

A K73565. számú OTKA-projekt ZÁRÓJELENTÉSE

Projekt címe: Gazdaságilag jelentős liztharmatgombafajok eredete, életciklusa és egyéb vonatkozásai

Projekt időtartama: 2008. április 1. - 2013. március 31. (4 + 1* év)

OTKA támogatás: összesen 31,62 MFt

A projekthez kapcsolódó nemzetközi kiegészítő támogatás adatai:**

Nemzetközi projekt címe: Liztharmatgombák kristályai

Nemzetközi projekt száma: IN 79875

OTKA támogatás:** 3620 eFt

Résztevő külföldi kutatók:

Professor Peter Jeffries

University of Kent, Dept. Biosciences, Canterbury, Kent

Anglia / Egyesült Királyság

Ao. Univ. Prof. Ursula Lütz-Meindl

Plant Physiology Division

University of Salzburg, Dept. Cell Biology, Salzburg

Ausztria

* A projekt futamidejét egy évvel meghosszabbítottuk

** A külön megpályázott IN-projekt költségvetése beolvadt a végleges költségvetésbe

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS

- 1.1. A projekt eredeti célkitűzései 3
- 1.2. Az OTKA-projekt megvalósításához kapcsolódó egyéb anyagi források 4
- 1.3. A projekthez kapcsolódó, nemzetközi konferencián kifejtett tevékenység 4
- 1.4. Ismeretterjesztés és a hazai szakmai közvélemény tájékoztatása a projekt eredményeiről 4

2. FONTOSABB, MÁR PUBLIKÁLT EREDMÉNYEK

- 2.1. Paradicsomlisztharmattal szembeni növényi rezisztencia jellemzése 5
- 2.2. A paprikalisztharmat-fertőzés folyamatának vizsgálata 5
- 2.3. Az "őszibarack rozsdás foltossága" ("peach rusty spot") betegség etiológiájának tisztázása és az ellene alkalmazható növényvédelmi kezelés időzítése 6
- 2.4. Új sporulációs mechanizmus kimutatása lisztharmatgombákban 7
- 2.5. Paralóg rDNS ITS szekvenciák első kimutatása lisztharmatgombákban 7
- 2.6. Újonnan felbukkant lisztharmatgombák azonosítása 7

3. FONTOSABB, RÖVIDESEN PUBLIKÁLÁSRA KERÜLŐ EREDMÉNYEK

- 3.1. A strobilurin-típusú fungicidekkel szembeni rezisztencia kimutatása lisztharmatgombákban 9
- 3.2. A paprikalisztharmatot okozó *Leveillula taurica* genomjának megszekvenálása 9
- 3.3. Fibrozintestek kémiai összetételének meghatározása és az eredmények gyakorlati hasznosítása 10
- 3.4. Az almalisztharmat életciklusa 11

4. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI 12

1. BEVEZETÉS

1.1. A projekt eredeti célkitűzései

A 2008. április 1-én kezdődött projekt eredeti célkitűzései a következők voltak:

1. genom-szintű vizsgálatok (pl. AFLP analízis) és nrDNA ITS szekvenciaelemzések a paradicsomot fertőző *Oidium neolycopersici* és filogenetikailag közeli rokon taxonok esetében, amelyek egyrészt adatokat szolgáltatnának lisztharmat-rezisztens paradicsomfajták nemesítéséhez, másrészt feltárnák a nemrég fellángolt paradicsomlisztharmat-járványok eredetét
2. az almalisztharmat életciklusának az eddigi ismeretknél jóval alaposabban történő feltárása
3. a strobilurin-rezisztencia molekuláris szintű kimutatása a hazai szőlő-, alma- és egyéb lisztharmat-populációkban, annak érdekében, hogy feltárjuk a fungicid-rezisztencia hátterét
4. egyes lisztharmatfajok konídiumaiban előforduló kristályos zárványok, az ún. fibrozin-testek kémiai összetételének meghatározása, amely elvezethet a lisztharmatok elleni új védekezési eljárások kidolgozásához

A 4. pontban említett célkitűzés megvalósítása érdekében 2009-ben külön benyújtásra került egy ún. nemzetközi kiegészítő (IN-típusú) OTKA-pályázat. Az IN 79875. azonosító számmal rendelkező pályázatot az OTKA támogatta, az összesen 3,62 MFt támogatás beolvadt a K73565. projekt költségvetésébe.

Az eredeti pályázat 2007-ben történt benyújtása és a projekt kezdete közötti időszakban más kutatási források lehetővé tették azt, hogy az 1. pontban említett célkitűzés részben megvalósulhasson. Az eredményeket 2008-ban, röviddel a K73565. projekt megkezdését követően közöltük*, azonban a cikkben az OTKA-támogatást nem tüntettük fel, mivel a projekt nem járult hozzá a kutatómunkához. Ugyanakkor a paradicsomlisztharmat-kutatásokat tovább folytattuk az 1. célkitűzés szellemében, és ezek a munkák egy további publikációt is eredményeztek 2012-ben.

* Jankovics, T., Bai, Y., Kovács, G. M., Bardin, M., Nicot, P. C., Toyoda, H., Matsuda, Y., Niks, R. E., and Kiss, L. (2008) *Oidium neolycopersici*: Intraspecific variability inferred from amplified fragment length polymorphism analysis and relationship with closely related powdery mildew fungi infecting various plant species. *Phytopathology* 98: 529-540. [IF: 2,192](#)

1.2. Az OTKA-projekt megvalósításához kapcsolódó egyéb anyagi források

A jelen OTKA-projekt 2008-ban történt megkezdését követően, 2009. január 1-én elindult egy NKTH ill. jelenleg az NFÜ által támogatott, "Lisztharmat elleni növényvédelmi technológiák és monitoring szolgáltatás fejlesztése gazdaságilag jelentős növénykultúrákban" című, LHNV2008 TECH_08-A3/2-2008-0375 azonosítójú projekt, amely a lisztharmatgombák fungicid-rezisztenciájára összpontosított, és amelyben az OTKA-projekt témavezetője tudományos vezetőként vett részt. A két projekt forrásai egymást kiegészítve hozzájárultak több kutatómunka elvégzéséhez és az eredmények publikálásához. Az adott publikációkban mindkét projekt támogatását feltüntettük.

1.3. A projekthez kapcsolódó, nemzetközi konferencián kifejtett tevékenység

A témavezető 2010-ben egy német és egy japán kollégával közösen megszervezett egy ún. "Special Interest Group (SIG) Meeting" szatellit-rendezvényt a Skóciában megtartott 9. Nemzetközi Mikológiai Kongresszus (IMC9) keretében:

http://www.imc9.info/prog_sig7.htm

Ezen a rendezvényen az OTKA-projekt több eredménye is elhangzott két előadás formájában (lásd Közleményjegyzék).

1.4. Ismeretterjesztés és a hazai szakmai közvélemény tájékoztatása a projekt eredményeiről

2009-ben a *Természet Világa* folyóirat OTKA által támogatott számaiban számos OTKA-projekt került bemutatásra. Ezek egyikében felkérés alapján ismertettük a jelenleg folyó projektet, valamint korábbi, OTKA-támogatásban részesült lisztharmat-kutatásainkat*.

A hazai szakmai közvéleményt több hazai rendezvényen megtartott előadás keretében tájékoztattuk a projekt eredményeiről (lásd Közleményjegyzék). Az egyik gyakorlati szempontból is igen jelentős eredménnyel kapcsolatban egy részletes szacikket jelentettünk meg a *Növényvédelem* folyóiratban**.

* Kiss L. (2009) Újonnan felbukkant lisztharmatgombák. Terjedő növénykórokozók. *Természet Világa* 140: 532-535.

** Kiss L. és mtsai (2012) A strobilurin-rezisztencia molekuláris markere széles körben elterjedt a hazai szőlő-, alma- és paprikalisztharmat-populációkban. *Növényvédelem* 48: 489-499.

2. FONTOSABB, MÁR PUBLIKÁLT EREDMÉNYEK

2.1. *Paradicsomlisztharmattal szembeni növényi rezisztencia jellemzése*

A paradicsomot fertőző, a jelen projekt témavezetője által korábban leírt (Kiss *et al.*, Mycological Research 105: 684-697, 2001) *Oidium neolycopersici* lisztharmatgombafaj korábban nem okozott gazdasági károkat a paradicsomtermesztésben, azonban az elmúlt kb. két évtizedben jelentős növénykórokozóvá vált, elsősorban hajtásban. A legtöbb köztermesztésben levő paradicsomfajta fogékony a betegséggel szemben, ugyanakkor a vad *Solanum*-fajokból több rezisztenciagént is izoláltak, melyek felhasználásával közel-izogén vonalakat (Near Isogenic Lines, NILs) állítottak elő a Wageningen-i Egyetemen. Laboratóriumunkban több NIL-el végeztünk kísérleteket, melyeket az általunk fenntartott On-Hu paradicsomlisztharmat-izolátummal fertőztünk. Megállapítottuk, hogy az Ol-1, Ol-3, Ol-4, Ol-5 és Ol-6 domináns rezisztenciagéneket tartalmazó NIL-ekben a betegségellenállóság egyfajta hiperszenzitív reakcióval függ össze, míg a recesszív ol-2 gént tartalmazó NIL-ben a rezisztencia a papillaképződéshez köthető. A munkában résztvevő többi laboratóriumban más *O. neolycopersici* izolátumokkal végezték el ugyanezeket ill. más vizsgálatokat. Az eredményeket, melyek lisztharmat-rezisztens paradicsomfajták előállítására szempontjából is fontosak, 2012-ben közzöltük*.

2.2. *A paprikalisztharmat-fertőzés folyamatának vizsgálata*

A legtöbb lisztharmatgombafajjal ellentétben a paprikát és számos más gazdanövényfajt fertőző *Leveillula taurica* micéliuma részben a levelek belsejében fejlődik és konídiumtartóinak nagy része a sztómákon át tör a felszínre. A fertőzési folyamat egyes részletei kevésbé ismertek, ezért fény- és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokkal nyomon követtük ennek részleteit (a TEM-vizsgálatokat Dr. Bóka Károly végezte az ELTE Növényiszervezetani Tanszékén). Emellett valós-idejű PCR-módszerrel, a Wageningeni Egyetemen együttműködve meghatároztuk a lisztharmat-micélium mennyiségét a levelekben. Az ultrastrukturális

* Li C, Faino L, Dong L, Fan J, Kiss L, De Giovanni C, Lebeda A, Scotts J, Matsuda Y, Toyoda H, Lindhout P, Visser RGF, Bonnema G, Bai Y (2012) Characterization of polygenic resistance to powdery mildew in tomato at cytological, biochemical and gene expression level. *Molecular Plant Pathology* 13: 148–159. [IF: 3,899](#)

adatokat és a micélium-mennyiség lisztharmat-DNS tartalom alapján meghatározott értékeit összevetettük a tünetek kialakulásával. Ily módon első alkalommal sikerült pontosan jellemezni a fertőzési folyamatot egy fogékony paprikafajtában (Cibere F1-ben). Az eredményeket egy közlésre már elfogadott cikk tartalmazza*.

2.3. Az "őszibarack rozsdás foltossága" ("peach rusty spot") betegség etiológiájának tisztázása és az ellene alkalmazható növényvédelmi kezelés időzítése

A "peach rusty spot" betegséget az őszibarack-gyümölcsökön megjelenő, sokszor nagy kiterjedésű parás foltok jellemzik. Először az USA-ban, 1941-ben írták le, Európában egészen a közelmúltig nem okozott gazdasági károkat, ezért nem nagyon foglalkoztak ezzel a betegséggel. Kóroktana (etiológiája) tisztázatlan volt, bár szakirodalmi források feltételezték, hogy az almalisztharmat (*Podosphaera leucotricha*) fertőzheti a fiatal őszibarack-terméseket, és ez okozza a betegséget. Kiterjedt, üvegházban izolált körülmények között, valamint őszibarack-ültetvényekben végzett keresztfertőzési kísérletekkel, valamint a tüneteket mutató őszibarack-termésekről származó micélium DNS-elemzésével egyértelműen igazoltuk, hogy valóban az almalisztharmat okozza a tüneteket, miközben az őszibarack leveleit, zöld hajtásait és terméseit egyaránt fertőző őszibarack-lisztharmat (*Podosphaera pannosa*) is jelen van az ültetvényekben. Megállapítottuk, hogy a két kórokozó által okozott tünetek jól elkülöníthetők egymástól. A munkában saját laboratóriumunk mellett egy szerb és egy francia laboratórium is részt vett. A fertőzési kísérletek során meghatároztuk azt az időpontot, amikor egyszeri fungicides kezeléssel hatékonyan lehet védekezni a tünetek kialakulása ellen. Ily módon kidolgoztuk a betegség elleni célzott védekezés alapjait, amelyet szabadföldi kísérletek is alátámasztottak. Az eredményeket publikáltuk**.

* Zheng, Z., Nonomura, T., Bóka, K., Matsuda, Y., Visser, R., Toyoda, H., Kiss, L., Bai, Y. (2013) Detection and quantification of *Leveillula taurica* growth in pepper leaves. *Phytopathology* 103 (in press) [IF: 2,799](#)

** Jankovics T., Dolovac N., Bulajić A., Krstić B., Pascal T., Bardin M., Nicot P. C. and Kiss L. (2011) Peach rusty spot is caused by the apple powdery mildew fungus, *Podosphaera leucotricha*. *Plant Disease* 95: 719-724. [IF: 2,449](#)

2.4. Új sporulációs mechanizmus kimutatása lisztharmatgombákban

A projekt megkezdése előtt közöltük egy lisztharmatgombákban addig ismeretlen új sporulációs mechanizmus, az ún. mikrociklikus konidiogenezis kimutatását a padlizsánt, petúniát, dohányt és más gazdanövényfajokat fertőző *Oidium longipes* esetében (Kiss *et al.*, Plant Disease 92: 818-825., 2008). A folyamatot a jelen OTKA-projekt keretében további nyolc lisztharmatgombafajban igazoltuk. Az eredményeket 2010-ben közöltük*. Ezt követően pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM-el) is sikerült dokumentálni a jelenséget szőlőlisztharmatot okozó *Erysiphe necator* konídiumai esetében, és a vizsgálatok során további három lisztharmatgombafajnál dokumentáltuk a mikrociklikus konidiogenezis folyamatát. Ezeket az eredményeket a *Mycoscience* folyóiratban közöltük**, amely az egyik SEM-képet címlapfotóként is megjelentette.

2.5. Paralóg rDNS ITS szekvenciák első kimutatása lisztharmatgombákban

A riboszomális DNS (rDNS) ún. ITS (Internal Transcribed Spacer) szekvenciáit számos más növénykórokozó és egyéb gombafajhoz hasonlóan a lisztharmatgombák esetében is DNS-vonalkódként használják a különböző fajok azonosításában. Első ízben mutattuk ki, hogy egyetlen lisztharmat-mintában is előfordulnak eltérő, paralóg rDNS ITS szekvenciák, amelyek megnehezíthetik, sőt meg is akadályozhatják a közeli rokon, nagyon hasonló ITS-szekvenciákkal rendelkező fajok molekuláris szintű elkülönítését. Az eredményeket 2010-ben közöltük***.

2.6. Újonnan felbukkant lisztharmatgombák azonosítása

A projekt keretében az alábbi három, idehaza ill. más régiókban újonnan felbukkant lisztharmatgombát azonosítottuk klasszikus és molekuláris módszerekkel:

- citromfűvet fertőző *Golovinomyces biocellatus* (első hazai adat)
- petúniát fertőző *Oidium longipes* (első angliai adat)

* Levente Kiss, Alexandra Pintye, Györgyi Zséli, Tünde Jankovics, Orsolya Szentiványi, Yaser M. Hafez and Roger T. A. Cook (2010) Microcyclic conidiogenesis in powdery mildews and its association with intracellular parasitism by *Ampelomyces*. *European Journal of Plant Pathology* 126: 445–451. [IF: 1,575](#)

** Pintye A, Legler SE, Kiss L (2011) New records of microcyclic conidiogenesis in some powdery mildew fungi. *Mycoscience* 52: 213–216. [IF: 1,212](#)

*** Gábor M. Kovács, Tünde Jankovics and Levente Kiss (2011) Variation in the nrDNA ITS sequences of some powdery mildew species: do routine molecular identification procedures hide valuable information? *European Journal of Plant Pathology* 131: 135-141. [IF: 1,413](#)

- ördög szem (*Scabiosa columbaria*) leveleit fertőző *Oidium* sp. (első adat az USA New York államából)

Az ilyen jellegű, pl. a növényi karantén-szolgálatok számára fontos eredményeket több nemzetközi növénykórtani folyóirat is közli. Eredményeinket a *Plant Disease* folyóirat ún. "Disease Notes" rovatában közzé tettük*, amely projekt-támogatás feltüntetését nem engedi meg. Mivel kérdéses, hogy az ilyen jellegű publikációknál (amelyek belekerülnek pl. a Web of Science adatbázisába) alkalmazható-e a folyóirat IF-értéke, a Közleményjegyzékben (a félreértések elkerülése végett) nem tüntettük fel a folyóirat IF-értékét.

* Tünde Jankovics, Levente Kiss, Rients E. Niks and Margery L. Daughtrey (2009) First Report of Powdery Mildew (*Oidium* sp.) on Pincushion Flower (*Scabiosa columbaria*) in New York. *Plant Disease* 93: 316.

Kassai-Jäger E, Kiss L, Váczy Z and Váczy KZ (2010) First report of powdery mildew on lemon balm (*Melissa officinalis*) caused by *Golovinomyces biocellatus* in Hungary. *Plant Disease* 94: 1169.

Kiss L and Bereczky Z (2011) First report of *Oidium longipes* as the causal agent of petunia powdery mildew in the United Kingdom. *Plant Disease* 95: 361.

3. FONTOSABB, RÖVIDESEN PUBLIKÁLÁSRA KERÜLŐ EREDMÉNYEK

Az előző pontban említett munkák mellett több, nemzetközi szinten is közölhető vizsgálatot nemrégén fejeztünk be. Ezek publikálása a közeljövőben várható. Természetesen az alábbiakban felsorolt, jelenleg megírás alatt álló vagy rövidesen megírásra kerülő kéziratokban is feltüntetjük a jelen OTKA-projekt támogatását, és, az OTKA szabályzatával összhangban, két éven belül jelezzük a zárójelentés benyújtását követően a projekt eredményeképpen megjelent nemzetközi publikációkat annak érdekében, hogy ezeket az OTKA figyelembe vegye a projekt végleges minősítése során.

3.1. A strobilurin-típusú fungicidekkel szembeni rezisztencia kimutatása lisztharmatgombákban

A növénykórokozó gombák (pl. lisztharmatgombák) mitokondriális genomjának citokróm-b génjében feltárt G143A mutációt tartják a strobilurin-rezisztencia egyik legfontosabb molekuláris markerének. A célgén adott szakaszát klónozást követően számos hazai szőlő-, alma- és paprikalisztharmat-mintában megszekvenáltuk, és valamennyi mintában kimutattuk a fungicid-rezisztenciát jelző pontmutációt. Emellett klasszikus fungicid-rezisztencia vizsgálati módszerekkel is igazoltuk a hazai szőlő-, alma- és paprikalisztharmat-populációk nagyfokú strobilurin-rezisztenciáját. Eredményeink arra utalnak, hogy a strobilurin-tartalmú fungicidek használata hazai szőlő-, alma- és paprikaültvényekben nem feltétlenül a leghatékonyabb módja a lisztharmat-fertőzések elleni védekezésnek. Eredményeinkre több hazai előadás keretében hívtuk fel a figyelmet és ugyanezzel a céllal publikáltunk egy részletes szakcikket a *Növényvédelem* folyóiratban (lásd Közleményjegyzék).

Ugyanakkor nemzetközi szinten is új és érdekes eredményekhez vezetett a vadon élő növényfajokat fertőző lisztharmatgombafajok mintáiban a G143A mutáció vizsgálata. Eredményeinket, melyeket a publikálást megelőzően nem részletezünk, egy rangos nemzetközi folyóiratban szeretnénk közzé tenni.

3.2. A paprikalisztharmatot okozó *Leveillula taurica* genomjának megszekvenálása

Laboratóriumunk nemrég meghívást kapott arra, hogy vegyen részt a Köln-i Max Planck Intézet által kezdeményezett lisztharmatgenom-szekvenálási munkákban,

amelyben a paprikát fertőző *L. taurica* genomját szeretnék meghatározni. Ennek érdekében üvegházban nevelt és steril magvetéssel *in vitro* előállított paprikanövényeken próbálunk előállítani nagy mennyiségű, biológiai szennyezéseket minél kisebb mértékben tartalmazó *L. taurica* konídiumokat, melyekből DNS-t vonunk ki a genomszekvenálás céljaira. Ez irányú kísérleteinket tovább folytatjuk, és elképzelhető, hogy két éven belül publikálható eredmények születnek ebből a munkából.

3.3. Fibrozintestek kémiai összetételének meghatározása és az eredmények gyakorlati hasznosítása

Bizonyos, filogenetikai szempontból egyetlen leszármazási vonalhoz tartozó liztharmatgombafajok konídiumai feltűnő zárványokat, ún. fibrozintesteket tartalmaznak, melyek csírázáskor gyorsan eltűnnek, vagyis feltételezhető, hogy tartaléktápanyagként hasznosulnak. Kémiai összetételük ill. biológiai szerepük még nem ismert. Ultrastruktúrájuk vizsgálata érdekében TEM-vizsgálatokat végeztünk az ELTE Növény szerzettani Tanszékével együttműködve, valamint, projektünk nemzetközi kiegészítő (IN) OTKA-támogatásának köszönhetően, a Kent-i Egyetem Biológiai Intézetével és a Salzburg-i Egyetem Sejtbiológiai Tanszékével ugyancsak szorosán együttműködve. Ez utóbbi laboratóriumban EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy) méréseket végeztünk, amelyek biológiai minták esetében Európában csak a Salzburg-i laboratóriumban és még egy-két helyen végezhető el csupán. Emellett többféle citológiai festési eljárással, a konídiumok szonikálásával és egyéb módszerekkel tanulmányoztuk a fibrozintestek kémiai összetételét és lehetséges biológiai funkcióit.

A vizsgálatok alapján egyértelműen megállapítottuk a fibrozintestek kémiai összetételét és ennek alapján felmerült az eredmények nagyon komoly gyakorlati hasznosításának lehetősége is. Emiatt az adatok publikálását elhalasztottuk, és jelenleg folyamatban van egy tárgyalás-sorozat egy nemzetközi céggel a vizsgálatok gyakorlati kiaknázása érdekében. A tárgyalások függvényében döntünk az eredmények nemzetközi szintű publikálásáról.

3.4. Az almalisztharmat életsiklusa

Több éven keresztül végeztünk szabadföldi és üvegházi kísérleteket ebben a témában, megállapítva, hogy az almalisztharmat nem kizárólag a tavasszal

fertőződött, majd kora nyáron fásodó rügyekben telet át, ahogyan az eddigi ismeretek ezt jelezték, hanem az ősszel fellépő (kisebb mértékű) fertőzések is hozzájárulhatnak a következő tavasszal induló almalisztharmat-járványokhoz. Jelenleg az adatok összesítése folyik az eredmények nemzetközi szintű publikálása érdekében.

4. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI

Feltehetően a gyakorlati alkalmazás szempontjából a legjelentősebb eredmény az ún. fibrozintestek kémiai összetételének meghatározása (lásd 3.3 pont), mivel az adatok alapján felmerült egy újfajta fungicid-hatóanyag kifejlesztése. Ennek érdekében jelenleg tárgyalások folynak egy jelentős nemzetközi céggel.

Emellett a hazai növényvédelmi gyakorlat számára mindenképpen hasznosak a strobilurin-típusú fungicidekkel szembeni rezisztenciával kapcsolatos eredmények. Ugyanígy gyakorlati szempontból jelentős az őszibarack rozsdás foltossága ellen hatékony fungicides kezelések időzítésének megállapítása, amely első ízben teszi lehetővé a betegség ellen a célzott növényvédelmi kezeléseket.