://www.pymol.org>), Corel Photo-Paint 10, CoreDraw10, PovRay 3.5.

A nagyfokú hasonlóságnak köszönhetően a modellezett szekvenciárész összerendezésében nem kellett réseket nyitni és beszúrásokra sem volt szükség. Az ismert Fny-CMV köpenyfehérje szerkezetet templátként használva három CMV izolátum homológia modelljét készítettük el. Az R, M és a Trk7-CMV CP-t a 29. aminosavtól a C-terminális végéig, a 218

aminosavig modelleztük. A templátként használt Fny-CMV CP röntgendiffrakciós szerkezet nem tartalmazza az első 28 aminosavat, mivel az N-terminális régió a vírus RNS kötés miatt rendezetlen szerkezetű. A homológia modellek megbízhatóságát sztereokémiai statisztikai mutatók igazolták. A PROSITE elnevezésű program nyolcféle funkcionális helyet jósolt: Az aszparagin-glikozilációs és amidációs helyek az összes CMV köpenyfehérjében konzerváltan megtalálhatók. cAMP/cGMP-függő protein kináz foszforilációs helyek találhatóak az R és a Trk7-CMV CP-n. Az egyetlen jósolt ATP/GTP-kötőhely a Trk7-CMV CP-n helyezkedik el. Az összes CMV köpenyfehérje szekvenciában több konzervált protein kináz C (PKC) és kazein kináz II (CK II) foszforilációs hely is található. Két nagy valószínűséggel téves funkcionális helyet is lokalizált a program: egy szekvencia közepére jósolt N-terminális mirisztoilációs helyet és ugyancsak szekvencia közepére jósolt C-terminális mikrotest célszignált. A program által jósolt funkcionális helyek szerepének vizsgálata a vírus életciklusában izgalmas feladat, melynek kezdeti lépései sem történtek még meg. A továbbiakban a leírt funkcionális helyek és a korábban közölt víruspatológia jellemzők összefüggéseit vizsgáltuk.

Az R-CMV nagyon erős törpülést okoz *Nicotiana glutinosa* növényeken, a Trk7-CMV pedig szisztémikus zöld mozaik tüneteket indukál. Az R-CMV CP aszparagint (N), a Trk7-CMV CP pedig lizint (K) tartalmaz a 193-as pozícióban. Ha a Trk7-CMV köpenyfehérjében a 193-as pozícióban levő lizint aszparaginra (N) vagy szerinre (S) cseréltük, az R-CMV-hez hasonló erős törpülést figyeltünk meg a tesztnövényeken (Szilassy és mtsai., 1999). A 193-as aminosav a H és az I béta-redő közötti β H- β I hurok régióban helyezkedik el, amely a külvilág számára jól elérhető helyen van az összeépült vírusrészecske felületén is. A Trk7 és az R-CMV CP modelljeit összehasonlítva és a funkcionális hely jöslás eredményit figyelembe véve feltűnő, hogy a 193-as pozíció közelében a 189-192 aminosavig terjedő szekvenciárészen (SKDD) egy kazein kináz II (CK II) foszforilációs hely található. Feltételezhető hogy a 193-as aminosav töltése befolyásolja a kináz kötődését a köpenyfehérje felületén. Az elektrosztatikus potenciál felületi eloszlása alapján a K193 természetesen pozitív töltésű, míg az N193 negatív polározottságú. Ez a kis eltérés azonban két különböző biokémiai utat indukál a vírushatás folyamatában. A modellszerkezeteket megvizsgálva azt is megállapíthatjuk, hogy a szóban forgó foszforilációs hely a víruspartikulum felületén helyezkedik el, így hozzáférhetősége miatt az összeépült vírusrészecskében is végbemehet a foszforilálódás. A foszforiláció pontos helye a homológiamodell alapján nem határozható meg. Feltételezhető, hogy a 188-as pozícióban található, minden CMV izolátumnál megtalálható tirozin (Y), vagy a köpenyfehérje 189-es aminosav pozíciójában elhelyezkedő

szerin (S) foszforilálódhat. A modellt tovább kívánjuk vizsgálni fertőzőképes CMV klónok mutánsainak felhasználásával.

A CMV tüneteinek kialakításában gyakran a köpenyfehérje több aminosavának van fontos szerepe. A következőkben egy ilyen esetet vizsgáltunk. Az M-CMV ellentétben a legtöbb CMV izolátummal nem fertőzi szisztemikusan a tököt, az Fny-CMV viszont igen erős tüneteket indukál. Wong és mtsai., (1999) igazolták, hogy a köpenyfehérje 129-es és a 214-es aminosava felelős a fertőzésbeli különbségért. Az M-CMV CP és az Fny-CMV CP rendre leucint (L) és prolint (P) tartalmaz a 129-es pozícióban, illetve arginint (R) és glicint (G) tartalmaz a 214-es helyen. Mutációs kísérletek során a következő kísérleti eredmények születtek: Az L129P mutáció az M-CMV CP-n klorotikus léziókat okozott 6-9 nappal az inokuláció után, az R214G mutáció törpülést és klorotikus léziók kialakulását indukálta 6-9 nappal a fertőzés után, végül pedig az L129P/R214G dupla mutáns már 3-4 nappal az inokuláció után igen súlyos törpüléses és mozaikos tüneteket okozott. Az Fny-CMV köpenyfehérje mutációi: a P129L mutáns nem bizonyult fertőzőképesnek, míg a G214R mutáns törpüléses és klorotikus tüneteket produkált 6-9 nappal a fertőzés után. A P129L/G214R dupla mutációt tartalmazó víruskonstrukció, pedig fertőzőképtelenné vált. A 129-es aminosav az első eleme a 129-től a 136-os aminosavig tartó β E- α EF hurok régióinak. A β E- α EF hurok az E jelű β -szál és az EF elnevezésű α -hélix között helyezkedik el. A β E- α EF hurok az összeépült vírusrészecske külső felületén található. A 214-es aminosav a köpenyfehérje C-terminális végén helyezkedik el, amely a vírusrészecske belseje felé orientálódik. Így a köpenyfehérje valószínűleg önálló makromolekulaként vesz részt a fertőzés folyamatában. A jóvolt funkcionális helyek térbeli elhelyezésével és a modellek elektrosztatikus potenciál mintázatának összehasonlításával vizsgáltuk a kialakuló tünetek lehetséges szerkezeti és funkcionális összefüggéseit. A 129-es aminosav közelében egy PKC foszforilációs hely található (124-126), de az elektrosztatikus potenciálokban szignifikáns eltérés nem mutatható ki, bár a leucin nagyobb és hidrofóbabb mint a prolin. A 129-es aminosavval kezdődő β E- α EF hurok régió mozgékonyasága nagyban függ a két szélső aminosav sztereokémiai tulajdonságaitól. A leucinnal kezdődő hurok jóval mozgékonyabb lehet, mint a merev prolinnal kezdődő. Az R214G és a G214R mutációk az M-CMV és az Fny-CMV CP köpenyfehérjén részleges elektrosztatikus potenciálváltozást okoznak, pozitívból semlegesbe és fordítva. Ha arginin van a 214-es pozícióban, akkor egy PKC foszforilációs hely alakul ki ebben a régióban (S212-T213-R214). A kísérleti eredményekkel egybevetve az a következtetés vonható le, hogy a 212-es helyen történő foszforiláció csökkentheti a fertőzés hatékonyságát. Az M-CMV köpenyfehérje L129P/R214G dupla

mutációja esetén a β E- α EF hurok régió merev és nincs jelen foszforilációs hely a 214-es pozíció környezetében, tehát a két mutáció egymás hatását felerősítve igen súlyos tüneteket indukál a gazdanövényen. Az Fny-CMV köpenyfehérje P129L/G214R dupla mutációja pedig mozgékony β E- α EF hurok régióval rendelkezik és a S212 is foszforilálódhat, következésképpen a két mutáció együttes hatására a vírus sejtről-sejtre terjedése minimális, a szisztémikus fertőzéshez elégtelen szintre csökken. Érdekes módon az M-CMV köpenyfehérje mutációja és az Fny-CMV köpenyfehérje P129L mutációja egyformán nem foszforilálható és ugyanolyan mozgékony β E- α EF hurkot tartalmaz, azonban a M-CMV mutáns konstrukció klorotikus és törpülésszerű tüneteket produkál az Fny-CMV, viszont nem fertőzőképes. Tehát Fny-CMV esetében a β E- α EF hurok régió növekvő mozgékonyasága a fertőzőképesség elvesztését okozza, míg az M-CMV-ben, ahol eredetileg is mozgékony volt a β E- α EF hurok régió, a R214G mutáció miatt elvesztett foszforilációs lehetőség fertőzőképesé tette a víruskonstrukciót. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a 212-es helyen történő foszforiláció és a mozgékony β E- α EF hurok régió egymás hatását gyengítve közrejátszanak a fertőzési folyamat gátlásában.

A kukorica rezisztens az M-CMV fertőzésével szemben, míg az Fny-CMV fertőzi azt. Ryu és munkatársai (1998) bizonyították, hogy a tünetek kialakulásáért egyedül a köpenyfehérje felelős. Az M-CMV köpenyfehérjét legalább két helyen kell módosítani ahhoz, hogy legyőzze a kukorica rezisztenciáját. Két egyszeres (L129P, T162A) és egy kétszeres (L129P/T162A) mutáns felhasználásával igazolták, hogy csak a két köpenyfehérje pozíció együttes változtatásával indukálható a rezisztencia áttörése. Egyik egyszeres mutáns sem volt képes a kukorica fertőzésére, csak a L129P/T162A dupla mutáns. A 129-es aminosavval kezdődő β E- α EF hurok régió szerepét az előző bekezdésben részletesen tárgyaltuk. A kukorica fertőzés esetén is hasonló következtetések vonhatók le. A 162-es aminosav oldalláncai a köpenyfehérje felszínén helyezkednek el, viszont az összeépült vírus részecske belsejében vannak. A 162-es pozíciók környezetében szignifikáns elektrosztatikus potenciálbeli eltérések nem tapasztalhatóak. A PROSITE funkcionális hely kereső program nem jósolt foszforilációs helyet ezekre a pozíciókra, bár a T162 foszforilálódhat. Tehát a köpenyfehérje foszforiláltsági állapota befolyásolhatja a vírus sejtről-sejtre terjedését. Érdekes módon a modellben a 168-as pozícióhoz térben közel található egy jósolt PKC foszforilációs hely (124-126). Az L129P CP mutánsban a β E- α EF hurok régió merev, a T162 aminosav pedig foszforilálható. A T162A mutáció esetében nem lehetséges foszforiláció sem, a 162-es pozícióban, valamint a β E- α EF hurok régió mozgékony a L129 mutáció miatt. A fertőzőképes

L129P/T162A dupla mutáció esetén a hurok régió merev és a A162 aminosav nem foszforilálható.

Összefoglalva a megfigyeléseket elmondhatjuk, hogy a β E- α EF hurok régió merevsége szükséges, de nem elégséges feltétele a fertőzés kialakulásának kukoricán. A 162-es pozícióban történő foszforiláció egyértelműen gátolja a fertőzés folyamatát. Extrapolálva következtetéseinket más CMV izolátumokra feltételezhetjük hogy az R-CMV (P129, A162, Y168) és Trk7-CMV (P129, A162, Y168) fertőzi a kukoricát.

Irodalom

Ryu K.H., Kim C-H., Palukaitis P. (1998). The coat protein of *Cucumber mosaic virus* is a host range determinant for infection of maize. *MPMI* 11:351-357.

Szilassy D., Salánki K., Balázs E. (1999). Stunting induced by Cucumber mosaic cucumovirus-infected *Nicotiana glutinosa* is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *MPMI* 12:1105-1113

Wong S.M., Thio S.S.C., Shintaku M.H., Palukaitis P. (1999). The rate of cell-to-cell movement in squash of *Cucumber mosaic virus* is affected by sequences of the capsid protein. *MPMI* 12:628-632

Penészgomba ellenállóság kialakításának lehetősége magasabbrendű növényekben alprogram

A gombák által okozott betegségek komoly termés kiesést okoznak, az ellenük történő védekezés során kijuttatott vegyszerek pedig erősen megterhelik a környezetet. Rezisztens vagy toleráns fajták termesztésével csökkenteni lehetne a károkat. Hagyományos nemesítés során nagyon nehéz ilyen fajtákat előállítani, hiszen mind a szelekció, mind pedig az ellenálló fajokkal, fajtákkal való keresztezés hosszadalmas folyamat, és sokszor nem is vihető véghez. Biotechnológiai módszerek alkalmazásával egyszerűbben lehet toleráns fajtákat előállítani, mint a hagyományos nemesítéssel. Az egyik legígéretesebb módszer, amikor olyan géneket fejeztetnek ki a növényben, amelynek a terméke vagy toxikus a kórokozó számára, vagy csökkenti annak növekedését. Ilyenek a hidrolitikus enzimek (kitinázok, glükánázok), antifungális fehérjék, antimikrobiális peptidek és a fitoalexinek termeléséért felelős gének. Az irodalomban több olyan sikeres kísérletről számoltak be, amelyek során hidrolitikus enzimek génjeit fejezték ki a növényekben. A hidrolitikus enzimek közé tartoznak a kitinázok, amelyek nagyon fontos szerepet játszanak a gombák elleni védekezésben, mert hidrolizálják a kitint,

amely a legfőbb sejtalkotója nagyon sok növénypatogén gombának. Többféle élőlény termel kitináz enzimet, de különböző minőségben és mennyiségben. Többféle eredetű (növényi, bakteriális, gombából származó) kitináz enzim képzéséért felelős gént juttattak be növények genetikai állományába. A legígéretesebb eredményeket akkor érték el, amikor *Trichoderma* fajok kitináz-génjeivel dolgoztak. A *Trichodermák* nemzetségét gombapatogén gombák alkotják, a biológiai növényvédelemben is ismertek. Az egyik legelső közlemény, amelyben a *Trichoderma*-indukált rezisztenciáról írtak, azt mutatta be, hogy a *Trichoderma harzianum* gátolta a *Botrytis cinerea* csírázását bab növényeken. Ebben a kísérletben közvetlenül használták fel a gombát, később már úgy alakítottak ki rezisztenciát dohányban és burgonyában, hogy a *Trichoderma harzianum* endokitináz génjét fejezték ki a növényekben. Ezzel a módszerrel dohányban, almában és szőlőben értek el megnövekedett ellenállóságot különböző növénykórokozó gombákkal szemben. Azonban nemcsak a *Trichoderma harzianum* használható a biológiai növényvédelemben. Hazai kutatások során más *Trichoderma* fajokat is vizsgáltak, és kimutatták, hogy a *Trichoderma hamatum* is erős gombagátló hatással rendelkezik, amely hatást a gomba által termelt endokitináz enzim idézi elő. Úgy gondoltuk, hogy az enzim termeléséért felelős gén kifejeztetése növényekben megnövelheti azok gomba-betegségekkel szembeni toleranciáját. Hipotézisünket először egy modell-növényen, a dohányon kívántuk alátámasztani. A *Trichoderma hamatum* 42 kDa-os endokitinázát kódoló gént transzformáltuk dohány növényekbe. A transzformáló konstrukcióban a kitináz gén a karfiol mozaik vírus 35S promóterének irányítása alatt állt, ezáltal konstitutívan, vagyis a növény élete során folyamatosan termelte az endokitináz enzimet. A transzformáló vektor kanamycin rezisztenciáért felelős gént is tartalmazott, amely lehetővé tette, hogy a növényeket előzetesen szelektáljuk. PCR tesztek bizonyították, hogy a felnevelt és vizsgált növények tartalmazták a *Trichoderma hamatum* endokitináz génjét. A transzgénikus növényeket többféle módszerrel fertőztük szabadföldről származó *Botrytis cinerea*-val. Az ellenőrzött körülmények között történő szürkepenész-fertőzések során megállapítottuk, hogy a transzgénikus vonalak különböző mértékű, de nagyobb toleranciát mutatnak a gombával szemben, mint a vad típusú növények. A fertőzések során azt tapasztaltuk, hogy egy vonal (7. számú) mindegyik kísérletben a legerősebb, esetenként a kontrollhoz hasonló tüneteket mutat, míg más vonalakon (5. és 9. számú) a leggyengébb tünetek jelentek meg, függetlenül a fertőzés módjától. Azonban a szárát fertőzve minden vonalban súlyos tünetek, sokszor pusztulás volt megfigyelhető, amelyből azt a következtetést vontuk le, hogy a transzgén kifejeződésének mértéke a szárban nem megfelelő. A transzgénikus vonalakban megnövekedett kitináz-aktivitást mutattunk ki, indukció nélkül is.

Azonban az általunk alkalmazott módszerrel nem találtunk különbséget a toleráns és a kevésbé ellenálló vonalak kitináz-szintje között. A vizsgált gén a második és harmadik utódnemzedékből is kimutatható volt. További vizsgálatok szükségesek a kitináz-szint pontosabb vizsgálatára. Jelenleg egy fluorimetrián alapuló módszert tesztelünk, amellyel az egyes vonalak kitináz szintje közötti különbségeket lehet számszerűsíteni.

Továbbá szeretnénk növelni a transzgén kifejeződésének mértékét, főképp a szárban. Ehhez olyan konstrukciót kívántunk létrehozni, amely sebzésre aktiválódik, és erősebb hatású, mint az általunk eddig használt. Ennek érdekében olyan konstrukciót készítettünk, amelyben a *Trichoderma hamatum* endokitináz génje az *Arabidopsis thaliana* 7-es számú actin promóterének irányítása alatt áll, amely azt teszi lehetővé, hogy az enzim termelése csak mechanikai sérülés esetén következzen be. Ettől a módszertől azt várjuk, hogy az enzim szintje a kórokozó támadása esetén ugrásszerűen megemelkedik, ezáltal hatékonyabb védelmet biztosít a növény számára.

Ezzel a konstrukcióval is először a dohány növények transzformálását végeztük el. A transzformációból származó növények előzetes szelektálását itt is a konstrukcióba beépített kanamycin rezisztenciáért felelős gén tette lehetővé. A kanamycint tartalmazó táptalajon fejlődő növényeket PCR technikával ellenőriztük, és közülük 46 vonal került növényházi kiültetésre. Ezeket a vonalakat kezdtük el párhuzamosan a kitináz enzim szintjének a vizsgálatát és a szürkepenész-ellenállóság ellenőrzését. Előzetes eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az egyes vonalak kitináz szintje között jelentős különbségeket találtunk, de jelenleg nem még nem tudjuk, hogy ez a különbség az ellenállóság mértékében is megmutatkozik-e.

A még hiányzó eredmények ellenére azonban elmondhatjuk, hogy a pozitív eredmények alátámasztották azt a hipotézisünket, hogy *Trichoderma* endokitináz gén segítségével ellenállóbb növényi vonalakat lehet létrehozni, tehát megkezdhetjük a munkát gazdaságilag fontos növényekkel is. Fő célunk, hogy szürkepenész ellenálló málna, szeder és szeder málna vonalakat hozzunk létre. Ehhez elkezdtük a regenerációs rendszer kidolgozását. 6 málna, 1 szeder málna és 1 szeder fajtát vontunk be a kísérletbe, nagy részük magyar nemesítésű fajta. Kísérleteink jelenlegi eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az egyes fajták válaszadóképessége között jelentős különbségek vannak. Vizsgálataink kiterjednek az anyanövények fenntartására, a megfelelő tenyészanyagok megtalálására, a fenntartás illetve a regeneráció táptalajának ideális összeállítására, a fény hatására a regeneráció során. Fontos szempont a kiindulási növények kora, illetve az, hogy melyik növényi rész használható a regeneráció során. A táptalaj összeállításánál fontos szempont a mikro- és makroelemek, a különböző

vitaminok és hormonok aránya, és a táptalajhoz adott szénforrás minősége és mennyisége. Azért szükségesek ezek a minden tényezőre kiterjedő vizsgálatok, mert az irodalomban leírt módszerek nagyon fajtafüggőek, az eredmények nehezen reprodukálhatóak. Szerzők abban viszont egyetértenek, hogy a *Rubus* fajok rekalcitránsak, vagyis regenerációs hajlamuk gyenge. Munkánk során jó regenerációt értünk el a szedermálna és néhány málna vonal esetében, azonban a kísérletek tovább folynak, hogy olyan módszert dolgozzunk ki, amely minden vonalnál jól alkalmazható.

Kalászfuzáriózis alprogram

A búza kalászfuzáriózisa, mely betegséget a nemzetközi szakirodalomban FEB (*Fusarium ear blight*) néven tartanak nyilván, a világ valamennyi gabonatermesztő régiójában elterjedt. Minthogy nem jelentkezik minden évjáratban, sokhelyütt nem folytatnak rendszeres védekezést ellene. Mennyiségi veszteségeket és sütőipari értékcsökkenést is okoz a FEB, igazi veszélyessége azonban abban rejlik, hogy a betegségért felelős gombafajok emberre-állatra ártalmas mikotoxinokat termelnek.

Két éven át (2003, 2004) folytattunk felvételezéseket az ország 10 helyszínén olyan őszi búza állományokban, amelyekben nem végeztek kalászfuzáriózis (FEB) elleni állomány-permetezést. A program célja az volt, hogy megállapítsuk a FEB kórokozóinak elterjedtségét, a mikotoxin szennyezettség mértékét, valamint az időjárási tényezők járványtani szerepét. A kórokozókat (*Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale*) fajspecifikus PCR módszerrel azonosítottuk, amely alkalmasnak bizonyult a látens fertőzöttség kimutatására is. Tejes éréskor, valamint aratáskor vettünk mintákat, és a szemtermést, illetve a pelyvalevelet egyaránt vizsgálat alá vetettük. Minden tábláról 200-200 kalászt gyűjtöttünk véletlenszerűen.

Mini Gro3 készülék segítségével (Sky Instrument, Wales, Nagy-Britannia) rögzítettük a meteorológiai adatokat (hőmérséklet, relatív páratartalom, levélfelület nedvesség, csapadék mennyisége) óránkénti gyakorisággal, a virágzást megelőző 10. naptól a betakarításig.

A szemtermés- és pelyvalevél mintákat mikotoxinok jelenlétére is vizsgáltuk. Négyféle toxint – dezoxinivalenolt (DON), diacetoxiszcirpenolt (DAS), nivalenolt (NIV) és zearalenont (ZEA) – mértünk gázkromatográfiával és tömegspektrometriával.

2003-ban összesen 30 mintában 180 fajspecifikus PCR-detektálást végeztünk. Mindössze 31 esetben tudtunk gomba-DNS-t kimutatni (17.2%), s e pozitív eseteknek is több mint

egyharmada (11) a pelyvára esett (1. táblázat). A szemtermésben csak *F. culmorum*, *F. graminearum* és *F. poae* fordult elő. Három olyan helyszín is volt, Szeged, Kecskemét és Kompolt, ahol a szemtermésben semmiféle gombaeredetű DNS nem fordult elő. Ami az egész, 2003. évi felmérést illeti a *F. graminearum* volt a leggyakoribb faj (17 eset), ezt követte a *F. poae* (8), majd a *F. culmorum* és a *F. avenaceum* (3-3). Sehol nem észleltük a két *Microdochium*-fajt. A PCR-vizsgálatok alapján jól előre lehetett jelezni a betakarítás idején várható fertőzöttséget: azon a helyszínen, ahol tejeséréskor fertőzést észleltünk, ott betakarításkor is kimutatható volt az adott kórokozó, s csupán egyetlen esetben tapasztaltuk azt, hogy aratás idejére visszaszorult a tejes éréskor tapasztalt fertőzés. (A pszichotróf *F. avenaceum*mal történt ez meg Szegeden).

2004-ben – követve a 2003. évi mintavételi rendet – viszonylag sok PCR-pozitív esetet rögzítettünk, szám szerint 66-ot (2. táblázat). Mind a 6 faj előfordult, leggyakrabban a *F. graminearum* (21), majd a *F. poae* (17). A szemtermésben is a *F. graminearum* volt a leggyakoribb (7), ezt követte a *M. nivale* var. *nivale* (4), majd a *M. nivale* var. *majus*, a *F. avenaceum* és a *F. poae* (3-3), legvégül pedig a *F. culmorum* (1 esetben). Két olyan helyszín (Kecskemét és Kompolt) azért még ebben az évben is akadt, ahol nem találtunk a szemben gomba-DNS-t. Tízből hat szemtermés tételben mutattunk ki mikotoxint, s előfordult egy – hazai viszonyok között – kiugróan magas DON-adat is, amit a Rőjtökmuzsajon gyűjtött mintában mértünk ($847 \mu\text{g kg}^{-1}$), és amit az egyébként ritkán előforduló *F. culmorum*-fertőzöttség rovására írhatunk. A többi helyszínen a *F. graminearum* felelt a DON-kontaminációért, a NIV-szennyeződést pedig a *F. poae* jelenléte okozta. Az egész vizsgálat-sorozatban egyedül ebben az esztendőben találtunk zearalenont, egy Enyingen gyűjtött tételben; az elhanyagolhatóan kicsiny szennyeződésért ($5.2 \mu\text{g kg}^{-1}$) a *F. graminearum* volt a felelős.

A felmérés során alkalmazott diagnosztikai PCR eljárás rendkívül érzékeny, akár 0.002 ng ml^{-1} alatti DNS koncentráció kimutatására is alkalmas. Ez a különleges érzékenység tette lehetővé azt, hogy nagy mintaszámon (összesen 20 000 kalászt vizsgáltunk!) gyors és pontos fajazonosítást végezzünk. A módszer nagyfokú érzékenysége hitelesíti a most közölt eredményeket, magyarul: ahol ezzel az eljárással nem tudtuk kimutatni a hat FEB kórokozó egyikét sem, ott hagyományos eszközökkel nem lehetett volna fertőzöttséget megállapítani. E határozott állítás közvetett és ellentétes oldalról jövő bizonyítását adják a mikotoxin adatok: nem volt toxin azokban a mintákban, amelyekben nem találtuk meg a megfelelő kórokozót. Az esetek többségében a diagnosztikai PCR-rel észlelt enyhe fertőzöttség sem tünetekkel, sem termés kieséssel, sem mikotoxin felhalmozódással nem járt.

Sok újdonságot hozott a felmérés a FEB fajok előfordulását és gyakoriságát illetően. Bizonyítottuk, hogy jelen van a klasszikus modell szerint lezajló, *F. graminearum* által kezdeményezett kalászfuzáriózis a hazai őszi búza állományokban (hogy ti. már GS70 körüli stádiumban észlelhető a fertőzés, majd végig húzódik, egészen a betakarításig), de ez egyáltalán nem gyakori és nem jellemző esemény. A két év alatt megvizsgált 20 búzaállomány közül csupán hatban lehetett tetten érni ezt a modellt, és csak négy helyen volt a fertőzésnek érdemi dezoxinivalenol (>100 µg kg⁻¹) szennyeződésben megnyilvánuló következménye.

A *F. poae* volt a leggyakrabban kimutatható gomba, az esetek csaknem 40 %-ában ezt a fajt találtuk meg. Vizsgálataink egyértelműen igazolták azt is, hogy másodlagos kórokozóról van, hiszen mindig az érett szemtermésben, illetve a pelyvában lehetett észlelni ezt a gombát, tejes éréskor még nem. Lebecsülni azonban nem szabad ezt a másodlagos fertőzést sem, hiszen nivalenol felhalmozódáshoz vezethet, ami három esetben igazolható volt az általunk vizsgált területeken.

Nagyon visszaesett a *F. culmorum* előfordulása, bár ahol jelen van ez a gomba, ott nagy bajt tud okozni. Lásd a 2004. évi röjtökmuzsaji méréseket! Visszaszorulását – ami egyébként szerte Európában tapasztalható – azzal magyarázzuk, hogy ez a faj nem tudta állni a versenyt a *F. graminearum*mal és a *F. poae*val. A *F. graminearum*ot a kiváló reprodukciós stratégiája (homothalliás aszkospóra képzés), a *F. poae*t pedig a száraz, meleg időjáráshoz való alkalmazkodása tette legyőzhetetlenné a fajok versengésében.

Inkább mikológiai, semmint növénykórtani érdekessége van annak, hogy igazoltuk a *M. nivale* mindkét változatának jelenlétét hazai őszi búza kalászokon. A korábbi felmérésekben valószínűleg azért nem találták meg ezeket a kórokozókat, mert izolálásukhoz alacsony, 18°C alatti inkubációs hőmérsékletre van szükség, amit a tömegminták szállítása és rutinvizsgálata során nem lehet biztosítani. Minthogy a *M. nivale* nem okoz súlyos tüneteket és mikotoxin-felhalmozódással sem jár a fertőzés, fölösleges lenne e faj hazai jelentőségét túlértékelni.

CD-n rögzítettük a meteorológiai adatokat, amelyeket igény szerint az érdeklődők rendelkezésére tudunk bocsátani. Hatalmas adathalmazról van szó, melynek beható elemzésére nincs mód ebben a jelentésben. A leglényegesebb összefüggésekre azonban rá tudunk mutatni. Klasszikus felfogás szerint kedvez a *Fusarium*-fertőzésnek, ha több napon át páradús környezet uralkodik az őszi búza állományokban virágzáskor, vagy a virágzás körüli időszakban (Parry, et al. 1995; Obst et al. 2002). A mi vizsgálataink igazolták, hogy Magyarországon ez a helyzet sehol nem fordult elő, még csapadékos években sem. A virágzás általában rövid ideig, mindössze 5-10 napig tartott, s az egyes évjáratok között csupán annyi volt a különbség, hogy aszályos években már május első felében megkezdődött a déli végeken az őszi búza virágzása,

míg hűvösebb, csapadékos években csak május végén, június elején indult el a virágzás. Gyakorlatilag mindössze két hét eltolódást lehetett tapasztalni a szélsőségesen száraz 2003. év és a kifejezetten csapadékos 2004. év virágzási periódusai között. És soha, egyetlen mintavételi helyen nem fordult elő, hogy két napnál hosszabb páradús környezetben legyenek a virágzó kalászkok! Általában azt tapasztaltuk, hogy este 8-9 óra körül volt először észlelhető páralecsapódás, de reggel 7 órára ez már mindenütt megszűnt. Ha pedig csapadék hullott, akkor 2-3 órával később már nem volt mérhető levélfelület nedvesség érték. Egyedül a nyugati országrészben, Röjtökmuzsajon és Szombathelyen rögzítettünk hosszabb páratelt időszakokat, de ezek is legfeljebb 38-42 órás szakaszok voltak. Igaz, ez mindkét helyen elégségesnek bizonyult ahhoz, hogy akár a száraz 2003. évben, akár pedig a nedves 2004. évben megjelenjen a *F. graminearum* és/vagy a *F. culmorum* fertőzés. 2004-ben ráadásul jelentős mikotoxin felhalmozódással is párosult a fertőzés, ami arra utal, hogy a kórokozók tartósan meg tudtak telepedni a kalászkokban. De újfent hangsúlyozzuk, a klasszikus FEB-fertőzés hazánkban ritka, és főként a nyugati országrészre korlátozódik.

Miként fordulhat elő mégis, hogy vannak évjáratok, amikor bizony az egyébként kiváló magyar búza is minőségi gondokkal küszködik? Eltekintve a felelőtlen nyilatkozatoktól, amelyeket gyakran szövevényes kereskedelmi érdekek mozgatnak, van egy nagy veszély: a legkiválóbb termés is tönkremehet, ha szélsőséges időjárás vagy a szegénység (kombájnok hiánya) miatt megkésik a betakarítás, és jelentős csapadék áztatja el a már beérett búzát. Felmérésünk egyik oldalága ennek az állításnak is szép bizonyítékát hozta.

Azzal a megfontolással kezdtük el vizsgálni a betakarításkor gyűjtött pelyvalevél gombafertőzöttségét, hogy magyarázatot keressünk arra, miért találnak néha (!) mikoxinokat olyan lisztmintákban, amelyekben nem fordult elő az adott toxint termelő gomba. Úgy okoskodtunk ugyanis, hogy az ilyen kivételes esetekben a pelyvalevélen másodlagos fertőzésként jelenlevő penészgomba termelheti a toxint, és ez a toxin kerül be – diffúzió útján – a szembe. Felmérésünkben az általános tendencia az volt, hogy a szemfertőzés és a pelyvalevél fertőzés összhangban van, azaz: amennyiben a szem fertőződik, akkor ez a fertőzés átterjed a pelyvalevélre is. Előfordult azonban az is – legtöbbször a *F. avenaceum* és a *F. poae* esetében – hogy csak a pelyvalevélen volt értékelhető fertőzöttség, a szemben viszont nem tudtuk észlelni a gombát. Ez tipikus másodlagos kalászfertőzésből ered, vagyis nem virágzáskor éri az inokulum a növényt (mint klasszikus esetben), hanem később.

Különleges és tanulságos helyzet alakult ki Martonvásáron 2004-ben. Gyönyörű, egészséges búzaállományt vizsgáltunk, amelyben tejes éréskor csupán a *F. graminearum* jelenlétét lehetett észlelni, még hozzá a kimutathatóság határán. A betakarításkor esedékes

mintavétel előtt két nappal azonban 60 mm-es nagy eső áztatta el a már beérett kalászkokat. Üzemi körülmények között nem is lehetett volna megkezdeni az aratást, hiszen a szemek nedvességtartalma 25 % fölött volt. A kézi mintavételt azonban elvégeztük, mégpedig úgy, hogy a kísérleti táblán 16 al-mintát vettünk: 50 × 50 cm-es négyzetben minden kalászt levágtunk, és a 16 al-mintában külön-külön elvégeztük a FEB kórokozók PCR-es azonosítását (szemtermésben és pelyvában egyaránt), és mértük (a szemekben) a négy mikotoxin (DAS, DON, NIV, ZEA) mennyiségét. Drámai helyzetet tapasztaltunk (3. táblázat). A pelyvalevél mintákból a FEB kórokozók teljes arzenálja kimutatható volt, még a ritka *Microdochium*-fertőzés is tömegessé vált, s ami még nagyobb baj volt, előretört az egyébként szintén ritkán jelentkező *F. culmorum*. Megkezdődött a szemtermés másodlagos kolonizációja is, és az al-minták több mint felében (!) mértünk mikotoxin szennyezettséget. Mindez két nappal a nagy eső után már észlelhető volt, így nem kell hozzá túl nagy képzelőerő, mivé lett ez a termés egy hét múlva, amikorra hozzá lehetett volna kezdeni az aratáshoz – üzemi körülmények között.

Kétéves felmérésünk azt mutatja, hogy hazánkban a jó agrotechnikai feltételek között termesztett őszi búza állományokban még csapadékos években (ld. 2004.) sem kell klasszikus kalászfuzáriózis járványtól tartani, s nagyon egészséges, jó minőségű búzatermést lehet betakarítani, akár rekord-hozamok mellett is. Azokon a termőhelyeken azonban, ahol tartós páradús környezet alakult ki a GS 65-70 körüli fejlődési időszakban, érdemes kalászfuzáriózis elleni védekezést folytatni. (Nem bánnánk, ha ezt a növényvédelmi döntést pontos diagnózis, azaz a kórokozók jelenlétének PCR-rel történt megerősítése alapján hoznák majd a termesztők.) A legnagyobb veszélyt és valós mikotoxin kockázatot azonban a beérett állományt érő nagy csapadék és a megkésett betakarítás jelenti.

Martonvásáron, kísérleti állományokban mintegy 20 fajtán végeztünk PCR-alapú azonosításokat azzal a céllal, hogy idejében jelezzük, ha különösen erős *Fusarium*-fogékonyság jelentkezik valamelyik köztermesztésben levő fajtán vagy fajtajelöltön. Mint 0 4. táblázatban látható, örvendetesen gyenge fertőzöttséget észleltünk, s azt is főként a teljes érésű mintákban (amikor már nincs aktív növényi védekezés). Ezekben a vizsgálatokban is a *F. graminearum* és a *F. poae* bukkant elő leggyakrabban. Az külön örvendetes, hogy őszi durum búzában egyáltalán nem tapasztaltunk *Fusarium*-fertőzöttséget, mert az ilyen anyagokat általában a fokozott FEB-fogékonyság jellemzi.

Vegetatív inkompatibilitás alprogram

A *Thermobifida* programban történt elmaradásunk (kárfelemérést és indoklást ld. ott) kiegyenlítésére fordítottunk több erőt erre a kérdésre – terven felül. A kalászfuzáriózist okozó *Fusarium*-fajok (hasonlóan egy sor más fonalas gombához) alapvetően kétféle szaporodási módot követnek: egyesek rendszeresen beiktatják életciklusukba az ivaros szaporodást (s ezáltal folyamatosan gazdagítják populációjukat új patogén változatokkal), mások viszont klónos szaporodásra törekszenek (s ily módon megóvják a populációt attól, hogy az értékes patogenitás-tulajdonságok kihíguljanak). Ez a kétféle stratégia egyazon fajban is megfigyelhető, a térben és időben elkülönülő populációk más-más utat választanak.

A klónosan szaporodó populációkban is vannak működőképes párosodási típus gének (az ivaros reprodukció genetikai háttere tehát biztosított), mégsem kerül sor ivaros szaporodásra, mert azt megakadályozza a női sterilitás. A női sterilitás okait nem ismerjük. Ezekben a populációkban gyakori továbbá a vegetatív inkompatibilitás, ami lehetetlenné teszi a szomatikus sejtek közötti egyesülést, s így a heterokarion állapot és a paraszexuális rekombináció kialakulását (amivel szintén gyakran élnek a fonalas aszkomiceták). Eddig nem volt arra adat, hogy kapcsolat lehetne az ivaros rekombináció zavarai és a vegetatív inkompatibilitás között, mi azonban egy érdekes jelenségre bukkantunk, amelynek beható vizsgálata ígéretesnek látszott.

A vegetatív inkompatibilitást *vic (het)* gének irányítják. Egy-egy fajban 8-10 ilyen gén van, általában 2-4 alléllal. Csak azok az egyedek képesek szomatikus sejtfúzióra (azok kompatibilisek), amelyekben minden allél pontosan egyforma. Egyetlen allél-különbség gyors sejthalállal járó inkompatibilitást eredményez.

Az egyik legjobban tanulmányozott, vegetatív inkompatibilitásért felelős gén a *Neurospora crassa het-C* génje. Ennek a génnek három allélját (*het-C^{OR}*, *het-C^{GR}*, és *het-C^{PA}*) azonosították (Saupe és Glass, 1997). A három allél tartalmaz egy olyan, hipervariabilis polimorf régiót, amely az allél-specifitásért felel, nemcsak a *Neurospora*-ban, hanem más, közel-rokon Sordariaceae-fajokban is (Wu et al., 1998). E gén *Podospora anserin*-ban előforduló homológja, a *hch* azonban nem játszik szerepet a vegetatív inkompatibilitásban (Saupe et al. 2000), s ebben a változatban nincs is jelen az említett hipervariabilis régió.

Mi a *Fusarium proliferatum* ITEM 2287 sz. törzséből klónoztuk a *hch* gént, és *Gibberella fujikuroi* gyűjtőfaj nyolc biológiai fajának félszáz törzsében vizsgáltuk meg e gén polimorfizmusát. A gént teljesen egyöntetűnek találtuk, mindössze két *Fusarium subglutinans* és négy *Fusarium proliferatum* izolátumban találtunk kisebb, egy-egy aminosavra

korlátozódott szubsztitúciókat. Előállítottuk a *hch* egy mesterséges allélját, amely a *Neurospora*-ban talált, s ott inkompatibilitás okozó változat jellemző motívumait tartalmazta. Ezzel az alléllal transzformáltuk a *F. proliferatum* ITEM 2287 sz. törzsét, hogy lássuk, okozhatna-e vegetatív inkompatibilitást egy ilyen allél a *G. fujikuroi*-ban, ha egyáltalán felbukkanna valahol a természetben. Úgy okoskodtunk, hogy a transzformációs gyakoriságot szignifikánsan csökkentené az ilyen allél bevitele, hiszen az inkompatibilitás következménye a gyors sejthalál. Minthogy semmiféle csökkenést nem tapasztaltunk, igazoltnak látszik: a *hch* gén a *Fusariumok*-ban nem játszik szerepet a vegetatív inkompatibilitásban.

A *hchr*-ról azt is megállapítottuk, hogy egy kópiában van jelen a genomban és konstitutívan íródik át. Elképzeltetlenségünk tartottuk, hogy ilyen egykópiás, konstitutív és nagyon konzervatív génnek semmiféle biológiai szerepe ne legyen. Irányított gén-diszrupcióval inaktívtá tettük tehát a *hcht* a *F. proliferatum* ITEM 2287 törzsében. A Δhch mutánsok semmiféle morfológiai eltérést nem mutattak, teljesen normálisan fejlődtek, jól sporuláltak, és nem oldódott fel bennük a vegetatív ön-inkompatibilitás. Ugyanakkor, nő-sterillé váltak, ami arra utal, hogy ennek a génnek nem az aszexuális, hanem a szexuális felismerésben van szerepe.

***Thermobifida* alprogram**

A termofil, aerob cellulózbontó mikroorganizmusok modellszervezeteként nyilvántartott *Thermobifida fusca*-nak összetett cellulolitikus enzimrendszere van. Megtörtént az enzimrendszer több tagjának, köztük három endoglukanáznak, két exoglukanáznak, egy processzív endoglukanáznak és egy cellobiáznak a részletes leírása, és a megfelelő géneket is izolálták. E fontos aktinomicéta lignocellulóz bontó enzimrendszerének teljes feldolgozására irányuló SDS-PAGE vizsgálatok azonban további enzimkomponensek létére is rámutattak. A *T. fusca* TM51 törzsének *Streptomyces lividans*-ban (TK24) készített expressziós génkönyvtárát átvizsgálva találtunk egy olyan endoglukanáz-pozitív klónt, amelynek nukleotid sorrendje különbözött a *T. fusca* eddig ismert endoglukanázainak nukleotid sorrendjétől, így ezt a klónt beható vizsgálatnak vetettük alá. *Escherichia coli*-ban történt szubklónozást követően azonosítottunk egy 1859 bp nyitott leolvasási keretet (ORF); génbanki adatokkal történt összehasonlítás szerint ez az ORF szignifikáns hasonlóságot mutatott a *cenD*-vel, a *Cellulomonas fimi* egyik endoglukanáz génjével. Az új gént *Cel5b*-nek neveztük el. A származtatott aminosav szekvencia elemzése alapján kiderült, hogy a *T. fusca* új endoglukanázának N-terminális katalitikus doménje 341, C-terminális cellulózkötő doménje pedig 80 aminosavból áll. A katalitikus domén aminosav sorrendje alapján a Cel5B

enzim a β -1,4-glukanázok GH5-ös családjának "A" altípusába tartozik. A *Streptomyces lividans*ban termeltetett E7 enzim hőmérséklet-optimuma 77 °C, pH-optimuma 8,2 volt. Az új enzim leírásával és besorolásával csaknem teljessé vált a *T. fusca* celluláz enzimrendszerének a feltérképezése. Eszerint a fontos modellszerkezet cellulázai a glikozil hidrolázok négy különböző családjába sorolhatók, mégpedig a GH5, a GH6, a GH9 és a GH48 családokba. Minden egyes családban két-két *T. fusca* eredetű hidroláz található, az ugyanabba a családba tartozó két enzimben a katalitikus és a szubsztrátumkötő domén elhelyezkedése ellentétes. A cellulázok e gazdag, változatos és egymást kiegészítő rendszere teszi tehát ilyen nagyhatású cellulózbontó szervezetté a *T. fusca*-t.

Az *Actinomycetaceae* családba tartozó, s 16S rDNS szekvencia analízis alapján nemrégiben létrehozott *Thermobifida*-nemzetséget három faj alkotja: a *T. alba*, a *T. cellulolytica* és a *T. fusca*. A csoport ipari szempontból is figyelmet érdemlő tagjainak legfontosabb közös tulajdonsága a kiváló lignocellulózbontó képesség. Mivel a közelrokon monospóras sugárgombák pontos azonosítása csak időigényes és költséges kemo- és molekuláris taxonómiai vizsgálatokkal végezhető el, célul tűztük ki egy egyszerű, gyors és megbízható módszer kifejlesztését a *Thermobifida* faj szerinti azonosítására. Erre a célra a nemzetség minden tagjára jellemző összetett celluláz-hemicelluláz rendszer zimográfiás elemzése tűnt a legalkalmasabbnak. Vizsgálatainkban a három ismert *Thermobifida*-faj 11 törzsének endoglukanáz, exoglukanáz, cellobiáz, endoxilanáz, β -xilozidáz, endomannanáz és β -mannozidáz zimogramjait hasonlítottuk össze. A nehezen kiértékelhető cellobiáz, β -xilozidáz és β -mannozidáz izoenzim mintázatok alkalmatlannak bizonyultak fajsztípus azonosításra, ami az intracelluláris enzimek gyenge renaturációjával és génjeik egykópiás reprezentáltságával magyarázható. A hőstabil, többkomponensű extracelluláris endoglukanázok, endoxilanázok és endomannanázok viszont használhatók voltak ilyen célokra, mivel az egyes fajok között jelentős és következetes eltéréseket tudtunk velük kimutatni. Az endoglukanáz-, endoxilanáz- és endomannanáz izoenzim mintázat alapján a vizsgált 11 törzset három csoportba tudtuk sorolni. Az így kialakított csoportok megfeleltek a Zhang és munkatársai által bevezetett és jelenleg elfogadott *Thermobifida*-fajoknak. Munkánk során csupán egyetlen eltérést tapasztaltunk: a Spanyol Nemzeti Törzsgyűjteményből származó *T. alba* CECT 3323 törzs zimogramjai minden esetben a *T. fusca* törzsekkel mutattak teljes azonosságot. A CECT 3323 törzs 16S rDNS szekvencia analízise is megerősítette e törzs *T. fusca* fajba történő átsorolásának szükségességét.

Az expressziós könyvtár hidrolázokra történő szűrésese során egy β -xilozidáz klónt is izoláltunk, s egy olyan fúziós fehérje konstrukciót alakítottunk ki, amelynek segítségével tiszta xilozidáz enzimet nyertünk. SDS-PAGE vizsgálattal igazoltuk, hogy az aktív enzim 130 kDa nagyságú dimer fehérje. Biokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az enzim széles pH-tartományban aktív (pH 4 és 7 között nem változott az aktivitása), hőmérséklet-optimuma 50°C, de 70°C-on még aktivitásának felét megőrzi. A β -xilozidáz intercelluláris enzim, ami a termofil aktinomiceták óvatos tápanyag-hasznosítását mutatja: ezek a mikrobák ugyanis nem használnak monoszaharid végterméket produkáló extracitoplazmás enzimeket, mert a könnyen hasznosítható glükózt vagy xilózt a bomló lignocellulóz szubsztrátumban élő konkurens szervezetek elorozhatnák.

Amikor érett komposztból új cellulózbontó mikrobákat izoláltunk, találtunk egy olyan törzset, amelynek 16S rRNS gén szekvenciája arra utalt, hogy ez a mikroba a *Proteobacteria*-nemzetségbe tartozik. A 1469 bp hosszú rRNS szekvencia 91, 90, 90, 89 és 89%-os hasonlóságot mutatott a *Pseudomonas cellulosa*, a *Teredinibacter turnerae*, a *Cellvibrio mixtus*, a *Pseudomonas aeruginosa* és a *Pelagiobacter variabilis* megfelelő génjéhez. A K07 elnevezésű törzs képes volt kristályos cellulóz szénforráson szaporodni és termőtestet is fejlesztett. A mikroba Gram-negatív, aerob, oxidáz- és kataláz-pozitív, peritrich flagellummal mozgó pálca, növekedésének hőmérséklettartománya 22-44°C, optimuma 40°C. Cellobiáz aktivitása fellmúlja a *Thermobifidákét*. Eddig ismeretlen baktériumfajt találtunk, amely nemzetségszinten is új szervezetnek számít.

Az utolsó három bekezdésben összefoglalt eredmények egyelőre csak konferencia-előadások és diplomamunkák formájában kerültek közlésre. Ennek az az oka, hogy dr. Kukolya József egyetemi adjunktusnak 2004. december 31-ével távoznia kellett a tanszékről, a munkák rangos publikációval való lezárása így még várat magára.

Irodalom

Obst A, Günther B, Beck R, Lepschy J, Tischner H (2002): Weather conditions conducive to *Gibberella zeae* and *Fusarium graminearum* head blight of wheat. *J Appl Genet* **43A**, 185-192

Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathol* **44**, 207-238

Saupe SJ, Glass NL (1997): Allelic specificity at the *het-c* heterokaryon incompatibility locus of *Neurospora crassa* is determined by a highly variable domain. *Genetics* **146**, 1299-1309

Saupe SJ, Clavé C, Sabourin M, Bégueret, J. (2000): Characterisation of *hch*, the *Podospora anserina* homolog of the *het-c* heterokaryon incompatibility gene of *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **38**, 39-47

Wu J, Saupe SJ, Glass NL (1998): Evidence for balancing selection operating at the *het-c* heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 12398-12403

1. táblázat. *Fusarium* fajok diagnosztikai PCR-rel észlelt jelenléte és a mikotoxin szennyeződés mértéke őszi búza mintákban, 2003-ban

Helyszín	<i>F. avenaceum</i>				<i>F. culmorum</i>				<i>F. graminearum</i>				<i>F. poae</i>				<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>				<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>				DAS	DON	NIV	ZEA
	V	T	S	P	V	T	S	P	V	T	S	P	V	T	S	P	V	T	S	P	V	T	S	P	μg kg ⁻¹	μg kg ⁻¹	μg kg ⁻¹	μg kg ⁻¹
01 Abaújszántó	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02 Szeged	-	+	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
03 Debrecen	-	∅	∅	+	-	∅	∅	∅	-	+	+	+	-	∅	∅	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
04 Enying	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	+	+	+	-	+	+	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
05 Eszeterág	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06 Gödöllő	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	+	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
07 Gyulatanya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08 Jászboldogháza	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	+	+	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
09 Kaposvár	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 Kecskemét	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
11 Kompolt	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
12 Röjtökmuzsaj	-	∅	∅	+	-	∅	∅	∅	-	+	+	∅	-	∅	∅	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
13 Székkutas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 Szombathely	-	∅	∅	∅	-	∅	+	+	-	+	+	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0
15 Martonvásár	-	∅	∅	∅	-	∅	+	∅	-	+	+	∅	-	+	+	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	0	0	0

-,	nem történt mintavétel, illetve mérés	DAS, diacetoxiszcirpenol	V,	virágzaskor vett minta
∅,	nem volt PCR termék	DON, dezoxinivalenol	T,	tejes éréskor vett minta
+,	PCR termék jelen volt	NIV, nivalenol	S,	szemtermés (betakarításkor vett minta)
0,	nem volt mérhető mennyiség	ZEA, zearalenon	P,	pelyvalevél (betakarításkor vett minta)

2. táblázat. *Fusarium* fajok diagnosztikai PCR-rel észlelt jelenléte és a mikotoxin szennyeződés mértéke őszi búza mintákban, 2004-ben

Helyszín	<i>F. avenaceum</i>				<i>F. culmorum</i>				<i>F. graminearum</i>				<i>F. poae</i>				<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>				<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>				DAS μg kg ⁻¹	DON μg kg ⁻¹	NIV μg kg ⁻¹	ZEA μg kg ⁻¹
	V	T	S	P	V	T	S	P	V	T	S	P	V	T	S	P	V	T	S	P	V	T	S	P				
01 Abaujszántó	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02 Szeged	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	+	+	+	-	+	+	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	0	24	0	0
03 Debrecen	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	+	+	+	-	+	+	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	+	0	0	0	0
04 Enying	-	∅	∅	+	-	∅	∅	∅	-	+	+	+	-	+	+	+	-	∅	+	+	-	∅	+	+	0	181	0	5.2
05 Eszeterág	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06 Gödöllő	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	+	+	+	-	+	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	0	0	0	0
07 Gyulatanya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08 Jászboldogháza	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	+	+	-	∅	∅	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	+	0	0	0	0
09 Kaposvár	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 Kecskemét	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	0	0	0	0
11 Kompolt	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	∅	-	+	∅	∅	-	∅	∅	+	-	∅	∅	∅	-	∅	∅	+	0	0	105	0
12 Röjtökmuzsaj	-	+	+	+	-	∅	+	∅	-	∅	∅	∅	-	+	∅	+	-	∅	+	+	-	∅	+	+	0	847	67	0
13 Székkutas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 Szombathely	-	∅	+	+	-	∅	∅	∅	-	+	+	+	-	+	∅	+	-	∅	+	+	-	∅	+	+	0	355	0	0
15 Martonvásár	-	∅	+	+	-	∅	∅	+	-	+	+	+	-	∅	∅	+	-	∅	∅	+	-	∅	+	+	0	257	42	0

- , nem történt mintavétel, illetve mérés
∅, nem volt PCR termék
+, PCR termék jelen volt
0, nem volt mérhető mennyiség

DAS, diacetoxiszcirpenol
DON, deoxinivalenol
NIV, nivalenol
ZEA, zearalenon

V, virágzaskor vett minta
T, tejes éréskor vett minta
S, szemtermés (betakarításkor vett minta)
P, pelyvalevél (betakarításkor vett minta)

3. táblázat. Megkésett betakarításból származó anyagok *Fusarium*-fertőzöttsége és mikotoxin-szennyezettsége – Martonvásár, 2004.

Sorszám (al-minta)	<i>F. avenaceum</i>		<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. poae</i>		<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>		<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>		DAS	DON	NIV	ZEA
	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	µg kg ⁻¹	µg kg ⁻¹	µg kg ⁻¹	µg kg ⁻¹
1	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	0	0	0	0
2	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	0	0	27	0
3	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	+	∅	∅	∅	+	0	47	0	0
4	∅	+	∅	+	∅	∅	∅	+	∅	+	∅	+	0	0	0	0
5	∅	+	∅	+	+	+	∅	∅	∅	∅	∅	+	0	183	0	0
6	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	0	0	34.1	0
7	∅	+	∅	+	∅	+	∅	+	∅	∅	∅	+	0	22.6	0	0
8	∅	∅	∅	+	+	+	∅	+	∅	∅	∅	+	0	119	0	0
9	∅	∅	∅	+	+	+	∅	+	∅	∅	∅	+	0	257	42.3	5.2
10	∅	+	∅	∅	∅	+	∅	+	∅	+	∅	+	0	0	0	0
11	∅	∅	∅	+	+	+	∅	∅	∅	∅	∅	+	0	76.4	0	0
12	∅	+	∅	∅	∅	+	∅	+	∅	∅	+	+	0	0	0	0
13	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	+	0	0	0	0
14	∅	+	∅	+	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	+	0	0	0	0
15	∅	+	∅	∅	∅	+	∅	+	∅	∅	+	+	0	17	0	0
16	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	0	0	0	0

S – szemtermés; P – pelyva; + – PCR termék jelen; ∅ – nem volt PCR termék; 0 – nem volt mérhető mikotoxin szennyeződés.

4. táblázat. Különböző búzafajták és egyéb kalászosok Fusarium-fertőzött: Martonvásár, 2004. (első érték) és 2005. (második)

Fajta	Faj	Virágzás		Tejes érésű		Szem		Pelyva	
		Sorszám	Megnevezés	Sorszám	Megnevezés	Sorszám	Megnevezés	Sorszám	Megnevezés
MV Hombár	Őszi búza	1	0, 0	21	0, 0	41	0, GRA	61	0, 0
MV Csárdás	Őszi búza	2	0, 0	22	0, 0	42	0, 0	62	0, GRA
MV Emese	Őszi búza	3	0, 0	23	AVE, 0	43	AVE, 0	63	0, 0
MV Suba	Őszi búza	4	0, 0	24	0, 0	44	AVE, 0	64	0, 0
MV Pálma	Őszi búza	5	0, 0	25	0, 0	45	POA, 0	65	0, 0
MV Ködmön	Őszi búza	6	0, 0	26	0, 0	46	AVE, 0	66	0, 0
MV Walzer	Őszi búza	7	0, 0	27	0, 0	47	0, GRA	67	0, 0
MV Süveges	Őszi búza	8	0, 0	28	0, 0	48	GRA, 0	68	0, 0
MV Palotás	Őszi búza		0, 0	29	0, 0	49	0, 0	69	0, 0
Oberkulmer-Rotkorn	Tönköly búza	10	0, 0	30	0, 0	50	0, 0	70	0, 0
Komes	zab	11	AVE, 0	31	POA, 0	51	0, 0	71	0, 0
MV Mambo	Őszi búza	12	0, 0	32	0, 0	52	AVE, 0	72	0, 0
Gerald	zab	13	0, 0	33	0, 0	53	POA, 0	73	0, 0
MV Makaroni	Őszi durum búza	14	0, 0	34	0, 0	54	0, 0	74	0, 0
Amilo	rozs	15	0, 0	35	0, 0	55	0, 0	75	0, 0
Kitaro	tritikálé	16	AVE, 0	36	GRA, 0	56	AVE, 0	76	0, 0
MV Béres	Őszi búza	17	0, 0	37	0, 0	57	POA, 0	77	0, 0
MV Magdaléna	Őszi búza	18	0, 0	38	0, 0	58	AVE, GRA	78	0, 0
MV Toborzó	Őszi búza	19	0, 0	39	0, GRA	59	0, GRA	79	0, 0
MV Verbunkos	Őszi búza	20	0, 0	40	0, 0	60	0, 0	80	0

POA = F. poae; **AVE** = F. avenaceum; **CUL** = F. culmorum; **MAJ** = M. nivale var. majus ; **NIV** = M. nivale var. nivale ;

Gram = F. graminearum; **0** = nincs fertőzöttség