

**TRANSZFORMÁCIÓS ÉS TOVÁBBI MOLEKULÁRIS
MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA AZ AMPELOMYCES
HIPERPARAZITA GOMBÁK BIOLÓGIÁJÁNAK
TANULMÁNYOZÁSÁRA**

Doktori értekezés

NÉMETH Z. MÁRK

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Kísérletes Növénybiológia Doktori Program

Programvezető: Prof. Kovács M. Gábor

Témavezetők:

Prof. Kiss Levente

University of Southern Queensland, Ausztrália;
Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet

Prof. Kovács M. Gábor

ELTE TTK, Biológiai Intézet, Növény szervezettani Tanszék;
Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet

Készült az ATK Növényvédelmi Intézetében

Budapest

2020

TARTALOMJEGYZÉK

SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
A lisztharmat- <i>Ampelomyces</i> interakció általános bemutatása	3
Az <i>Ampelomyces</i> nemzetség gombáinak életciklusa és mikoparazitizmusuk mechanizmusa	4
Az <i>Ampelomyces</i> -fajok taxonómiai bizonytalanságai és egyes <i>Phoma</i> -szerű mikoparaziták az <i>Ampelomyces</i> nemzetségbe való téves besorolása	5
Az <i>Ampelomyces</i> spp. gazdaspecificitásának kérdései	6
Az <i>Ampelomyces</i> spp. genetikai változatossága	10
Az <i>Ampelomyces</i> -törzsek felhasználása a lisztharmat-fertőzések elleni biológiai védekezésben	11
Mikoparazita gombák transzformálása fluoreszcens fehérjék génjeivel	12
Funkcionális genetikai vizsgálatok célzott génkiütéssel mikoparazita gombákban	14
<i>Ampelomyces</i> spp. egy természetes ökoszisztémában	17
Diagnosztikai határérték meghatározása <i>Ampelomyces</i> spp. természetes mintákból való qPCR-rel való kimutatásához	17
CÉLKITŰZÉSEK	19
ANYAG ÉS MÓDSZER	20
<i>Ampelomyces</i> -törzsek molekuláris filogenetikai vizsgálata	20
<i>Ampelomyces</i> -törzsek transzformációja ATMT módszerrel és a transz-formánsok jellemzése	26
Funkcionális vizsgálatok GFP-expresszázó <i>Ampelomyces</i> -törzsekkel	36
Célzott génkiütés megvalósítása az RS1-a <i>Ampelomyces</i> -törzsből	38
Az <i>Ampelomyces</i> -DNS jelenlétének kimutatására alkalmas qPCR módszer diagnosztikai határértékének meghatározása	47
EREDMÉNYEK	49
Az <i>Ampelomyces</i> -törzsek filogenetikai viszonyai négy lókuszos szekvenciái alapján	49
GFP-transzformáció és a transzformánsok jellemzése	53
GFP-expresszázó <i>Ampelomyces</i> -törzsekkel végzett funkcionális vizsgálatok eredményei	62
Célzott génkiütés megvalósítása az RS1-a törzsből	65
Az <i>Ampelomyces</i> -DNS kimutatására alkalmas qPCR módszer diagnosztikai határértéke	70
EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	72
Az <i>Ampelomyces</i> -törzsek nemzetségen belüli filogenetikai viszonyai négy lókuszos alapján	72
Az egyes <i>Ampelomyces</i> genotípusok gazdagombákkal való asszociációja	73
Az <i>Ampelomyces</i> -törzsek transzformálhatók ATMT-vel	75
A GFP-expresszió megkönnyíti az <i>Ampelomyces</i> -törzsek vizualizációját	77
Az élesztő rekombinációs klónozás felhasználása plazmid-konstrukciók összeállítására	80
Célzott génkiütés megvalósítása homológ rekombinációval egy <i>Ampelomyces</i> -törzsből	81
<i>Ampelomyces</i> spp. terepi mintákból való kimutatására alkalmas qPCR diagnosztikai határértéke	84
ÖSSZEFOGLALÁS	85
SUMMARY	86
IRODALOMJEGYZÉK	88
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	102
FÜGGELÉK	103

SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

A LISZTHARMAT-*AMPELOMYCES* INTERAKCIÓ ÁLTALÁNOS BEMUTATÁSA

A lisztharmat az egyik leggyakrabban előforduló, és az egyik legkönnyebben észlelhető növénybetegség. Névadó jellegzetessége a növények felszínén (leveleken, a száron és/vagy virágokon, terméseken) megfigyelhető por- vagy lisztszerű bevonat (Glawe 2008). A lisztharmat kifejezés ezt a növénybetegséget, illetve a jellemző betegségtüneteket jelenti, a kórokozó gombafajokat pedig lisztharmatgombáknak nevezzük. E fajok a tömlősgombák (Ascomycota) törzsének *Erysiphales* rendjébe tartozó obligát biotróf kórokozók (Glawe 2008). Közülük több, mint száz faj fordul elő hazánkban (Sz. Nagy & Kiss 2006) és körülbelül 900 faj ismert világszerte (Braun & Cook 2012), melyek összesen körülbelül tízezer zárvatermő növényfajt fertőznek (Amano 1986). Ezek között igen sok, gazdasági szempontból nagyon jelentős növényfaj található (Glawe 2008).

A *Pleosporales* rend *Ampelomyces* nemzetségébe tartozó, piknídiumképző tömlősgombák a lisztharmatgombák gyakori mikoparazitái. Ez az egyik legszembetűnőbb és leggyakoribb olyan interakció a természetben, melyben mindkét résztvevő partner gomba. Az *Ampelomyces* spp. intracelluláris hifái és piknídiumai gyakran megfigyelhetők különböző lisztharmatgomba struktúrákban (hifákban, konídiumokban, konídiumtartókban, termőtestekben) (Kiss 2008). Mivel kórokozó gombák parazitái, az *Ampelomyces*-ek definíció szerint hiperparaziták (Kiss 2001).

Az *Ampelomyces* spp. a lisztharmatgomba gazdáikkal és azok gazdanövényeivel együtt tritrofikus rendszereket képeznek (Kiss 2001, Pintye és mtsai 2015, Parratt & Laine 2016), és az ilyen rendszerek interakcióinak vizsgálatára használhatóak (Pintye és mtsai 2015). Másrészt e gombák jól használhatók a hiperparaziták parazita populációkra való hatásáról (Tollenaere és mtsai 2014) és ökológiájáról szóló vizsgálatokban (Parratt és mtsai 2017, Parratt & Laine 2018). Továbbá, mivel sok lisztharmatgombafajt parazitálni képes gombákról van szó (ld. lentebb), a generalista paraziták evolúcióját mutató modellként is felfoghatók (Pintye és mtsai 2015).

AZ *AMPELOMYCES* NEMZETSÉG GOMBÁINAK ÉLETCIKLUSA ÉS MIKOPARAZITIZMUSUK MECHANIZMUSA

A természetben a lisztharmat-képletekben kialakuló intracelluláris *Ampelomyces*-piknídiumok egysejtű konídiumokat termelnek, amelyek megfelelő körülmények között, magas páratartalom mellett kicsíráznak. A kialakuló, növekedésben lévő hifák képesek a lisztharmatgombák konídiumaiba és hifáiba belenőni (De Bary 1870, Kiss 2008). A parazitált lisztharmat-kolóniák továbbra is képesek a növekedésre, de sporulációjuk mértéke csökken (Emmons 1930, Shishkoff & McGrath 2002), vagy teljesen leáll (Philipp és mtsai 1984). A parazitált telepeken fejlődő friss lisztharmatgomba konídiumok tartalmazhatják a mikoparazita hifáit. E konídiumok képesek kicsírázni és új lisztharmattelepet kialakítani, amelyek már kialakulásuknak kezdetétől fogva parazitáltak lesznek (Kiss és mtsai 2010). Ez a jelenség arra utal, hogy az *Ampelomyces*–lisztharmat interakció a kezdeti szakaszban biotróf (Kiss és mtsai 2010).

A még nem parazitált lisztharmat-képletekbe való penetráció során enzimatikus és mechanikus folyamatok is szerepet játszanak. A behatolási helyeken appresszórium-szerű képleteket lehet megfigyelni (Sundheim & Krekling 1982). Ezt követően öt-tíz nap múlva a mikoparazita lebontja a gazda citoplazmáját (Emmons 1930, Hashioka & Nakai 1980). Ez arra utal, hogy az interakció a későbbi szakaszban nekrotróffá válik. A folyamat során több különböző enzim hidrolitikus aktivitását bizonyították (Philipp 1985, Rotem és mtsai 1999, Angeli és mtsai 2012b). Az enzimatikus folyamatokon túl, transzkripciós vizsgálatok alapján, más mechanizmusok is szerepet játszhatnak a mikoparazitizmusban (Siozios és mtsai 2015).

Az *Ampelomyces* spp. teleomorf alakja nem ismert, azonban populációgenetikai vizsgálatok eredményei utalnak rekombinációra (Kiss és mtsai 2011, Pintye és mtsai 2015). Ennek több különböző magyarázata lehetséges: i) elképzelhető, hogy annak ritkasága miatt nem sikerült még megfigyelni az ivaros szaporodást; ii) korábban lejátszódott ivaros szaporodás az *Ampelomyces*-törzsek között, de ennek képessége később elveszett; iii) paraszexuális folyamat okozza/okozta a detektálható rekombinációra utaló nyomokat (Pintye és mtsai 2015).

AZ *AMPELOMYCES*-FAJOK TAXONÓMIAI BIZONYTALANSÁGAI ÉS EGYES

PHOMA-SZERŰ MIKOPARAZITÁK AZ *AMPELOMYCES* NEMZETSÉGBE VALÓ TÉVES BESOROLÁSA

Az *Ampelomyces quisqualis* fajt az *Erysiphe necator* lisztharmatgombából írták le (Cesati 1852). De Bary (1870) az eredeti *A. quisqualis*, illetve mások által adott, egyéb nevek helyett a *Cicinnobolus cesatii* nevet adta ezeknek a gombáknak. Ez utóbbi lett a leggyakrabban használt név az 1970-es évekig. A nevezéktan áttekintését követően Rogers (1959) kimutatta, hogy nevezéktanilag az *A. quisqualis* a helyes, amely így elsőbbséget élvez annak ellenére, hogy általában a *C. cesatii* fajnevet használták. Morfológiai alapon, és gazdagombákra való feltételezett, de kísérletesen nem igazolt specializáció alapján, vagy az *Ampelomyces*-szel fertőzött lisztharmat gazdanövényén alapulva, vagy a gazda lisztharmatgombafajon alapulva számos különböző *Ampelomyces*-fajt különítettek el. Összesen több mint 40 formálisan érvényes *Ampelomyces*-faj leírása található meg a szakirodalomban (ld. Kiss & Nakasone 1998). Kísérletes adatok szerint egyetlen széles elterjedésű, nem szűk gazdaspecificitással jellemezhető nemzetségről van szó (pl. Pintye és mtsai 2015 és ld. a következő fejezetben). Ezt az utóbbi két jellemzőt későbbi kísérletes és molekuláris alapú eredmények is valószínűsítik. Ennek megfelelően az utóbbi időben az ide tartozó gombákat az *Ampelomyces quisqualis* névvel illették (Sztejnberg és mtsai 1989, Falk és mtsai 1995b), mintha monotipikus nemzetségről lenne szó. Újabb eredmények szerint azonban az *Ampelomyces quisqualis* néven jegyzett gombák csoportja genetikailag diverz és problémás fajkomplexnek tekinthető (ld. lentebb).

Kimutatták, hogy a sejtmagi riboszomális RNS génkomplex *internal transcribed spacer* (ITS) régiójának restrikciós fragment hossz-polimorfizmus (RFLP) alapú vizsgálata és a törzsek növekedési erélye alapján megkülönböztethetők lisztharmattelepekből izolálható ún. lassan és gyorsan növvő törzsek (Kiss 1997). A két típus csak távoli rokonságban van egymással, ennek következtében feltételezték, hogy e törzsek különböző nemzetségekbe tartozónak tekintendők (Kiss 1997). Az RFLP módszer által kapott eredményeket az egyes reprezentatív törzsek ITS-szekvenciáinak elemzése is megerősítette (Kiss & Nakasone 1998). A szekvenciák alapján világossá vált az is, hogy az ún. gyorsan növvő törzsek az *Epicoccum nigrum* fajjal állnak közeli rokonságban (Kiss & Nakasone 1998) és hogy az ebbe a csoportba tartozó törzsek sok esetben a *Didymella glomerata* fajba tartoznak (Sullivan & White 2000, Szentiványi és mtsai 2005, Kiss 2008). A valódi *Ampelomyces*-törzsek a második, ún. lassan

növekvő csoportba tartoznak (Kiss & Nakasone 1998, Szentiványi és mtsai 2005, Liang és mtsai 2007, Kiss 2008). Egy átfogó molekuláris filogenetikai munka eredményei szerint, amelybe két, névleg az *Ampelomyces* nemzetségbe tartozó törzset (*A. quisqualis* és *A. quercinus*) vontak be, bebizonyosodott, hogy két különböző családba tartoznak (De Gruyter és mtsai 2009). A gyorsan nöövő, *A. quercinus* néven nemzetközi törzsgyűjteményekben elhelyezett törzseket Aveskamp és mtsai (2010) az általuk újonnan leírt *Phoma fungicola* faj képviselőiként azonosították, kiemelve, hogy e törzseknek az *Ampelomyces* nemzetségbe való korábbi besorolása tévedés volt. Számos gyorsan nöövő *Phoma*-szerű törzs azonban még jelenleg is az *Ampelomyces* nemzetség tagjaként szerepel nemzetközi törzsgyűjteményekben. A dolgozat további része kizárólag a valódi *Ampelomyces*-törzsekkel foglalkozik. A taxonómiai kérdések tisztázásáig az *Ampelomyces* spp. megnevezés javasolt (Kiss 1997), így a dolgozatban nem használjuk a formálisan létező fajneveket, hanem *Ampelomyces*-fajokról (*Ampelomyces* spp.) vagy *Ampelomyces*-törzsekről beszélünk.

AZ AMPELOMYCES SPP. GAZDASPECIFICITÁSÁNAK KÉRDÉSEI

Az *Ampelomyces*-törzsek gazdaspecificitásának kérdését sokszor az egyes *Ampelomyces* genotípusok különböző lisztharmatgombafajokhoz vagy -nemzetségekhez való asszociációjának vizsgálatával közelítették meg. Egy, csak a szőlőlisztharmatból történt mintázás során izolált törzsek négy különböző genetikai kládba tartoztak az ITS és aktin (*ACT1*) szekvenciáik alapján (Pintye és mtsai 2012). Egy hasonló mintázás eredményei szerint az *Arthrocladiella mougeotii* fajból izolált törzsek három különböző kládba tartoztak az ITS-szekvenciák alapján (Kiss és mtsai 2011). Ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy adott lisztharmatgombafajból izolált *Ampelomyces*-törzsek lehetnek genetikailag különböző csoportba tartozók, de ezen kívül azt is mutatják, hogy különböző gazdagombákból és/vagy egymástól távol eső földrajzi területekről származó izolátumok kerülhetnek azonos genetikai csoportokba is (Kiss 1997, Kiss & Nakasone 1998, Liang és mtsai 2007, Park és mtsai 2010, Kiss és mtsai 2011, Pintye és mtsai 2012, Pintye és mtsai 2015). A bemutatott eredményeknek ellentmondva néhány másik, szintén molekuláris vizsgálatokon alapuló munka felvetette, hogy „bizonyos mértékű gazdaspecializáció” jellemző lehet az *Ampelomyces*-törzsekre (Park és mtsai 2010). Az *Ampelomyces*-törzsek néhány csoportjában „szűk gazdaspecializációra utaló bizonyítékot” véltek felfedezni annak alapján, hogy a molekuláris filogenetikai elemzések során kapott *Ampelomyces*-csoportokat adott

gazdagombákhoz asszociálnak tekintették (Park és mtsai 2010, Angeli és mtsai 2012a). Egy későbbi, csupán két új törzset bevonó, egy lókus (ITS) szekvenciáján alapuló eredményeket bemutató publikáció szintén támogatja a feltételezett szűk gazdaspecializációt (Liyanage és mtsai 2018). A szűk gazdaspecializációra vonatkozó megállapításokat a szerzők mindegyik esetben kizárólag molekuláris filogenetikai vizsgálatok alapján, keresztfertőzési kísérletek nélkül tették.

Az adott gazdagombához, vagy gombacsoportozóhoz való asszociáció azonban nem feltétlenül jelent gazdaspecificitást is. Ennek szemléletes példái az almalisztharmatból származó *Ampelomyces*-törzsekkel végzett vizsgálatok (Szentiványi és mtsai 2005, Kiss és mtsai 2011). Az izolátumok egy csoportja genetikailag erősen elkülönült a többi törzstől, és leggyakrabban az almalisztharmattal asszociált, de a genetikai elkülönülés és a gazdagombával való asszociációt nem okozhatta a szűk gazdaspecializáció, hiszen ezek a törzsek könnyen megfertőzték a dohány- (Szentiványi és mtsai 2005, Kiss és mtsai 2011) és az uborkalisztharmatot is (Kiss és mtsai 2011), sőt, azokkal szembeni mikoparazitizmusuk mértéke nem tért el jelentősen más *Ampelomyces*-törzsekétől (Kiss és mtsai 2011). Az ebbe a csoportba tartozó törzseket Európa több országában, különböző években izolálták, így földrajzi oka nem lehet a genetikai elkülönülésüknek. A feltételezett magyarázat a gazdagombák által okozott időbeli izoláció jelensége (Szentiványi és mtsai 2005, Kiss és mtsai 2011). Az almalisztharmat életciklusa kora tavasszal kezdődik a rügpikkelyek közti áttelelést követően. Az almalisztharmat elsősorban tavasszal fertőzi az almafákat (Woodward 1927), a lisztharmatok többségére azokban a nyári és őszi fertőzések jellemzőek. Az *Ampelomyces*-törzsekről kimutatták, hogy szintén áttelelhetnek a rügpikkelyeken és a fakérgen, feltételezhetően a gazdagomba képletein kívül (Szentiványi & Kiss 2003). A rügyfakadást követően az almalisztharmat és a mikoparazita is növekedésnek indul, sokszor hónapokkal azelőtt, hogy más lisztharmatok is gyakorivá válnának. Ez azt eredményezi, hogy a tavaszi, elsősorban almalisztharmattal asszociált törzsek kis eséllyel keverednek más, a vegetációs időszak későbbi szakaszában gyakori törzsekkel, azaz időbeli izoláció történhet (Szentiványi és mtsai 2005, Kiss és mtsai 2011). Az időbeli izolációból nem következik azonban, hogy az almalisztharmattal asszociált *Ampelomyces* mikoparazitákra szűk gazdaspecializáció lenne jellemző, hiszen a kísérletes eredmények éppen ennek ellenkezőjét bizonyítják. Ez a példa tehát azt mutatja, hogy a genotípus(ok) gazdagombákkal való asszociáltságának megléte nem utal egyértelműen a gazdaspecificitásukra. Ebből az

következik, hogy a gazdaspecificitás megalapozott vizsgálatához inokulációs kísérletekre is szükség van.

Számos laboratóriumi kísérlet (De Bary 1870, Falk és mtsai 1995b, Angeli és mtsai 2012b) bizonyítja, hogy az egyes törzsek képesek az eredeti gazdagombával távolabbi rokonságban álló lisztharmatgombafajokat is megfertőzni. Az első, *Ampelomyces* gombákkal való inokulációk eredményei szerint az adott lisztharmatból származó konídiumok képesek más lisztharmatok telepeit, illetve konídiumait megfertőzni (De Bary 1870). A *Podosphaera leucotricha*-ról izolált 53 törzs mindegyike képes a dohányon lisztharmatot okozó *Golovinomyces tabaci* (korábbi nevén *G. orontii*) fajt parazitálni (Szentiványi és mtsai 2005). Öt különböző lisztharmatgomba nemzetségbe tartozó fajból izolált különféle *Ampelomyces*-törzsek sikeresen fertőzik a *Podosphaera xanthii*-t, és négy nemzetségből izolált *Ampelomyces*-törzsek a *G. orontii*-t (a *Phyllactinia* nemzetségből izolált törzseket a *G. orontii* fajjal szemben nem tesztelték (Liang és mtsai 2007)). Törzsek szelektálására végzett szisztematikus mikoparazita tesztekben öt különböző lisztharmatgombafajból származó nyolc törzs mindegyike képes az *E. necator* telepeit megfertőzni (Legler és mtsai 2016). Számos különböző lisztharmatfajból izolált törzssel végzett mikoparazita tesztek tanúsága szerint mindegyik törzs képes volt a tesztelt három (két különböző nemzetségbe tartozó) lisztharmatgombafajt (*E. necator*, *P. xanthii*, *P. aphanis*) megfertőzni (Angeli és mtsai 2012b). Kísérletesen igazolták továbbá, hogy a szőlőlisztharmatot természetes körülmények között is könnyen megfertőzik genetikailag eltérő (különböző genetikai kládokba tartozó) *Ampelomyces*-törzsek (Pintye és mtsai 2012).

Az *Ampelomyces*-törzsek esetén az előzőekben ismertetett kísérletes eredmények alapján biztosan nem beszélhetünk szűk gazdaspecificitásról abban az értelemben, hogy egy adott genetikai csoportba tartozó törzsek csak egy lisztharmatgombafajt vagy -nemzetséget képesek parazitálni. Ez azonban nem zárja ki feltétlenül annak a lehetőségét, hogy a különböző genetikai csoportba tartozó *Ampelomyces*-törzsek az egyes gazdagombákat eltérő mértékben képesek parazitálni. Számos különböző, összesen négy genetikai csoportba tartozó törzssel végzett mikoparazita tesztekben mindegyik törzs képes volt a tesztelt három különböző lisztharmatgombafajt megfertőzni, azonban a vizsgált *Ampelomyces*-törzsek mikoparazita képességének mértéke függött attól, hogy melyik genetikai csoportba tartoznak (Angeli és mtsai 2012b).

Egy korábbi észrevétel szerint az *Ampelomyces* mikoparaziták az eredeti gazda telepeiben több piknidiumot képeznek, mint az attól eltérő lisztharmatokban (Falk és mtsai

1995b). Más vizsgálatokban ennek az ellenkezőjét tapasztalták, mégpedig hogy különböző lisztharmatgombafajokból izolált *Ampelomyces*-törzsek az eredeti gazdától függetlenül hasonló mértékben parazitálják más lisztharmatfajok telepeit *in vitro* és terepi kísérletekben egyaránt (Szentiványi és mtsai 2005, Kiss és mtsai 2011, Legler és mtsai 2016).

Konídiumcsírázási kísérletek szerint az eredeti gazdagomba konídiumainak jelenléte nem serkenti jobban az adott *Ampelomyces*-törzsek konídiumainak csírázását, hanem egységes, lisztharmatgombafajtól független stimulációs hatás mutatható ki, sőt néhány esetben az eredeti gazdától eltérő faj mutat nagyobb serkentő hatást (Angeli és mtsai 2012a). Egy korábbi megfigyelés szerint különböző lisztharmatgombafajok konídiumainak jelenléte eltérő hatással volt egy *Ampelomyces*-törzs konídiumcsírázására: négy faj erősebben, egy pedig kevésbé stimulálta a tesztelt törzs konídiumainak csírázását az eredeti gazdagomba konídiumaihoz képest (Gu & Ko 1997). Egy másik lisztharmatfajjal szemben nem mutatkozott szignifikáns különbség, azonban a kontrollhoz (lisztharmatgomba-konídiumok nélkül történő csírázás) képest mindegyik esetben jelentősen magasabb volt az *Ampelomyces* konídiumok csírázása (Gu & Ko 1997).

A gazdaspecificitás és a genetikai csoportok közötti, mikoparazita képességben való esetleges különbségek megértését bonyolítja az *Ampelomyces*-törzsek közötti törzsszintű különbségek megléte. Több *Ampelomyces*-törzs vizsgálata során nyilvánvalóvá vált, hogy laboratóriumi kísérletekben a különböző törzsek mikoparazita képességének mértékében erős különbségek tapasztalhatók (Angeli és mtsai 2012b, Legler és mtsai 2016). Ezek a törzsszintű különbségek különböző lisztharmatgombafajokkal szemben eltérő mértékűek lehetnek (Angeli és mtsai 2012b), de általában a leghatékonyabb mikoparazitizmusra képes *Ampelomyces*-törzsek nem csak az eredeti saját gazda, hanem más lisztharmatgombafajok ellen is igen hatékonyak (Angeli és mtsai 2012b, Legler és mtsai 2016). Ez azt mutatja, hogy a mikoparazitizmus mértéke nem függ az eredeti gazdagombától (Legler és mtsai 2016), és nem is az egyes genetikai kládok általános jellemzője, hanem törzsszintű különbségekről van szó. Lehetséges, hogy a kísérletes munkákban kapott ellentmondásos eredmények részben magyarázhatóak a törzsszintű különbségekkel.

AZ *AMPELOMYCES* SPP. GENETIKAI VÁLTOZATOSSÁGA

Az *Ampelomyces*-törzsek filogenetikai viszonyait vizsgáló, elsősorban populációgenetikai munkákban néhány kivételtől (Park és mtsai 2010, Pintye és mtsai 2012) eltekintve általában egy lókuszt, az ITS szekvenciái alapján különítettek el csoportokat. Liang és munkatársai (2007) összesen hét, Angeli és munkatársai (2012a) öt kládot különítettek el, amelyek közül kettőben további két alcsoportot jelöltek meg. Kiss és munkatársai (2011) négy leszármazási vonalat jelöltek meg, alcsoportokat azokban nem különítettek el, annak ellenére, hogy az elemzésekben kapott törzsfákon jól támogatott kládok láthatók a fő csoportokon belül is. Szintén kizárólag ITS-szekvenciákat felhasználva, de a kapott csoportok monofiletikusságát nem szigorú kritériumként alkalmazva Liyanage és mtsai (2018) négy csoportra osztották az *Ampelomyces*-törzseket. ITS-szekvenciák alapján, valamint az *ACT1* és az ITS-szekvenciákat egyesítve elemezve öt klád különült el (Pintye és mtsai 2012). Érdekes módon kizárólag az *ACT1* lókuszt alapján a legnagyobb klád hét alcsoportra volt bontható. Ugyanezen lókusztok vizsgálata alapján szintén öt csoportba (négy klád, melyek közül az egyik további két kládra bontható) sorolódottak az *Ampelomyces*-törzsek (Park és mtsai 2010).

Az egyes *Ampelomyces*-ként elnevezett törzsek valójában nem tartoznak az *Ampelomyces* nemzetségbe (ld. fentebb). Másrészt, a fent említett eredmények összegzése alapján molekuláris filogenetikai vizsgálatok és kísérletes adatok nem támasztják alá a valódi *Ampelomyces*-gombák szűk gazdaspecificitásáról szóló elképzeléseket, amelyek alapján a szakirodalomban megtalálható fajok egy részét leírták. A valódi *Ampelomyces* nemzetségben jelentős genetikai változatosság figyelhető meg. Az egyes genetikai csoportok között akár 16-19%-os szekvenciakülönbség is lehet az ITS régióban (Kiss & Nakasone 1998, Liang és mtsai 2007); az aktin szekvenciák pedig ennél is nagyobb mértékű variabilitást mutatnak (Pintye és mtsai 2012). A nemzetségben elkülöníthető leszármazási vonalak feltehetően külön fajokat képviselnek (Liang és mtsai 2007, Park és mtsai 2010). A formálisan leírt fajok azonban nem felelnek meg a DNS-szekvenciák alapján kapott, filogenetikai csoportosításoknak. Néhány esetben ugyan annak a fajnak több publikált neve is létezik. Mindezek miatt a nemzetség taxonómiai revíziója szükséges (Liang és mtsai 2007, Legler és mtsai 2016). Az *Ampelomyces*-törzsek filogenetikai viszonyait vizsgáló, a fent említett munkákban mindeddig nem volt kitűzött cél a nemzetség taxonómiai revíziója. Egyes genotípusok (genetikai csoportok) között telepmorfológiai jellemzőkben megmutatkozó különbségeket azonban már kimutattak (Angeli és mtsai 2012a).

A hivatkozott molekuláris filogenetikai elemzések legtöbbje az ITS-régió szekvenciáján alapul, amelynek fajok elkülönítésére való használata sok esetben ellentmondásos (Seifert és mtsai 1995, Thines és mtsai 2018). E célra nem egy, hanem több lókuszt szekvenciáinak bevonása javasolt (Taylor és mtsai 2000, Hibbett és mtsai 2016). Felvetették, hogy az *Ampelomyces* nemzetségbe tartozó fajok elkülönítéséhez is multilókuszt filogenetikai elemzések szükségesek (Park és mtsai 2010). Az *Ampelomyces* nemzetség korábbi, két lókuszon (ITS és *ACT1*) alapuló vizsgálataiban limitált számú törzset vontak az elemzésekbe és nem készült olyan átfogó elemzés, amelyben a különböző munkákban részt vevő törzsek együttesen szerepeltek volna. Az elemzésekbe vont lókusztok számának növelésével megalapozottabb taxonómiai döntést hozhatunk a fajok lehatárolásához, mivel például a csoportok támogatottsága növekedhet és a nemzetségen belüli leszármazási vonalak egymáshoz viszonyított helyzete is biztosabban meghatározható. Egy viszonylag nagyobb mintaszámmal és szélesebb körű taxonmintázással, valamint több lókuszt együttes elemzésével a filogenetikai viszonyok megismerésén túl valószínűleg pontosabb képet lehet alkotni arról is, hogy az *Ampelomyces*-törzsekre jellemző lehet-e valamilyen mértékű asszociáció a különböző genotípusok és a gazdagomba-fajok között.

AZ *AMPELOMYCES*-TÖRZSEK FELHASZNÁLÁSA A LISZTHARMAT-FERTŐZÉSEK ELLENI BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉSBEN

A lisztharmatgombák gazdanövényei között sok gazdaságilag fontos termesztett faj található (Glawe 2008). A hiperparaziták – mint az *Ampelomyces*-fajok is – felhasználhatók egyes növénykórokozók elleni védekezésben (Parratt & Laine 2016). Ennek megfelelően különböző *Ampelomyces*-törzsek biofungicid-készítmények részeként pl. az Európai Unió országaiban és az Egyesült Államokban kereskedelmi forgalomba kerültek, és felhasználhatók például a szőlő- (Caffi és mtsai 2013) és uborkalisztharmat elleni növényvédelemben (Kiss és mtsai 2004). Az *Ampelomyces*-törzsek mikoparazita képességén túl két jellemző segíti elő, hogy biológiai növényvédelemben lehessen őket használni. Egyrészt, bár nem számítanak túl jó szaprotróf képességű gombáknak (Philipp 1985), vannak szaprotróf jellegeik és táptalajon fenntarthatók (pl. Legler és mtsai 2016), azaz nem obligát szimbionták. Ez megkönnyíti a kísérletezést ezekkel a gombákkal és a gyakorlati felhasználást is. Lehetségessé vált pl. egyes törzsek nagy mennyiségben, fermentációs technikával való előállítására és jól használható készítményekké való fejlesztése (Angeli és mtsai 2017) is. Másrészt e gombákat különleges

specifitás jellemzi. *Ampelomyces*-törzseket kizárólag lisztharmatokból izoláltak (Kiss és mtsai 2004, Pintye és mtsai 2012), azaz feltételezhetően csak a lisztharmatgombákat fertőzik, azonban az egyes törzsek képesek sok különféle, egymással csak távoli rokonságban lévő lisztharmatgombát megfertőzni (ld. fentebb). A gazdagombákra való specifitásuk hiánya miatt lehetséges, hogy adott törzsek sokféle gazdaságilag fontos lisztharmat ellen felhasználhatóak (Kiss és mtsai 2004).

Az *Ampelomyces*-alapú biofungicid-termékből (pl. Szejnberg és mtsai 1989, Lee és mtsai 2004, Menge & Marthamakobe 2016) vagy táptalajon növekvő tenyészetből (Legler és mtsai 2016) szuszpenziót lehet készíteni és a lisztharmattal fertőzött növényekre permetezni, ezzel a lisztharmattelepek parazitálása rögtön elkezdődhet. Kísérletes munkákban használták folyadékkultúrában nevelt tenyészetek szűrletét is (Singh és mtsai 2017).

Az *Ampelomyces* tartalmú biokontroll szerek felhasználása nem csak kuratív, hanem preventív módon is történhet (Paulitz & Bélanger 2001, Bélanger & Labbé 2002, Kaur és mtsai 2018). Ez arra utal, hogy a mikoparazita anélkül is túlélhet a leveleken, hogy azonnali kapcsolatba kerülne a célzott lisztharmatgombával. Ezt a jelenséget még nem figyelték meg közvetlenül és nem ismert, hogy mennyi ideig lehet hatásos a lisztharmatfertőzés előtt, preventíven kijuttatott biokontroll szer.

MIKOPARAZITA GOMBÁK TRANSZFORMÁLÁSA FLUORESzcENS FEHÉRJÉK GÉNJEIVEL

A mikoparazitizmus folyamata és az *Ampelomyces*-törzsek életciklusa többé-kevésbé ismert (Szentiványi & Kiss 2003, Kiss és mtsai 2010, Kiss és mtsai 2011), de az életciklusban van néhány szakasz, amelyet eddig kevésbé vizsgáltak. Ezek alaposabb megismerése az *Ampelomyces*-törzsek hatékonyabb biofungicid szerként való felhasználásában is hasznos lehet. Az *Ampelomyces*-ekkel mindig lisztharmattal asszociáltként lehet találkozni a természetben, ezért a gazdaszervezet nélküli potenciális előfordulásuk lehetősége érdekes és vitatott felvetés. Nem ismert például, hogy mi történik a lisztharmattal nem fertőzött levelekre természetes módon kerülő, vagy biokontroll szer formájában mesterségesen kijuttatott *Ampelomyces* konídiumokkal.

Az *Ampelomyces*-törzsek levélhullás utáni megfigyelése azért lehet szükséges, hogy (i) észlelhessük a feltételezett (Brimner & Boland 2003), de szisztematikusan nem vizsgált, a nem-célorganizmusra kifejtett hatásukat és (ii) láthassuk, mi történik e gombákkal, miután

kifejtették biokontroll funkciójukat. Mivel táptalajon fenntarthatók, sőt, sok esetben ún. szaprotróf (nem a gazdagomba képleteiben kialakuló) piknídiumokat is képeznek (pl. Legler és mtsai 2016), nem zárható ki, hogy szaprotróf szervezetekként fennmaradjanak (pl. a talajban, talajon, növényi részekben stb.). A korábbi mikológiai szakirodalomban található adatok, amelyek szerint az *Ampelomyces*-törzsek képesek a növényi leveleken való szaprotróf növekedésre, az epidermiszsejtekbe való behatolásra és a növény szövetében való növekedésre (Emmons 1930). Megfigyelték továbbá, hogy az *Ampelomyces*-törzsek öregedő levelekben szaprotróf piknídiumokat képeztek (Yarwood 1939), és hogy a vegetációs időszak végén gyűjtött leveleken *Ampelomyces* piknídiumok találhatóak (Szentiványi & Kiss 2003). Erről a feltételezhető szaprotrófikus növekedésről való ismeretek hiányosak és a jelenséget nem figyelték meg kísérleti körülmények között.

A fluoreszcens fehérjék felhasználása egy jól bevált módszer a gomba–gomba interakciók vizualizációjának elősegítésére (Lorang és mtsai 2001, Lu és mtsai 2004). A konstitutívan expresszálódó fluoreszcens fehérjék lehetővé teszik az egyes törzsek különféle környezetekben való szelektív monitorozását. Zöld fluoreszcens fehérjét (*green fluorescent protein*; GFP) konstitutívan expresszáló *Trichoderma harzianum* törzseket használtak a *Pythium ultimum* és a *Rhizoctonia solani* ellen kifejtett mikoparazitizmus *in vitro* megfigyeléséhez és feltárták ezeknek az interakcióknak a morfológiai részleteit (Lu és mtsai 2004). A *Clonostachys rosea* különböző környezetekben való viselkedését és mikoparazitizmusát szintén GFP-t expresszáló törzsekkel figyelték meg (Lübeck és mtsai 2002). Két különböző típusú fluoreszcens fehérje felhasználásával lehetséges volt két független, *Sclerotinia sclerotiorum* elleni biofungicid-készítményként használható gomba (*Microsphaeropsis ochracea* és *Paraconiothyrium minitans*) szinergizmusát megfigyelni és e két faj mikoparazitizmus folyamatának részleteit feltárni. (Bitsadze és mtsai 2015). GFP-t kifejező *Trichoderma virens* törzsek felhasználásával mutatták ki, hogy a *Sclerotium* és *Sclerotinia* fajokkal szembeni mikoparazita folyamatban egyértelmű különbségek vannak a mikoparazita szkleróciumokon belüli elhelyezkedésében (Sarrocchio és mtsai 2006).

A fluoreszcens fehérjét expresszáló gombatörzsek előállításához elengedhetetlen egy, az adott célorganizmusban sikeresen használható transzformációs módszer. A fent említett munkák többségében a polietilén-glikol felhasználásán alapuló transzformációs módszert alkalmazták, amelynek a hatékonysága erősen változó (Amey és mtsai 2002) és egy másik hátránya, hogy a transzformálni kívánt organizmusból protoplasztokat kell készíteni. Ez sok esetben komoly nehézség, és az általánosan használt módszerek hatékonysága is nagyon

változó (Idnurm és mtsai 2017). Ezzel ellentétben az *Agrobacterium*-közvetítette transzformálás (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; ATMT) egy flexibilis, a gombák transzformálására univerzálisan és könnyen használható módszer, amellyel magas hatékonyságot lehet elérni (De Groot és mtsai 1998). Olyan gombák esetén is sikerrel alkalmazták, amelyeket korábban nem, vagy nagyon nehezen transzformálhatónak tartottak (Pardo és mtsai 2002, Michielse és mtsai 2005, Gorfer és mtsai 2007). Az *Ampelomyces*-törzsek rutinszerűen használható molekuláris genetikai eszköztárát még nem dolgozták ki. Mivel sok gombafaj esetén az ATMT számít az alapvető transzformációs módszernek (Idnurm és mtsai 2017), feltételezhető, hogy használható *Ampelomyces*-törzsek transzformánsainak előállítására is.

FUNKCIONÁLIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK CÉLZOTT GÉNKIÜTÉSSEL MIKOPARAZITA GOMBÁKBAN

Az adott organizmus esetén jól használható transzformációs módszer birtokában lehetségessé válik különböző funkcionális genetikai vizsgálatok elindítása. Mivel az ATMT magas transzformációs hatékonyságot biztosít és a legtöbb célorganizmus esetén egy kópiás, stabil transzgenbeépülést eredményez (Li és mtsai 2017), nagy áteresztőképességű mutagenézis módszerré is fejleszthető, amellyel több ezer gén funkcionális vizsgálata elvégezhető (Jeon és mtsai 2007). A *Pa. minitans* T-DNS inzerciós mutánsainak ezreit állították elő és ezeket különböző funkciók szerint szisztematikusan ellenőrizték és sikeresen izoláltak olyan törzseket, melyek a mutáció következtében elvesztették a *S. sclerotiorum*-mal szembeni mikoparazitizmus képességét (Rogers és mtsai 2004, Li és mtsai 2005). E mutánsok további vizsgálata, a kiütött gén klónozása néhány esetben konkrét, génszintű funkcionális jellemzéshez is vezetett (Rogers és mtsai 2008, Luo és mtsai 2018).

A véletlenszerű mutagenézisen alapuló módszer hátránya, hogy a mutánsok szisztematikus vizsgálata általában időigényes folyamat, emiatt csak olyan gombák esetén eredményes, amelyeknél van mód a mikoparazita képesség megváltozásának gyors tesztelésére (Massart & Jijakli 2007). A genomszekvenálás terjedésével és a szekvenált genomok publikussá válásával szélesebb körben lehetővé vált a reverz genetikai megközelítés alkalmazása, azaz egyes gének funkcióinak a kérdéses gének célzott mutagenézisével való felderítése (Frandsen és mtsai 2012). A gombák többségében működik a homológ rekombináción alapuló célzott génbeépítés (Idnurm és mtsai 2017). Ennek lényege, hogy a

megcélzott régióval szomszédos szakaszokkal homológ DNS bevitelével kettős homológ rekombináció indukálódhat a célszerkezetben, amely a homológ szakaszok közötti régiók kicserélődését eredményezi. A módszer irányított mutagenézisre használható. A célzott génkiütés alapvető fontosságú a mikoparazita gombák genetikájának és génjeik funkcióinak megértéséhez és e génfunkciók alaposabb ismerete a biokontroll képesség hatékonyságának növeléséhez is hozzájárulhat (Zeilinger 2004). A mikoparazita gombákkal végzett célzott génkiütéses kísérletek nagy része *Trichoderma*-törzsekre korlátozódik (Massart & Jijakli 2007). Egy-egy szabályozó gén kiütésének következtében nagy mértékben sikerült növelni a biokontroll törzsek hatékonyságát: a *knock-out* (KO; azaz olyan transzformánsok, amelyekben megvalósult a génkiütés) transzformánsokban egyértelműen megnövekedett a mikoparazitizmussal kapcsolatba hozott gének expressziója és ennek következtében e törzsek biokontroll potenciálja jóval felülmúlta a vad típusét (Mendoza-Mendoza és mtsai 2003, Fang & Chen 2018). Még összetettebb fenotípushoz vezetett két másik gén kiütése *T. virens* gombában, mely megváltoztatta a gomba másodlagos anyagcseréjét, a mikoparazita képességét és sporulációját is (Mukherjee & Kenerley 2010, Bansal és mtsai 2019). Egy transzkripciós faktor gén kiütése a *Clonostachys chloroleuca* egy törzsében nem járt morfológiai változásokkal, azonban a mikoparazita képesség csökkenéséhez vezetett (Sun és mtsai 2018), egy chaperon fehérje kiütése viszont a *Trichoderma* törzsekkel kapott eredményekhez hasonlóan mind morfológiai változásokat, mind a mikoparazitizmus mértékének csökkenését okozta (Sun és mtsai 2019). A közvetlenül a mikoparazitizmusban szerepet játszó, pl. lebontó enzimeket kódoló gének kiütése következtében általában jobban körülhatárolható fenotípust lehet megfigyelni. A *T. harzianum* egyik endokitináz kódoló génjének kiütésével kimutatták, hogy különböző gazdaorganizmusok ellen egymástól kissé eltérő mechanizmusok működhetnek a mikoparazitizmus folyamán, mivel az adott gén kiütése eltérő hatással volt két különböző gazdagombával szemben (Woo és mtsai 1999). A *Pa. minitans* esetén célzott génkiütéssel, majd azt követő komplementációval bizonyították, hogy egyes oxidázoknak is szerepe van a mikoparazitizmusban (Wei és mtsai 2016).

Mivel a protoplasztkészítéshez rendelkezésre állnak a *Trichoderma*-fajok többségében jól működő protokollok, a legtöbb esetben a célzott kiütéshez használandó fragmentet polimeráz láncreakcióval (PCR) állították elő és ezt követően protoplasztokba transzformálták. Mivel ez a módszer alacsony hatékonysággal működött, a *T. atroviridae* két szabályozó génjének vizsgálatához a homológ rekombináción alapuló génkiütést és az ATMT módszert együttesen használták (Zeilinger 2004). Kimutatták, hogy az egyik gén kiütése

következtében a mikoparazita elveszíti a gazdagombák elleni virulenciáját (Zeilinger és mtsai 2005). Egyes gének kiütésének kettős hatása van: a *knock-out* transzformánsok mikoparazita képessége csökken, viszont egyéb mechanizmusoknak (például kis molekulatömegű antifungális anyagok termelésének) köszönhetően biokontroll célokra hatékonyabban használhatók lehetnek, mint a vad típusú törzs (Reithner és mtsai 2005, Reithner és mtsai 2007). ATMT módszert és a géнкиütéshez a homológ rekombinációs technikát alkalmazták a *Lecanicillium fungicola* egy glükánáz génjének kiütésére is (Amey és mtsai 2003). A kapott mutánsok gazdagombával szembeni virulenciája csökkent. Egy azonos funkciójú enzim génjének kiütése következtében csökkent a *T. vires* biokontroll gomba *Py. ultimum*-mal szemben mutatott mikoparazita képessége (Djonović és mtsai 2006).

Az előbbi példákban látható, hogy a célzott géнкиütés felhasználásával értékes információkat lehet szerezni a mikoparazitizmusban részt vevő gének funkciójáról, ezért érdemesnek tartottuk az ilyen típusú vizsgálatok elindítását *Ampelomyces* mikoparazitákban is. A nitrát-reduktáz gént jelöltük ki kiütendő célgénként, mivel a nitrátredukáló rendszer *Ampelomyces*-törzsekben való megléte érdekesnek tűnik, hiszen a lisztharmatgombákban redukált nitrogénformákhoz jutnak (Spanu és mtsai 2010), azaz a leggyakoribb életükben nincs szükségük nitrátredukálásra. A célgén választásának másik oka, hogy ebben a génből mutációt hordozó törzsekre táptalajon könnyen kimutatható fenotípus jellemző (Cove 1976, Tomsett & Garrett 1980).

A homológ rekombináción alapuló géнкиütés *Ampelomyces*-ben való teszteléséhez szükséges vektort az élesztő rekombinációs klónozás (Ma és mtsai 1987, Joska és mtsai 2014) módszerével kívántuk előállítani. Ennek lényege, hogy a leendő vektor fragmentjeinek felszaporításához használt PCR-primerek mindegyikének 5' végére kb. 30-35 nukleotid hosszúságú plusz szakaszt terveznek (Joska és mtsai 2014). E szakaszok szekvenciája megegyezik azoknak a DNS-fragmenteknek végeinek szekvenciáival, amelyekhez klónozni kívánják őket. A PCR végén e szakaszok a keletkező termékek végére kerülnek. A homológ végeknek köszönhetően a fragmentek élesztőbe (*Saccharomyces cerevisiae*) transzformálását követően azok *in vivo* rekombinációval egymáshoz kapcsolódnak (Oldenburg és mtsai 1997). A megfelelő szelekciós gén fragmentjének hozzáadásával a kívánt plazmidot hordozó élesztőkolóniák szelektálhatóak (Joska és mtsai 2014).

AMPELOMYCES SPP. EGY TERMÉSZETES ÖKOSZISZTÉMÁBAN

A finnországi Åland-szigeteken természetes körülmények között előforduló lándzsás útifű (*Plantago lanceolata*) populációk és e növényeket rendszeresen megfertőző *Podosphaera plantaginis* lisztharmatgomba populációk kölcsönhatásait több mint 15 éve folyamatosan vizsgálja a Helsinki Egyetem egy kutatócsoportja. Ez a kölcsönhatás a leghosszabb ideje folyamatosan, tudományos igényvel nyomon követett természetes gazdanövény–parazita kapcsolatrendszer, amelynek a lisztharmattelepeket parazitáló *Ampelomyces*-törzsek is részét képezik (Tollenaere és mtsai 2014). A *Pl. lanceolata* növények a szigeteken fragmentált populációkat alkotnak, a *P. plantaginis* lisztharmatgomba metapopulációként van jelen ezen az élőhelyen (Jousimo és mtsai 2014). Ebben a metapopulációban a lisztharmatgomba előfordulási gyakorisága alacsony, azaz a potenciális gazdanövényfoltoknak adott időszakban csak kis hányada fertőzött. Az adott gazdanövényfoltok fertőzöttsége az évek során erősen változik, azaz az aktuálisan nem fertőzött foltok gyakran fertőzötté válnak, és fordítva (Jousimo és mtsai 2014). Az összes lisztharmatpopuláció kb. 40%-a kihal a téli időszakban, ennek következtében a korábban fertőzött *Pl. lanceolata* foltok egy része nem lesz fertőzött a következő évben (Tack & Laine 2014). A lisztharmat populációdinamikájában jelentős szerepe van a téli időszakban való túlélésnek (Tack & Laine 2014). Az áttelelő képletek a *P. plantaginis* termőteste és ezek túlélési arányán múlik a kórokozó következő évi előfordulási gyakorisága. Az *Ampelomyces* mikoparaziták a lisztharmatok termőtesteiben is élőködnek (Falk és mtsai 1995a, Kiss 2008) és mivel az Åland-szigeteken is megtalálhatók, feltételezhető, hogy hatással lehetnek a *P. plantaginis* populációdinamikájára a termőtestek parazitálása révén.

DIAGNOSZTIKAI HATÁRÉRTÉK MEGHATÁROZÁSA AMPELOMYCES SPP. TERMÉSZETES MINTÁKBÓL VALÓ QPCR-REL VALÓ KIMUTATÁSÁHOZ

Egyes hiperparazitákról ismert, hogy befolyásolhatják a gazda virulenciáját (Davelos & Jarosz 2004), viszont a hiperparazitáknak a patogén metapopulációinak dinamikájára való közvetlen hatását még nem vizsgálták (Tollenaere és mtsai 2014). Ennek a feltételezett jelenségnek vizsgálatára nagyon jó keretet biztosít a fent jellemzett *Pl. lanceolata*–*P. plantaginis*–*Ampelomyces* rendszer. Az åland-szigeteki vizsgálati területen a lisztharmatfertőzés (vagy annak hiánya) szabad szemmel könnyen megállapítható. Az *Ampelomyces*-képletek jelenléte általában nem látható szabad szemmel és mikroszkóppal is csak bizonyos gyakorlattal

észlelhető. Ezért a finnországi kutatócsoport az *Ampelomyces*-törzsek előfordulási gyakoriságának gyors és előismereteket nem igénylő mérésére egy kvantitatív PCR (qPCR)-alapú módszert dolgoztak ki, amellyel molekuláris úton, DNS alapján, gyorsan kimutatható a hiperparazita jelenléte. Egy ilyen módszer használatához szükség van egy jól megalapozott diagnosztikai határértékre, amelynek segítségével a mintákról eldönthető, hogy tartalmaznak-e *Ampelomyces*-DNS-t.

A qPCR eredményeként egy mennyiséget kapunk a C_q (vagy más néven C_t) érték (kvantifikációs vagy küszöb ciklusszám) formájában (Burns & Valdivia 2008); minél alacsonyabb a C_q érték, annál magasabb a mintában a célzott DNS mennyisége (Heid és mtsai 1996). Esetenként a qPCR programtól, primerektől, nem specifikus amplifikáció megjelenésétől függően a negatív mintákban is mérhető C_q érték (Burns & Valdivia 2008). Amennyiben a qPCR módszert diagnosztikai célra, azaz az adott DNS jelenlétének kimutatására kívánjuk használni, meg kell határozni egy C_q értéket, amely a pozitív, azaz a cél-DNS-t tartalmazónak tekintett mintákat elválasztja a negatív mintáktól (Caraguel és mtsai 2011), amelyekben feltételezhetően a nem specifikus amplifikáció eredményezte a mért C_q értéket. Ezt az elválasztó értéket a szakirodalomban *cutoff*-nak nevezik, melynek magyar nyelvű megfelelőjeként a dolgozatban a diagnosztikai határérték kifejezés szerepel.

A diagnosztikai határérték meghatározásának több elfogadott módja van. Az ún. epidemiológiai megközelítés esetén (Caraguel és mtsai 2011) az adott populációra már rendelkezésre álló (valamilyen más módszerrel kapott) adatokból (referencia mintasor) indulnak ki. A határérték meghatározása történhet például statisztikai alapon a nem valódi pozitív (álpozitív) minták arányának előre meghatározott, maximálisan megengedett értékét kijelölve (Chandelier és mtsai 2010), vagy egy adott szempont szerint kijelölt diagnosztikai paraméter (pl. legalacsonyabb álpozitív arány, legmagasabb arányú helyes diagnosztizálás stb.) megcélozásával (Caraguel és mtsai 2011). Az analitikai megközelítés során a technikai paraméterek és a módszer analitikai tulajdonságai alapján választanak diagnosztikai határértéket (Caraguel és mtsai 2011). Ebben az esetben lehetséges pl. a kimutatási határnak megfelelő C_q értéket határértékként kijelölni. Az így kijelölt C_q értéknél magasabbak nem tekinthetők megbízhatónak (Caraguel és mtsai 2011).

CÉLKITŰZÉSEK

(1) Célunk volt az *Ampelomyces* nemzetségbe tartozó 120 törzs négy lókuszának szekvenciáival molekuláris filogenetikai vizsgálatokat végezni és ezek alapján olyan csoportokat (kládokat) elkülöníteni, amelyek formálisan leírható fajok lehetnek, valamint az általunk elkülönített kládokban az *Ampelomyces*-törzsek gazdagomba-asszociációját vizsgálni.

(2) Az *Ampelomyces*-törzsek gazdagombáikban, valamint lizsthatmentes környezetben való megfigyelésének megkönnyítése érdekében célunk volt két *Ampelomyces*-törzs GFP génnel való transzformációja, a transzformánsok vad típusal való összehasonlítása, valamint annak tesztelése, hogy a szelektált transzformánsokban a GFP expressziója a mikoparazitizmus során is stabilan fennmarad-e.

(3) Célunk volt, hogy a GFP-t expresszáló transzformánsokkal funkcionális kísérleteket végezzünk, melyek során megvizsgáljuk, hogy (i) mennyi ideig képesek a transzformánsok lizsthatmentes leveleken túlélni, (ii) mi történik a kialakult *Ampelomyces*-struktúrákkal, amikor a lizsthatmattal fertőzött levelek szeneszccens fázisba kerülnek, és (iii) a transzformánsok mutatnak-e bármilyen szaprotróf növekedést talajon.

(4) Az *Ampelomyces* spp. funkcionális genetikai vizsgálatainak megalapozása érdekében célunk volt annak tesztelése, hogy lehetséges-e ezekben a gombákban a homológ rekombináción alapuló génkiütés megvalósítása. Ehhez célul tűztük ki a nitrát-reduktáz gén kiütését egy *Ampelomyces*-törzsben, a transzformánsok különböző nitrogénforrású táptalajokon mutatott fenotípusának vizsgálatát és annak tesztelését, hogy a gén kiütése hatással van-e a transzformánsok mikoparazita képességére.

(5) Célunk volt egy, az *Ampelomyces* spp. DNS alapú detektálására alkalmas qPCR-módszer diagnosztikai határértékének meghatározása, amely alapján a tesztelt mintáról eldönthető, hogy tartalmaz-e *Ampelomyces* DNS-t.

ANYAG ÉS MÓDSZER

AMPELOMYCES-TÖRZSEK MOLEKULÁRIS FILOGENETIKAI VIZSGÁLATA

Ampelomyces-törzsek izolálása és DNS-izolálás Ampelomyces-törzsekből

A Liang és munkatársai (2007) által leírtak szerint öt új *Ampelomyces*-törzset izoláltunk steril üvegtű és sztereomikroszkóp segítségével, azzal a különbséggel, hogy a gombákat 2% malátát tartalmazó Czapek-Dox agarra (MCzA) oltottuk. A munka során felhasznált többi 115 törzs nagy részét korábban izolálták laboratóriumunkban (Kiss & Nakasone 1998, Szentiványi és mtsai 2005, Kiss és mtsai 2011, Pintye és mtsai 2012, Tollenaere és mtsai 2014), néhányat pedig nemzetközi törzsgyűjteményekből szereztük be (CBS, ATCC, KACC). Az *Ampelomyces*-törzseket MCzA táptalajon tartottuk fenn (pl. Legler és mtsai 2016). A vizsgálatainkba vont törzsek származási helyét és izolálásának időpontját tartalmazó táblázat megtalálható a függelékben (F1. táblázat).

A törzsek kb. négyötöd részéből rendelkezésre álltak korábbi munkák (Kiss és mtsai 2011, Pintye és mtsai 2012) során készített DNS-kivonatok. Amelyik törzsből nem állt rendelkezésre DNS, a DNS-izoláláshoz liofilizált telepdarabokból indultunk ki, ebben az esetben egy cetil-trimetil-ammónium-bromidot (CTAB) és kloroformos tisztítást alkalmazó módszert követtünk (Cubero és mtsai 1999). Az újonnan izolált törzsekből való DNS-izoláláshoz kéthetes telepekből kivágtott, kb. 6-8 x 6-8 mm-es telepdarabokból indultunk ki. A DNS-izolálást a nátrium-dodecil szulfátot (SDS) alkalmazó módszerrel végeztük (Edwards és mtsai 1991).

Négy lókus szakszakainak felszaporítása és szekvenálása Ampelomyces-törzsekből

A nukleáris riboszomális RNS (rRNS) régiójának ITS, valamint az *ACT1* gén és az RNS-polimeráz II legnagyobb alegységét kódoló gén (*RPB1*) szakaszainak amplifikálásához használt PCR összetétele az alábbi volt: 2 µl DreamTaq Buffer, 0,5 µl dNTP Mix (10 mM, Thermo Fisher Scientific), 0,8 U DreamTaq DNA Polymerase, 1-1 µl *forward* és *reverse* primer (10 µM; Sigma-Aldrich) és 2 µl DNS-kivonat, valamint 20 µl-es végtérfogathoz szükséges mennyiségű molekuláris biológiai tisztaságú víz (Thermo Fisher Scientific). Az ITS felszaporítására használt PCR protokoll a következő volt: denaturáció 94°C-on 5 percig, majd 35 cikluson át 94°C 45 mp, 55°C 45 mp és 72°C 1 perc, a reakció végén 72°C-on inkubáció 10 percig. Ezekben a reakciókban az ITS1F (Gardes & Bruns 1993) és ITS4 (White és mtsai 1990) primereket használtuk. Az *ACT1* felszaporításához az Act-1 és Act-5ra (Voigt

& Wöstemeyer 2000) primereket és következő protokollt használtuk: 98°C 5 percig, majd 35 ciklusban 98°C 30 mp, 54°C 1 perc és 72°C 1 perc, a reakció végén pedig 72°C-on 5 perc. Az *RPBI* egy szakaszának felszaporításához a következő PCR protokollt követtük: 95°C 10 perc, ezt követően 35 cikluson keresztül 95°C 10 mp, 52°C 30 mp és 72°C 1 perc 30 mp, a reakció végén pedig 72°C-on 7 perc (Schoch és mtsai 2012). A reakciókban az *RPBI*-Af (Stiller & Hall 1997, Schoch és mtsai 2012) és az *RPBI*-Cr (Matheny és mtsai 2002, Schoch és mtsai 2012) primereket használtuk. Az *ITS* és *ACT1* reakciókat három, az *RPBI* reakciókat pedig négy párhuzamos, csövenként 20 µl-es végtérfogatú reakcióban futtattuk. A párhuzamos reakciók használatával kiküszöbölhetők a DNS-polimerázok működése közben esetlegesen okozott másolási hibák (Kovács és mtsai 2008). Az *RPBI* felszaporítása során négy reakció volt szükséges ahhoz, hogy megfelelő mennyiségű PCR terméket kapjunk a további lépésekhez.

A reakcióban keletkezett termékeket 1,5%-os agaróz gélen való futtatás után, GelRed DNS festékkel (Biotium) való festést követően, GelDoc-It (UVP) eszközzel való UV megvilágítással tettük láthatóvá. A keletkezett *ITS* és az *ACT1* terméket közvetlenül használtuk fel és az E.Z.N.A. Cycle Pure Kit vagy az E.Z.N.A. MicroElute Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek) felhasználásával tisztítottuk a gyártói protokoll szerint. Az *RPBI* PCR-ek során több termék is keletkezett; e termékek közül a körülbelül 1 kilobázis (kb) méretű fragmentet az agaróz gélen való futtatás után kivágtuk és a GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) felhasználásával tisztítottuk.

Az *RPBI* PCR-ben kapott melléktermékek elkerülése érdekében a következő *touchdown* PCR (Korbie & Mattick 2008) protokollt alkalmaztunk: 98°C 2 perc, majd 15 cikluson keresztül 98°C 10 mp, 73°C-on, majd minden ciklusban egy fokkal alacsonyabb hőmérsékleten 20 mp, majd 72°C-on 13 mp. Ezt 25 további ciklus követte, 98°C 10 mp, 55°C 20 mp, 72°C 15 mp. Ezekben a reakciókban a következő összetételt alkalmaztuk, 20 µl végtérfogatban: 4 µl Phusion HF Buffer, 0,5 µl dNTP Mix (10 mM), 0,4 U Phusion DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 1-1 µl *forward* és *reverse* primer (10 µM) és 2 µl DNS-kivonat, valamint 20 µl-es végtérfogathoz szükséges mennyiségű molekuláris biológiai tisztaságú víz. Ennek a *touchdown* PCR eljárásnak a segítségével a legtöbb esetben elkerülhető volt a PCR termék gélből való izolálásának szükségessége. Ezt a módszert az újonnan izolált törzsek *RPBI* szakaszának felszaporításához használtuk fel.

A tisztított PCR termékekből és a gélből tisztított termékekből 2 µl-t használtunk fel a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kittel (Applied Biosystems) való szekvenálásra, a

gyártói protokoll szerint. Az elkészült termékeket 42 µl izopropanollal kicsaptuk, ezt követően 12 800 rpm-mel centrifugáltuk, 150 µl 80%-os etanollal mostuk, majd centrifugáltuk 10 percig és a felülúszót eltávolítottuk. A szekvenálási reakció termékeinek kapilláris elektroforézisét a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának szolgáltató laboratóriumában végezték.

A nitrát-reduktáz (*EukNR*) amplifikálására alkalmas *Ampelomyces*-specifikus primereket (niaD31F és niaD32R) Markus Gorfer (AIT Austrian Institute of Technology, Tulln, Ausztria) tervezte. Előbb hat (*Vitis*15, RS1-a, AQ10, B124-a, 9031A-a, *Vitis*66), összesen négy különböző kládba tartozó *Ampelomyces*-törzsből a tömlősgombákban általánosan működő, két lépéses, nested PCR protokoll (Gorfer és mtsai 2011) szerint meghatározta a nitrát-reduktáz gén egy szakaszának szekvenciáját, majd az így kapott szekvenciák konszenzusa alapján tervezte az új primereket. A többi törzsből, a Pintye és munkatársai (2012) által negyedik kládnak nevezett klád tagjait leszámítva (ld. lentebb) ezen újonnan fejlesztett primerekkel szaporítottuk fel a szakaszt. A reakciókban GoTaq G2 Green Master Mixet (Promega), és a következő PCR protokollt használtuk: 95°C 2 perc 30 mp, majd 35 cikluson keresztül 94°C 30 mp, 60°C 20 mp és egy perc 72°C-on. A reakciók összetétele: 22,5 µl GoTaq G2 Green Master Mix, 2,25-2,25 µl primer, 1 µl DNS kivonat és molekuláris biológiai tisztaságú víz, összesen 45 µl térfogatban. A négyes kládba tartozó törzsek esetén az újonnan tervezett primerpár nem volt használható, így az említett nested PCR protokollt alkalmaztuk. Az első reakció termékét tízszeres térfogatra hígítottuk molekuláris biológiai tisztaságú vízzel és ebből a második reakcióban 1 µl-t használtunk fel templátként. Az amplifikált *EukNR* termékek szekvenálását az LGC Genomics GmbH (Berlin, Németország) szolgáltató laboratóriumában végezték. Az ebben az alfejezetben említésre került primereket az 1. táblázat foglalja össze.

Mindkét módszer esetén az ampikonok szekvenálása két irányból, a PCR-ekben használt primerekkel történt. A kapott kromatogramokat manuálisan ellenőriztük és ezekből a Pregap4 és a Gap4 (Staden és mtsai 1998) szoftverek felhasználásával nyertük ki a szekvenciákat.

Az újonnan meghatározott *EukNR* szekvenciák alapján egy új primert (niaD31F-alt; 2. táblázat) terveztünk a SnapGene Viewer szoftverrel (4. verzió; GSL Biotech), hogy a GYER törzsből a gén egy egyszerű PCR-ben való felszaporítása lehetséges legyen (ld. lentebb), nested PCR nélkül.

1. táblázat. Az *Ampelomyces* spp. négy lókuszos fragmentjeinek felszaporításához és szekvenálásához használt primerek listája.

primer jelölése	irányultsága	szekvencia (5'→3')	felszaporított szakasz	szakasz mérete	hivatkozás
ITS1F	<i>forward</i>	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS	~600 bp	Gardes & Bruns 1993 White és mtsai 1990
ITS4	<i>reverse</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
Act-1	<i>forward</i>	TGGGACGATATGGAIAAIATCTGGCA	<i>ACT1</i>	~950 bp	Voigt & Wöstemeyer 2000
Act-5ra	<i>reverse</i>	TTAGAAGCACTTNCGGTG			
RPB1-Af	<i>forward</i>	GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	<i>RPB1</i>	~850 bp	Schoch és mtsai 2012
RPB1-Cr	<i>reverse</i>	CNGCDATNTCRTRTCCATRTA			
niaD01F	<i>forward</i>	GTNTGYGCNGGNAA	<i>EukNR</i> (általános)	~1050 bp	Gorfer és mtsai 2011
niaD04R	<i>reverse</i>	GTNNGRTGYTCRAA			
niaD15F	<i>forward</i>	GGNAAYMGNMGNAARGARCARAA	<i>EukNR</i> (általános; nested)	~990 bp	Gorfer és mtsai 2011
niaD12R	<i>reverse</i>	AACCANGGRTTRTTCATCATNCC			
niaD31F	<i>forward</i>	CCGTCAGAAAGAGTAAAGGGTTT	<i>EukNR</i> (<i>Ampelomyces</i> spp.)	~950 bp	Németh és mtsai 2019
niaD32R	<i>reverse</i>	CAATACACTCCAGTACATGTCACG			

Molekuláris filogenetikai elemzések

A korábbi munkákból származó ITS és *ACT1* szekvenciákat a GenBank adatbázisból nyertük ki, ezek azonosítóit a függelék (F1. táblázat) tartalmazza.

Az elemzéseink külsőportjaként két taxont jelöltünk ki. Egyik az ATCC38616 jelölésű *Phoma glomerata*-törzs, melyet korábban *Ampelomyces humuli*-ként tartottak számon, azonban egyértelműen kiderült, hogy nem tartozik az *Ampelomyces* nemzetségbe (Szentiványi és mtsai 2005). A másik a JCM15942 jelölésű *Phoma herbarum* törzs (Hamada & Abe 2009). Az első törzs esetében az *Ampelomyces*-törzseknél is használt, fent részletezett módszerekkel végeztük a szekvenciák meghatározását. A *Ph. herbarum* ITS-szekvenciáját a GenBank-ból nyertük ki (AB456575; Hamada & Abe 2009), a másik három lókuszt szekvenciáját pedig a törzs publikusan elérhető genomi adataiból¹ BLAST (Altschul és mtsai 1990) kereséssel az RS1-a törzs megfelelő szekvenciáival, az *ACT1* szakasz homológját blastn, az *RPBI* és *EukNR* homológjait tblastx algoritmust alkalmazva. Minden egyéb beállításként alapbeállításokat használtuk. A genomban való keresés egy *ACT1* találatot eredményezett; a másik két esetben a legnagyobb hasonlóságot mutató homológot mentettük ki.

A szekvenciákat az online MAFFT 7-es verziójával (Kato & Standley 2013) illesztettük; az ITS-szekvenciákat E-INS-i, a többi FFT-NS-i algoritlussal, ezen kívül alapbeállításokat használva. Az illesztések elején és végén a néhány törzsnél hiányzó nukleotidpozíciókat ismeretlen karakterekként (kérdőjelként) kódoltuk a MEGA7 (Kumar és mtsai 2016) programban. Az ITS és az *EukNR* adatsoron az inzerció-deléción (a továbbiakban in-del; ezek az illesztésben *gap*-ként jelennek meg) pozíciók kódolását a FastGap 1.2 (Borchsenius 2009) programmal végeztük, amely az illesztésben található in-del motívumokat bináris karakterekként kódolja (Löytynoja & Goldman 2008). A keletkező bináris karaktermátrixot hozzáadtuk az ITS illetve *EukNR* adatsorokhoz, mivel az in-del adatok elemzésbe vonása javíthatja a filogenetikai elemzések eredményeinek megbízhatóságát (Nagy és mtsai 2012). A másik két lókuszt (*ACT1* és *RPBI*) illesztései 2 illetve 3 in-del-motívumot tartalmaztak, ezért ezeket nem vontuk be az elemzésbe.

A végleges ITS adatsor 529 karakter hosszúságú, beleértve a 28 bináris (in-del) karaktert. Az *ACT1* illesztés 783, az *RPBI* 718 karakter hosszúságú, míg az *EukNR* illesztést 903 karakter alkotja, amelyből 11 bináris karakter. Az adatsorokat deponáltuk a TreeBASE adatbázisba (ID 24422).

¹ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_001599375.1

A kombinált multilókuszos elemzésekhez egy egyesített adatsort állítottunk elő, amely az ITS, *ACT1*, *RPB1*, *EukNR* nukleotid-illesztéseiből és az ITS és az *EukNR* in-del bináris adatokból tevődött össze. A teljes adatsor hossza 2933 karakter volt, amelyből 39 az in-del karakter. A *maximum likelihood* (ML) alapú filogenetikai vizsgálatot a raxmlGUI 1.5 (Silvestro & Michalak 2012, Stamatakis 2014) szoftverrel végeztük, GTR + G (nukleotidoknál) illetve BINGAMMA (bináris adatok esetén) szubsztitúciós modellek felhasználásával, az egyes lókuszosoknak és a karaktertípusoknak megfelelő partíciók beállítását követően. Tíz ML futtatás történt és a kládok támogatottságait 1000 (*thorough bootstrap*) ismétlésből számítottuk. A Bayes-statisztikán alapú elemzést a MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) szoftverrel végeztünk. Az elemzésben a paraméterbecsléseket az egyes partíciókra külön-külön végeztettük el. A nukleotidokhoz GTR + G, a bináris adatokhoz két paraméteres Markov-modellt (Mk, k = 2) állítottunk be. Két Markov-láncot futtattunk, egyenként 10 millió generációig. Minden ezredik fát mentettük el és az első 4 000 fát nem vettük figyelembe a fák összegzésénél (*burn in*).

Két további elemzést is futtattunk, a fent leírtak szerint. Ezekhez az említett egyesített illesztésből indultunk ki, azonban a legtöbb törzset tartalmazó kládba (klád A, ld. Eredmények) illeszkedő törzsek számát 21-re csökkentettük, a taxonmintázás kiegyensúlyozottabbá tétele érdekében. A többi kládba tartozó törzsek változtatás nélkül maradtak az illesztésben, az elemzésekben részt vevő törzsek száma így 87 volt (beleértve a két kulcsoport-taxont is).

Az ML analízisekben kapott legvalószínűbb fákat és Bayes elemzésben kapott 50%-os többségi konszenzus fát a MEGA7 (Kumar és mtsai 2016) és a TreeGraph 2.13.0 (Stöver & Müller 2010) programokkal jelenítettük meg és szerkesztettük.

AMPELOMYCES-TÖRZSEK TRANSZFORMÁCIÓJA ATMT MÓDSZERREL ÉS A TRANSZFORMÁNSOK JELLEMZÉSE

Az ATMT során használt Ampelomyces-törzsek

Egy korábbi munka (Legler és mtsai 2016) során tesztelték laboratóriumunk 33 *Ampelomyces*-törzsét, vizsgálva azok táptalajon való növekedését, sporulációját és mikoparazita képességét a szőlőlisztharmatot okozó *E. necator* fajjal szemben. A transzformációhoz e törzsek közül kettőt, az RS1-a és a GYER törzseket választottunk ki. Az RS1-a törzset egy, a *Rosa*-fajokat is fertőző lisztharmatgombából (*Podosphaera pannosa*), a GYER törzset gyertyánlisztharmatból (*Erysiphe arcuata*) izolálták (Kiss és mtsai 2011). Az előbbi törzsre azért esett a választás, mert a teszteltek közül a legjobb mikoparazita képességgel rendelkezett és megbízhatóan sporulál táptalajon (Legler és mtsai 2016). A GYER törzset azért vontuk be a kísérleteinkbe, hogy egy másik *Ampelomyces* genotípuson is teszteljük a transzformációs módszert. A törzseket MCzA táptalajon tartottuk fenn, 40-60 naponta új lemezre oltva.

A transzformánsokkal végzett mikoparazita kísérletekben használt lisztharmatok

A mikoparazita tesztekben (ld. lentebb) a következő öt lisztharmatgombafajt használtuk, amelyeket cserépben a következő gazdanövényeiken tartottunk fent üvegházi körülmények (22°C, 16 órás megvilágítás) között: *E. necator* szőlőn (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay), *P. xanthii* uborkán (*Cucumis sativus* cv. Rajnai Fürtös), *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* árpán (*Hordeum vulgare* MW08-16), *Pseudoidium neolycopersici* paradicsomon (*Solanum lycopersicum* cv. Kecskeméti Jubileum), és *Leveillula taurica* paprikán (*Capsicum annum* cv. Totál). A szőlőnövények az üvegházban folyamatosan új leveleket hoznak; a többi gazdanövény esetében 3-6 hetente, tözeges szubsztrátba (Pindstrup) újonnan vetett gazdanövények biztosításával történt a kórokozók fenntartása, amelyeket az adott lisztharmatokkal megfertőztünk.

Ampelomyces-törzsek transzformációja ATMT-módszerrel

A transzformánsok szelekciójához higromicin B-t (hB; Sigma-Aldrich) használtunk (ld. lentebb), ezért elsőként azt állapítottuk meg, hogy mely koncentrációban gátolja ez a fungicid a vad típusú törzsek növekedését. A hB-t a következő koncentrációkban adagoltuk malátakivonat-agar (MEA; Sigma-Aldrich) táptalajhoz: 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l és 100 mg/l. Mindegyik hB koncentrációt tartalmazó táptalajra ráoltottuk a vad típusú törzsek 5 mm-es telepét, törzsenként három ismétlésben. A tesztet kétszer végeztük el. A teszt eredményei alapján az 50 mg/l-es hB koncentráció teljesen megakadályozta a gombák növekedését, ezért a későbbiekben a szelekció során ezt a koncentrációt alkalmaztuk.

Az RS1-a és a GYER törzsek transzformációját korábban közölt protokollok (Hanif és mtsai 2002, Gorfer és mtsai 2007) alapján végeztük, a következők szerint: 9 cm átmérőjű MEA táptalajra helyezett celofánra oltottuk a törzsek 15-20 telepdarabját (kb. 2-4 mm x 2-4 mm). Törzsenként öt ilyen lemezt készítettünk; a gombákat négy napig 23°C-on növesztettük sötétben, majd a celofán felemelésével az összes telepet egyszerre Moser indukciós táptalajt (MoserIND; Gorfer és mtsai 2007) tartalmazó lemezekre helyeztük át.

A transzformációhoz a *Rhizobium radiobacter* (korábbi, és a gyakorlatban elterjedtebb néven *Agrobacterium tumefaciens*) AGL1 (Lazo és mtsai 1991) jelölésű törzsét használtuk, amely a pCBCT (Gorfer és mtsai 2007) plazmidot hordozta. A vektor az *SGFP* gént kódolja, amelytől 5' irányban (*upstream*) a *toxA* promóter (Lorang és mtsai 2001) helyezkedik el; és a *hph* gént, amely előtt 5' irányban a *trpC* promóter (Carroll és mtsai 1994) található. Mindkét promóter erős, konstitutív expressziót biztosít e két génnek (Lorang és mtsai 2001).

A baktériumokat egy éjszakán át 28°C-on, folyamatos keverés (180 rpm) mellett, 4 ml tripton-szója (Sigma-Aldrich) táplevest tartalmazó 30 ml-es műanyag csövekben növesztettük. A tápleves 50 µg/ml kanamicint (Duchefa Biochemie) tartalmazott, amely biztosítja a pCBCT plazmid baktériumsejtekben való megtartását. A növesztés után a tenyészeteket kilenc percig centrifugáltuk 3 800 g-vel, a táplevest leöntöttük, és a sejteket *Agrobacterium* indukciós táplevesben (AtIND; Gorfer és mtsai 2007) szuszpendáltuk. Az indukcióhoz (a transzformációhoz szükséges gének expressziójának megindításához) 6 órán keresztül 180 rpm-mel ráztattuk a tenyészeteket 28°C-on, majd a szuszpenzióból lemezenként 450 µl-t pipettáztunk a MoserIND táptalajra helyezett gombatenyészetekre. Ezeken a lemezekon a két organizmust négy napig együtt tenyésztettük, majd a celofán átemelésével a telepeket szelektív táptalajra helyeztük. A szelektív táptalaj (MEA, 9 cm átmérőjű Petri-csészékben) 50 mg/l hB-t és 100 mg/l cefotaximot (Duchefa Biochemie) tartalmazott. A

lemezeket sötétben, 22°C-on inkubáltuk 4-8 hétig, a gombatelepek növekedésének látható megindulásáig. A növekedésnek indult telepeket kék fényel (450-490 nm) világítottuk meg, és a zöld fluoreszcenciát mutató telepeket egyenként új, szelekciós táptalajt tartalmazó 6 cm-es átmérőjű Petri-csészékre oltottuk; ezeket a törzseket a továbbiakban transzformánsoknak tekintettük.

Az RS1-a transzformánsokból való monokonídiumos tenyészetek létrehozásához 1 ml, 50 mg/l kloramfenikolt (Duchefa Biochemie) tartalmazó vizet pipettáztunk a telepekre a konídiumok lemosásához, a szuszpenziót 10^4 - 10^6 -szor hígítottuk, majd 9 cm átmérőjű, MCzA táptalajt tartalmazó lemezekre szélesztettük. Hasonló műveletet végeztünk a GYER törzs transzformánsain, 100-szoros hígítással. Mivel ezek általában nem sporuláltak, a szélesztett hifadarabokból indult meg a gomba növekedése. Egy hét szobahőmérsékleten történő inkubáció után a kinövő telepeket külön-külön új MCzA lemezekre oltottuk, majd három hét múlva ismételten továbboltottuk. A telepek zöld fluoreszcenciáját folyamatosan ellenőriztük az átoltások között. Hét RS1-a és hat GYER transzformánst választottunk ki a további vizsgálatokhoz (5. táblázat). E 13 törzset 6-8 hetente új MCzA lemezre való átoltással tartottuk fenn. Az első három átoltás után a táptalajokhoz már nem adtunk hB-t, mivel a transzformánsok szelekciós ágens hiányában is megtartották a fluoreszcenciájukat (ld. Eredmények).

A transzformánsok T-DNS inzertjének kimutatása PCR módszerrel

A kiválasztott 13 transzformáns telepeiből egy CTAB-ot alkalmazó protokoll (Cubero és mtsai 1999) szerint, de a centrifugálás idejét 20 percre emelve izoláltunk teljes genomi DNS-t. A T-DNS beépülésének igazolására annak két fragmentjét szaporítottuk fel PCR módszerrel; a *hph* szakaszt a *hph*-F1 és *hph*-qR2, az *SGFP* szakaszt pedig a *GFPF* és *GFPR* primerekkel (2. táblázat). Az első primerpárt a pCBCT plazmid szekvenciája (Gorfer és mtsai 2007) alapján, a SnapGene Viewer szoftverrel (4. verzió; GSL Biotech) terveztük. Ezekben a reakciókban a Phusion High-Fidelity DNS polimerázt használtunk a gyártói ajánlott reakcióösszetételt (ld. fentebb) követve. A felhasznált PCR program a következő volt: 98°C denaturáció 2 percig, majd 35 ciklusban 98°C 10 másodpercig, 57°C (*hph* esetén) vagy 66°C (*SGFP* esetén), ezt követően anelláció 10 másodpercig és 72°C-on lánchosszabbítás 30 másodpercig; a ciklusok után 72°C további 5 percig. A reakciók összeállításakor készítettünk negatív (vizet tartalmazó) és nem-templát (a vad típusokból származó DNS-t tartalmazó) kontrollokat is. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük a fent leírtak szerint, majd

az LGC Genomics GmbH céghez küldtük szekvenálásra. A szekvenálás a *hph*-F1 és a GFPF primerekkel történt. A kapott szekvenciákat a MEGA7 (Kumar és mtsai 2016) programba integrált ClustalW algoritmussal, alapbeállításokkal illesztettük a pCBCT plazmid megfelelő szakaszainak szekvenciáihoz.

A transzformánsok inzert-kópiaszámának meghatározása

A transzformánsokba épült T-DNS kópiaszámának meghatározásához qPCR-t és komparatív Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) módszert (Livak & Schmittgen 2001) alkalmaztunk. Ez a módszer a kópiaszám-meghatározás legrobosztusabb módszere (Bubner & Baldwin 2004) és sikeresen alkalmazták gombák transzformánsainak jellemzésére is (Solomon és mtsai 2008). A módszer relatív mennyiségi meghatározáson alapul, amely során egy ismeretlen kópiaszámú szakasz mennyiségét hasonlítjuk egy ismert mennyiségű referenciagén mennyiségéhez.

Egy, az *Ampelomyces*-törzsek genomjában feltételezhetően egy kópiában megtalálható gén, az *EukNR* szekvenciájával BLAST (Altschul és mtsai 1990) keresést futtattunk a nyilvánosan elérhető *Ampelomyces* genomban² alapbeállításokkal. Ez a keresés egy találatot eredményezett, amely arra utal, hogy a gén egy példányban van jelen a szekvenált *Ampelomyces* genomban. Ennél fogva az *EukNR* gént, mint egy kópiában jelen lévő referenciagént használtuk a T-DNS kópiaszám-meghatározáshoz. Az inzert kópiaszámát mutató szakaszként a T-DNS *hph* génjét választottuk.

A kópiaszám-meghatározáshoz szükséges kontroll minta előállítása

A komparatív Ct módszerhez *in vitro* módszerrel állítottunk elő kalibrátor mintát, a következők szerint. A pCBCT plazmid *hph* gént tartalmazó szakaszát és az RS1-a ill. GYER törzsek *EukNR* génjének egy ~1 kb hosszúságú szakaszát a Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával szaporítottuk fel. Az előbbi reakciókban a trpCP02 és CB02 primereket használtuk; az *EukNR* felszaporításához a *niaD31F* (az RS1-a esetén; 1. táblázat) illetve a *niaD31F-alt* (a GYER esetén; 2. táblázat) és a *niaD32R* (1. táblázat) primereket. A 20 µl térfogatú, három párhuzamos csőben futtatott reakciók összetétele a következő volt: 10 µl Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 1-1 µl *forward* és *reverse* primer és 8 µl molekuláris biológiai tisztaságú víz. A PCR termékeket a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) felhasználásával tisztítottuk,

² <https://genome.jgi.doe.gov/Ampqui1/Ampqui1.home.html>

majd a *hph* fragmentet Fast DNA End Repair Kittel (Thermo Fisher Scientific) kezeltük, hogy az 5' végén foszforiláljuk, majd a foszforilált terméket ismételten tisztítottuk a QIAquick PCR Purification Kittel. A GYER illetve RS1-a *EukNR* fragmentek és a foszforilált *hph* fragment ligálását a Rapid DNA Ligation Kittel (Thermo Fisher Scientific) végeztük. A ligálási reakcióelegy 1 μ l-ét targetként használva a *trpCP02* és *niaD32R* primerekkel PCR-rel szaporítottuk fel a *hph_EukNR* fúziós terméket. A fragmentet 1%-os agaróz gélen való futtatás után a GenElute Gel Extraction Kittel (Sigma-Aldrich) tisztítottuk és a pJET1.2/blunt vektorba klónoztuk a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával. A keletkezett plazmidokat One Shot TOP10 kémiai kompetens *Escherichia coli* sejtekbe (Invitrogen) transzformáltuk. Az *E. coli* transzformánsokat 1,5% agar tartalmú LB táptalajra (Bertani 1951) való szélesztést követően 50 μ g/ml kanamicin (Duchefa Biochemie) jelenlétében szelektáltuk egy éjszaka alatt, 37°C-on. A szelektált baktériumtelepeken ún. direkt kolónia PCR-t végeztünk DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával, a pJET1.2 *forward* és *reverse* primerekkel az inzert jelenlétének igazolására. A direkt kolónia PCR-hez a reakciócsövekbe közvetlenül a telepről származó baktériumtömeget juttattuk templátként. A 20 μ l össztérfogatú reakciók összetétele a következő volt: 10 μ l DreamTaq Green PCR Master Mix, 0,4-0,4 μ l *forward* és *reverse* primer és 9,2 μ l molekuláris biológiai tisztaságú víz. A PCR program a következő volt: denaturáció 95°C-on 3 percig, majd 30 ciklus során 94°C 30 mp, 60°C 30 mp és 72°C 3 percig.

Egy-egy pozitív klónt választottunk ki a *hph* fragmentet az RS1-a törzs *EukNR* fragmentjéhez fuzionált, illetve a GYER törzs *EukNR* fragmentjéhez fuzionált darabokat hordozó klónok közül. Ezeket LB táplevesben növesztettük 37°C-on egy éjszakán át, majd a GenElute Plasmid Miniprep Kittel (Sigma-Aldrich) plazmidkivonatot készítettünk belőlük. A plazmidok előállításához használt PCR-ek, a DNS-fragmentek tisztítása, a foszforilálás, a ligálás, klónozás és a plazmidkinyerés során minden esetben a gyártói protokollt követtük. A keletkezett plazmidok molekulatömegét az inzert szekvenciája alapján számítottuk ki; a plazmidkivonatok töménységét Nanodrop 2000c spektrofotométerrel mértük meg. Ezekből az adatokból határoztuk meg a kivonatokban található plazmidok mennyiségét (Whelan és mtsai 2003). A plazmidkivonatokból kb. $5 \times 10^5 - 10^6$ db plazmid/ μ l töménységű oldatokat készítettünk és a qPCR mérésekben 1:1 *hph:EukNR* arányú kontrollként használtuk.

qPCR-mérések a transzformánsok kópiaszámának meghatározására

A qPCR mérésekhez a 13 kiválasztott transzformánsból a DNeasy Plant Mini Kittel teljes genomi DNS-kivonatot készítettünk. A qPCR-ben használt primereket a SnapGene Viewer szoftverrel terveztük. A *hph* gén felszaporításához használandó hph-qF2 és hph-qR2 primerek tervezéséhez a pCBCT plazmid szekvenciáját (Gorfer és mtsai 2007), az *EukNR* felszaporításához használandó qNR-F2 és qNR-R2 primerek tervezéséhez az RS1-a és GYER *EukNR* génjének korábban meghatározott szekvenciáit használtuk. A tervezett primereket az RS1-a A2 transzformáns genomi DNS-éből készült hígítási sorral (hígítatlan DNS, ill. 2x, 5x, 10x, 50x és 100x hígított össz-DNS) teszteltük a hatékonyság és a log-lineáris amplifikációt biztosító koncentrációtartomány meghatározására. A reakciókat mintánként három ismétlésben futtattuk, Bio-Rad CFX96 Touch C1000 qPCR gépben, 10 µl reakciótérfogatban. Az elegy csövenként 5 µl iTaq Universal SYBR Green Supermixet (Bio-Rad), 0,5-0,5 µl primert és 1 µl DNS kivonatot tartalmazott. A program következő volt: denaturáció 95°C-on 5 percig, majd 30 ciklusban 95°C 10 másodpercig, 59°C 10 másodpercig, és 72°C 30 másodpercig. A qPCR-ek során minden esetben negatív kontroll reakciót is összeállítottunk. A reakciók specificitását olvadásgörbe felvételével ellenőriztük. A két primerpár hatékonysága ~90% illetve ~89%-nak mutatkozott és a tesztelt hígított DNS-ek mindegyike a log-lineáris szakaszba esett (az illesztett egyenesek korrelációs együtthatói [R²]: 0,992 a *hph* és 0,998 az *EukNR* reakciókban). A fent részletezett PCR protokollt és reakció-összetételt használtuk a transzformánsok kópiaszámának meghatározására, a reakciókban 1 µl plazmidkivonatot, illetve a transzformánsok DNS kivonatainak 1 µl-ét targetként felhasználva. A transzformánsok T-DNS-ének kópiaszámát a komparatív Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) módszerrel (Livak & Schmittgen 2001) számítottuk ki a kapott adatokból. A transzformánsok molekuláris biológiai módszerekkel való jellemzéséhez és a klónozás során felhasznált primerek szekvenciái a 2. táblázatban találhatóak.

2. táblázat. A transzformánsok molekuláris módszerekkel való jellemzéséhez és a kalibrátorként használt plazmid előállításához használt primerek listája.

primer jelölése	irányultság	szekvencia (5'→3')	felszaporított szakasz	termék mérete	hivatkozás
hph-F1	<i>forward</i>	CGACGTCTGTCGAGAAGTTT	<i>hph</i>	~600 bp	Solomon és mtsai 2008 (HygF néven)
hph-qR2	<i>reverse</i>	ACGAGGTGCCGGACTTC			Cottenet és mtsai 2013 (Hph R néven)
GFPF	<i>forward</i>	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG	<i>GFP</i>	~600 bp	Sarrocco és mtsai 2006
GFPR	<i>reverse</i>	TTCTGCTGGTAGTGGTCGGC			
trpCP02	<i>forward</i>	GACAGAAGATGATATTGAAGGAGCAT	<i>hph</i>	~1,6 kb	Németh és mtsai 2019
CB02	<i>reverse</i>	GCCTGTATCGAGTGGTGATT			Gorfer és mtsai 2007
niaD31F	<i>forward</i>	CCGTCAGAAAGAGTAAAGGGTTT	<i>EukNR</i>	mindkét kombinációban ~900 bp	Németh és mtsai 2019
niaD31F-alt	<i>forward</i>	TCGTCCGAAAAGCAAAGGGTTT			
niaD32R	<i>reverse</i>	CAATACACTCCAGTACATGTACAG			
hph-qF2	<i>forward</i>	GCGCAGGCTCTCGATGA	<i>hph</i>	hph-qR2-vel 62 bp	Cottenet és mtsai 2013 (Hph F néven)
qNR-F2	<i>forward</i>	GACAAGGGAAAGTCATGGCG	<i>EukNR</i>	162 bp	Németh és mtsai 2019
qNR-R2	<i>reverse</i>	GAGTTCGGCAATAGCAATG			
qACT-F1	<i>forward</i>	TCCCTGTACGCCTCTGGTCG	<i>ACT1</i>	158 bp	-
qACT-R1	<i>reverse</i>	AAGATCTTCATGAGGTAGTCAGT			-

A GFP-transzformánsok telepmorfológiájának, mikromorfológiájának és szaprotróf növekedésének vizsgálata

A kiválasztott, összesen 13 RS1-a és GYER transzformáns (5. táblázat) telepmorfológiáját egyidős, MCzA táptalajon növekvő vad típusú törzsekkel hasonlítottuk össze. A transzformánsokat mikroszkóppal vizsgáltuk, hogy láthassuk, ha a transzformáció következtében szembevető változás történt azok morfológiájában.

A transzformánsok és a vad típusok szaprotróf növekedési képességének méréséhez és összehasonlításához a törzseket nyolc-nyolc ismétlésben MCzA táptalajra oltottuk, majd négy hétig 22°C-on növesztettük. Ezután a telepekről nagy felbontású fotókat készítettünk, és az ImageJ szoftverrel (Schneider és mtsai 2012) megmértük a keletkezett telepek felületét.

Transzformánsokkal és uborkalisztharmattal végzett mikoparazita tesztek

Az RS1-a törzs transzformánsaival mikoparazita teszteket végeztünk, hogy (i) ellenőrizzük, hogy a transzformánsok táptalajon látható fluoreszcenciája a mikoparazita folyamat során is megfigyelhető-e, illetve (ii) a mikoparazita képességük, azaz a lisztharmatgomba hifáiba való behatolási képességük, az intracelluláris növekedésük és az intracelluláris piknídiumaik kialakításának képessége megváltozott-e a transzformáció következtében. A kísérletekben az RS1-a vad típusú törzs szerepelt kontrollként. Mivel sem a GYER vad típus, sem pedig a GYER transzformánsok nem sporuláltak folyamatosan és megbízhatóan a munka során, ezekkel nem végeztünk inokulációs kísérleteket.

Az RS1-a telepekből konídium-szuszpenziót készítettünk a telepek 1 ml steril desztillált vízzel való lemosásával, majd 10^6 konídium/ml-es töménységre hígítottuk (Szentiványi és mtsai 2005). Ezt követően 0,05 v/v% végkoncentrációban Tween 20 felületaktív anyagot adtunk a szuszpenzióhoz. A szuszpenziókat uborkanövényeken sporuláló fiatal *P. xanthii* telepekre permeteztük. Az inokulált növényeket áttetsző fólia alatt tartottuk tíz napig, 80-90%-os páratartalmat biztosítva, napi 16 órás megvilágítás mellett 22°C-on. Törzsenként három növényt inokuláltunk; három további növényt vízzel inokuláltunk negatív kontrollként, amelyeket a szuszpenzióval inokulált növényekkel azonos körülmények között tartottunk, azoktól elkülönítve. Az inokulációhoz használt konídium-szuszpenzióból ~30 µl-t celofánt tartalmazó, 1,5%-os vizes agar lemezekre juttattunk és 24 órával később mikroszkóppal ellenőriztük a konídiumok csírázását (életképességét) és a GFP-expresszióját. Ehhez a lemezekre fekvő celofánból kivágtunk egy kb. 1 cm²-es darabot és egy csepp vízbe, tárgylemezre helyeztük, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Az inokulált

lisztharmattelepeket tíz nappal később mikroszkóppal vizsgáltuk meg a lent részletezett módszer szerint.

Mikroszkópos mintavétel és a mikoparazitizmus mikroszkópos megfigyelése

Az inokulált lisztharmattelepekből cellux ragasztóval vettünk mintát, majd egy csepp tárgylemezen lévő vízbe helyeztük és fedőlemez használata nélkül vizsgáltuk. Esetenként sztereómikroszkóp alatt üvegtűvel emeltünk le néhány, a parazitált lisztharmattelepekben képződött *Ampelomyces*-piknídiumot és az azokhoz kapcsolódó lisztharmat-struktúrákat, amelyeket egy csepp vízbe mostunk le és fedőlemezzel fedtünk le. A Zeiss Axioskop 2 Plus mikroszkóppal történt vizsgálatok során hagyományos, fáziskontraszt és differenciál interferencia kontraszt (DIC) megvilágításokat alkalmaztunk. A GFP fluoreszcens jelének vizsgálatához epifluoreszcens üzemmódot és a következő szűrőkkel felszerelt szűrőkockát használtuk: 450-490 nm-es gerjesztő szűrő, 495 nm-es szűrésű dikroikus tükör és 500-550 nm-es zárószűrő. A mintákról a Zeiss AxioCam ICc5 kamerával, a Zeiss ZEN 2011 szoftverrel (Carl Zeiss Microscopy GmbH) fotókat készítettünk. A képeken Adobe Photoshop programmal kismértékű szín- és kontrasztkorrekciókat végeztünk, a képi tartalom megváltoztatása nélkül.

A konfokális mikroszkópos (*confocal laser scanning microscopy*; CLSM) vizsgálatokhoz a fentebb leírtak szerint sztereómikroszkóp alatt üvegtűvel emeltünk le a lisztharmattelepekben képződött *Ampelomyces*-piknídiumokat. A CLSM vizsgálatokat Carl Zeiss 410 LSM mikroszkóppal vizsgáltuk. A mintákról két μm vastag rétegenként rögzítettük a képet és 10-20 különböző, z irányban egymás után felvett képet használtunk fel egy-egy projekció összeállításához. A mikroszkópos vizsgálat során a Vági és munkatársai (2014) által ismertett módszertant követtük. A projekciók elkészítését Vági Pál (Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Növény szervezettani Tanszék; Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet; jelenlegi munkahelye: Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Mikroszkóp Centrum) végezte.

A transzformánsok mikoparazita képességének mérése

Az RS1-a vad típus és az RS1-a transzformánsok mikoparazita képességének összehasonlításához egy korábban kifejlesztett módszert használtunk (Kiss és mtsai 2011). Ehhez a mikoparazita tesztek után a leveleket lepréseltük, majd törzsenként három uborkalevélről összesen kilenc véletlenszerűen kiválasztott, *Ampelomyces*-szel parazitált lisztharmattelepben sztereomikroszkóp alatt megszámláltuk a képződött intracelluláris piknídiumok számát egy 1,25 mm²-es felületen, majd a kapott értékeket 1 cm²-re számítottuk át.

Statisztikai elemzések

A munka során nyert adatokkal (a szaprotróf növekedési tesztben kapott telepfelület-méreték és a mikoparazita tesztben kapott piknídium-mennyiségek) való statisztikai elemzéseket Horváth Áron (Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet) végezte az IBM SPSS 16.0 szoftverrel. A mért adatok normalitásának és szóráshomogenitásának ellenőrzése Kolmogorov-Smirnov teszttel ill. Levene próbával történt. A transzformánsok és a vad típusok, mint kontroll törzsek esetén mért értékek Dunnett T3 post hoc teszttel kapcsolt egy irányú ANOVA vizsgálattal kerültek összehasonlításra. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. Az elemzés részletes adatai megtalálhatók a függelékben (F2. táblázat).

Mikoparazita tesztek GFP-transzformánsokkal más lisztharmatgombafajokban

A GFP-expresszió megfigyelése érdekében a *P. xanthii*-n kívül más lisztharmatgombafajokat is inokuláltunk az RS1-a törzs transzformánsaival. E fajok a következők voltak: *E. necator* szőlőn, *B. graminis* árpán, *Ps. neolycopersici* paradicsomon és *L. taurica* paprikán. A lisztharmattelepek inokulálása a fent leírtaknak megfelelően történt, legalább két ismétlésben. A különböző transzformáns–lisztharmat kombinációkat a 3. táblázat sorolja fel. A mintavétel és mikroszkópos feldolgozás is a fentiekben leírtaknak megfelelően történt. A munka során a B3 transzformánst a keletkezett piknídiumok üvegtűvel való táptalajra helyezését (Liang és mtsai 2007) visszaizoláltuk a parazitált lisztharmattelepből. A fentebb leírtak szerint ellenőriztük a visszaizolált telepek hB rezisztenciáját és a GFP-expresszióját is.

3. táblázat. Az RS1-a *Ampelomyces*-törzs különböző transzformánsaival és öt különböző lisztharmatgombafajjal végzett mikoparazita tesztek összefoglalása.

Transzformáns	Inokulált lisztharmatgombafaj
A2	<i>Podosphaera xanthii</i>
B3	<i>Blumeria graminis</i> , <i>P. xanthii</i> , <i>Leveillula taurica</i> , <i>Erysiphe necator</i> , <i>Pseudoidium neolycopersici</i>
C10	<i>B. graminis</i> , <i>P. xanthii</i>
E2	<i>P. xanthii</i>
F13	<i>P. xanthii</i>
G4	<i>Ps. neolycopersici</i> , <i>L. taurica</i> , <i>P. xanthii</i>
J1	<i>B. graminis</i> , <i>P. xanthii</i>

FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK GFP-EXPRESSZÁLÓ *AMPELOMYCES*-TÖRZSEKKEL

***Ampelomyces* konídiumok csírázása autoklávozott szubsztráton**

9 cm átmérőjű üveg Petri-csészébe 10 g virágföldet helyeztünk, majd lezárás után kétszer autoklávoztuk őket. Steril fülkében az RS1-a vad típus és a B3 és C10 transzformánsok konídium-szuszpenzióiból háromszor 100 µl-t pipettáztunk az autoklávozott virágföldre, majd a csészéket lezárva 22°C-on inkubáltuk őket 30 napig. Transzformánsokként három ilyen Petri-csészét készítettünk. A konídiumszuszpenzió készítését és az inokulum életképességének és a GFP fluoreszcenciájának ellenőrzését az előzőekben leírtak szerint végeztük. Hét és 30 nap elteltével kb. 0,5 g talajt emeltünk ki a Petri-csészékből, tárgylemezre helyeztük és mikroszkóppal, az előzőekben leírtak szerint vizsgáltuk. A kísérletet kétszer végeztük el.

***Ampelomyces* konídiumok csírázása lisztharmatmentes leveleken**

A következő kísérletet annak vizsgálatára állítottuk be, hogy az *Ampelomyces*-törzsek képesek-e a gazdagombájukkal való közvetlen kapcsolat nélkül túlélni, és ha igen, mennyi ideig. A fentebb leírtak szerint konídiumszuszpenziót állítottunk elő az RS1-a vad típusú törzsből és a C10 és G4 transzformánsokból. Ezek GFP-expresszióját és életképességét a fentebb ismertetett csírázási teszttel ellenőriztük. A két transzformáns és a vad típusú törzs konídium-szuszpenzióival inokuláltunk (i) 42 cserépben, tőzegen (Pindstrup) nevelt, három valódi levelet hozott uborkanövényt, amelyeket lisztharmatmentesen, fólia alatt neveltünk és a későbbiekben több különböző időpontban hatosával lisztharmattal inokuláltunk (ld. lentebb); (ii) hat további egészséges növényt, amelyeken a továbbiakban az *Ampelomyces*

lisztharmatmentes leveleken való növekedését figyeltük meg, és (iii) hat lisztharmattal előzőleg fertőzött növényt, amelyek pozitív kontrollként szolgáltak. Hat negatív kontrollként használt növényt vízzel inokuláltunk. A növényeket izoláltan tartottuk, átlátszó fóliaborítás alatt 25°C-on, 80-90%-os páratartalom és napi 16 órás mesterséges megvilágítás mellett.

Annak vizsgálatára, hogy az (i) pont szerint a levelekre juttatott *Ampelomyces*-törzs, ill. ennek két transzformánsa mennyi ideig képes a lisztharmatgomba kolonizációjára azután, miután bizonyos ideig a lisztharmattal való közvetlen kapcsolat nélkül a leveleken fennmarad, az inokulált növényeket különböző időpontokban fertőztük lisztharmattal. Az *Ampelomyces*-transzformánsokkal és a vad típusú törzsszel (és a kontroll esetén vízzel) való inokuláció után 4, 7, 10, 12, 14, 18 és 21 nappal később törzsenként hat növényt fertőztünk *P. xanthii* konídiumokkal. A lisztharmatinokulument használt telepeket külön nevelt, lisztharmattal fertőzött uborkanövények biztosították. Az inokuláció a konídiumok fertőzött levelekről egészséges levelekre való kijuttatásával történt. A friss lisztharmattalepeket tíz nappal az inokuláció után vizsgáltuk mikroszkóppal hagyományos megvilágítású, illetve DIC üzemmódban, a transzformánsok GFP-expresszióját pedig epifluoreszcens módban. A mikoparazita lisztharmatmentes leveleken való túlélésének megfigyeléséhez végzett inokulációk (ii) után 10, 14 és 21 nappal később, kezelésként és mintavételi időpontokként két levél kb. 2 x 2 cm méretű felületéről celluxszal vettünk mintát, majd a fent írtak szerint vizsgáltuk. A pozitív kontroll inokulációk (iii) során fertőzött lisztharmattalepeket tíz nappal az inokuláció után vizsgáltuk. E mintákban a kialakuló intracelluláris piknídiumokat figyeltük, amelyek megjelenése a sikeres inokulációt és az inokulum fertőzőképességét bizonyítja. A teljes kísérletet kétszer végeztük el.

Ampelomyces-törzsek potenciális szaprotróf növekedése a mikoparazita fázist követően elöregedő leveleken

E kísérletben azokat a parazitált lisztharmatos uborkaleveleket használtuk, amelyek az előző kísérletben pozitív kontrollként szolgáltak. A levelek *P. xanthii*-val fertőzött és *Ampelomyces* transzformánsok képleteit tartalmazó részeit kb. 2 cm²-es darabokra vágtuk és a növények tövébe helyeztük a cserepekben lévő talajra. A cserepeket izoláltan tartottuk és az uborkanövények igényének megfelelően, normál módon öntöttük. Három-hat naponta két-négy levéldarabot kiemeltünk a cserepekből és mikroszkóppal vizsgáltuk. A kísérletet kétszer végeztük el.

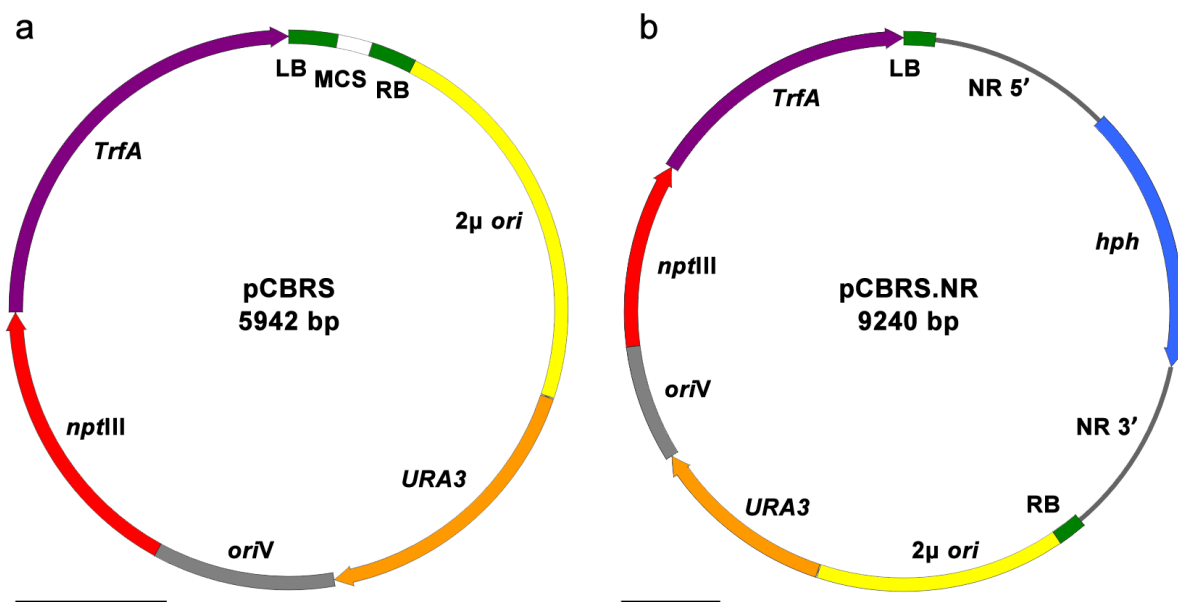
CÉLZOTT GÉNKIÜTÉS MEGVALÓSÍTÁSA AZ RS1-A *AMPELOMYCES*-TÖRZSBEN

Élesztő rekombinációs klónozásra használható általános shuttle vektor előállítása

A célzott génkiütés megvalósításához először egy általános, *E. coli*–*Agrobacterium*–élesztő *shuttle* vektort állítottunk elő. A vektort a pCB301 plazmid (Xiang és mtsai 1999) egy, és a pRS426 (Christianson és mtsai 1992) plazmid két darabjából állítottuk elő. Ehhez a pCB301 plazmid alapját (*backbone*) az URA3_CB07 és 2 μ _CB8 primerekkel, az élesztő 2 μ plazmidról származó replikációs origót, illetve az URA3 szelektációs markergént tartalmazó szakaszokat pedig a pRS426 plazmidról a CB8_2 μ és P1_rev ill. a P2_fwd és CB07_URA3 primerpárokkal szaporítottuk fel (4. táblázat). A keletkezett PCR termékeket 1:1:1 arányban összekevertük és ezzel transzformáltuk a *Saccharomyces cerevisiae* FY834 *ura*- genotípusú törzsét (Winston és mtsai 1995). A transzformációt általánosan használt, polietilén-glikolt és lítium-acetátot alkalmazó protokoll szerint (Gietz & Schiestl 2007) végeztük. A transzformánsok szelektója 2% agart tartalmazó, 9 cm átmérőjű lemezekben, uracilmentes táptalajon (26,7 g/l Minimal SD Base és DO Supplement-Ura, 0,77 g/l; Clontech), 4 napig tartó, 30°C-on sötétben való inkubációval történt. A vektor előállításához szükséges PCR-eket és az élesztő transzformálást Guofen Li PhD hallgató (AIT Austrian Institute of Technology, Tulln, Ausztria) végezte.

A transzformáció során egy telep keletkezett, amelyet 2 x 4 ml uracilmentes, az agart leszámítva a fentivel megegyező összetételű táplevesben egy éjszaka alatt, állandó 180 rpm keverés mellett 37°C-on felszaporítottunk, majd a GeneJET Plasmid Miniprep Kittel (Thermo Fisher Scientific) plazmidkivonatot állítottunk elő. Az izoláláshoz a gyártó protokollját követtük, azzal a módosítással, hogy a pufferekből minden esetben az ajánlott mennyiség dupláját használtuk. Kémiai kompetens *E. coli* sejteket állítottunk elő az Inoue és mtsai (1990) által közölt protokoll szerint, majd a plazmidkivonatból 30 ng-ot használtunk ezek 42°C-on 1 percig tartó hősokkal való transzformációjára. Az *E. coli* transzformánsokat 1,5% agar tartalmú LB táptalajon szelektáltuk 50 μ g/ml kanamicinnel egy éjszaka alatt, 37°C-on. A keletkező telepeken kolónia PCR-t végeztünk a GoTaq Green Master Mix (Promega) felhasználásával, az URA3_CB07 és 2 μ _CB8 primerekkel, melyek használata esetén a pozitív PCR (sikeres amplifikáció) a pCB301 plazmid vázának jelenlétét mutatja. Ettől eltekintve a PCR összetételében a gyártó utasításait követtük (12,5 μ l GoTaq Green Master Mix, 1,25-1,25 μ l 2 μ _CB8 és URA3_CB07 primer, 10 μ l molekuláris biológiai tisztaságú víz, végtérfogat összesen 25 μ l). A reakciókhoz egy *step down* PCR protokollt követtünk. Ez a

következő volt: 95°C 3 perc, majd 95°C 30 mp, 67°C 30 mp és 72°C 4 perc, ezt követően 3 ciklusban 95°C 30 mp, 65°C 30 mp és 72°C 4 perc, majd 3 ciklusban 95°C 30 mp, 63°C 30 mp és 72°C 4 perc. A *step down* szakaszt 35 ciklusig tartó 95°C 30 mp, 62,7°C 30 mp és 72°C 4 perc program követte. A reakciót 10 perces 72°C-on tartó inkubáció zárta. A pozitív kolóniák közül egy véletlenszerűen választottat 10 ml LB táplevesben egy éjszakán alatt 37°C-on, állandó 180 rpm keverés mellett felszaporítottunk. Ezt követően GeneJET Plasmid Miniprep Kit felhasználásával plazmidkivonatot állítottunk elő. A keletkező plazmid a pCBRS elnevezést kapta (1. ábra / a).



1. ábra. (a) A pCBRS *shuttle* vektor szerkezete. A plazmid mérete 5942 bp. (b) Az *Ampelomyces* RS1-a nitrát-reduktáz (*EukNR*) gén célzott kiütéséhez tervezett pCBRS.NR plazmid szerkezete. A plazmid mérete 9240 bp. A mércék 500 nukleotidnak megfelelő méretet jeleznek. Az ábrán szereplő rövidítések:

RB és LB: a T-DNS jobb és bal határoló szakaszai

MCS: multi-klónozó hely (*multiple cloning site*)

2μ *ori*: a plazmidok élesztőben való replikációjához szükséges replikációs origó

URA3: orotidin 5'-foszfát-dekarboxiláz szelekciós markergén

oriV: a plazmid baktériumokban való replikációjához szükséges replikációs origó

nptIII: a neomicin-foszfotranszferáz génje, szelekciós markergén

TrfA: a plazmid baktériumokban való replikációját indító fehérje génje

hph: higromicin-foszfotranszferáz szelekciós markergén

NR 5' és NR 3': az *EukNR* génnel szomszédos szakaszokkal homológ régiók.

A nitrát-reduktáz gén kiütésére alkalmas vektor előállítása

Az RS1-a törzs teljes EukNR génjének és annak szomszédos régióinak azonosítása

Annak teszteléséhez, hogy az *Ampelomyces*-törzsekben is lehetséges-e a homológ rekombináción alapuló célzott génkiütés megvalósítása, az *EukNR* gént választottuk kiütendő célgénként. Ehhez a saját RS1-a törzsünk egy együttműködés során megszekvenált genomjából (Szövényi Péter és mtsai; nem publikált adatok) származó szekvenciából indultunk ki.

A genomszekvenáláshoz 2 hetes, malátás Czapek-Dox táptalajon növesztett *Ampelomyces*-telepekből vontunk ki DNS-t CTAB protokollal (Cubero és mtsai 1999). A szekvenálás Illumina MiSeq platformon készült, kb. 12 millió tiszta, 250 bp hosszúságú, két irányból leolvasott szekvenciát (*paired end read*) eredményezett, amely kb. 48-szoros lefedettséget (*cover*) jelent. A genom szekvenálását, illesztését és a nitrát-reduktáz kódoló szakasz azonosítását Dr. Szövényi Péter (University of Zürich, Institute of Systematic Botany) végezte a következőkben ismertettek szerint. Az RS1-a *Ampelomyces*-törzs teljes nitrát-reduktáz génjét egy közel rokon (Crous és mtsai 2015) gombafaj, a *Parastagonospora nodorum* genomjában (Hane és mtsai 2007) található homológ, a *NIA1* gén felhasználásával nyertük ki a genomi adatokból. A *NIA1* gén termékének, a NIA1 fehérjének aminosav-szekvenciájával tBLASTn keresést futtattunk a szekvenciaadatainkon. A legmagasabb pontszámot (731 bits, *expect* = 0,0) kapott találat (a *scaffold_106* 38091 és 40311 nukleotidjai közötti régió) egy, a kereséshez használt proteinnel 81% hasonlóságot mutató fehérjét kódolt (348 aminosav egyezés a 425-ből). A kinyert fehérje szekvenciájával ellenőrzésként reciprok keresést futtattunk, amely eredményül a *Pa. nodorum* nitrát-reduktáz fehérjét adta. Ennek alapján a genomból kinyert szakaszt az RS1-a törzs nitrát-reduktáz kódoló génjeként azonosítottuk. A géntől 5' illetve 3' irányokban található 3 kb hosszúságú határoló szakaszokat a gén szekvenciájával együtt kimentettük az adatbázisból.

A kimentett genomi régiót (beleértve a génnel szomszédos régiókat) a SnapGene Viewer 3.3.1 (GSL Biotech) szoftver segítségével manuálisan annotáltuk a *Pa. nodorum* és a *Pyrenophora teres* f. *teres* homológ génjeinek (*NIA1* és *PTT_08192*; Ellwood és mtsai, 2010) és a szomszédos szakaszok szekvenciáinak felhasználásával, a MEGA7 (Kumar és mtsai 2016) ClustalW algoritmussal, alapbeállításokkal való illesztés alapján.

Az célzott génkiütésre használható vektor összeállítása

A célzott génkiütéshez használandó plazmid előállításához a pCBRS vektort használtuk vázként. Az egész plazmidot PCR-rel felszaporítottuk a BS03 és BS04 primerekkel (4. táblázat), Phusion High-Fidelity DNS-polimeráz felhasználásával, a gyártó által ajánlott reakció-összetételt követve (ld. fentebb), a következő programmal: 98°C 2 perc, majd 35 cikluson keresztül 98°C 10 mp, 57,5°C 20 mp, 72°C 3 perc, a reakció lezárásaként 72°C 5 perc. A reakció templájaként a pCBRS plazmid vízzel tízszeresre hígított kivonatát használtuk. Ennek a reakciónak az eredménye a pCBRS egy, a T-DNS határszakaszok között felnyitott változata; ezt a vázat más fragmentekkel együtt használtuk fel a génkiütés megvalósításához szükséges plazmid előállítására.

Az *EukNR* gént 5' (*upstream*) és 3' (*downstream*) irányban határoló, kb. 900 bp hosszúságú, feltételezhetően fehérjét nem kódoló szakaszok felszaporításához a Primer-BLAST (Ye és mtsai 2012) program alapbeállításával terveztünk primereket. A tervezett primerek 5' végére 30-35 bp hosszúságú, az egymáshoz klónozni kívánt szakaszok végeivel egyező szekvenciájú (átfedő) szakaszokat adtunk (4. táblázat), amelyek az élesztő rekombinációs klónozáshoz szükségesek (Oldenburg és mtsai 1997). A szakaszok PCR felszaporítását a Phusion High-Fidelity DNS polimeráz felhasználásával, az ismertett PCR protokollban a ciklusonkénti elongációs szakasz hosszát 30 mp-re csökkentve és a fent részletezett reakció-összetétellel végeztük, az RS1-a vad típusú törzs DNS-ét használva templákként.

A *hph* gént kódoló szakaszt a pCSN44 (Staben és mtsai 1989) plazmidból szaporítottuk fel a trpCP02 és a CT74T01 primerekkel (4. táblázat), a fent ismertett módon. A négy reakcióban keletkezett PCR termékeket (a pCBRS vektorról készült PCR terméket; az *EukNR* gént 5' illetve 3' irányból határoló szakaszokat és a *hph*-fragmentet) az E.Z.N.A. Cycle Pure Kittel tisztítottuk a gyártói protokollt követve. A termékek koncentrációját Nanodrop 2000c spektrofotométerrel határoztuk meg.

A tisztított termékeket ~1:1:1:1 molarányban összekevertük, majd a keverék 7 µl-ét használtuk a FY834 élesztő-törzs (Winston és mtsai 1995) transzformálására publikált protokoll (Gietz & Schiestl 2007) alapján. A transzformánsok szelekcióját 1,5% agart tartalmazó SD-CAA+W táptalajon végeztük. Ez a táptalaj megegyezik az SD-CAA (Wittrup & Benig 1994) táptalajjal (5 g/l kazaminsav, Roth; 20 g/l dextróz; 6,7 g/l aminosavmentes Yeast Nitrogen Base; 10,19 g/l Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 8,6 g/l NaH₂PO₄ x H₂O, Sigma-Aldrich), de az eredeti összetevőkön kívül a táptalajhoz 100 µM L-triptofánt is hozzáadtunk. Ennek

következtében az SD-CAA+W táptalaj a transzformáció szempontjából funkcionálisan azonos a fenti uracilmentes (a pCBRS előállításához használt élesztő-transzformációnál alkalmazott) táptalajjal.

A kinövő telepek közül 16 véletlenszerűen kiválasztottban kolónia PCR-rel ellenőriztünk a *hph* gén jelenlétét a trpCP02 és CT74T01 primerekkel, a feltételezhetően rekombináción átesett (egymáshoz fuzionált) szakaszok jelenlétét pedig az NR-5'-F és CT74T01 ill. a trpCP01 és NR-3'-R primerekkel (4. táblázat). Az utóbbi két primerpárban az egyik primer a *hph* génre, a másik primer pedig az 5', illetve a 3' szomszédos szakaszra kötődik. Az alkalmazott PCR protokoll a következő volt: 98°C 2 perc 30 mp, majd 35 cikluson át 94°C 20 mp, 50°C 20 mp és 72°C 1 perc; a reakciót 2 perc 72°C-on való inkubáció zárta. A mindhárom PCR-ben megfelelő méretű fragmentet adó klónt felszaporítottuk, majd a GenElute Plasmid Miniprep Kittel plazmidot tisztítottunk az előzőekben ismertetettek szerint. A kivonatokkal való *E. coli* transzformálás és szelekció, majd egy kiválasztott klónból való plazmidkivonat készítésének módszere megegyezett a pCBRS plazmid előállításához fentebb leírtakkal. A keletkező, a célzott géniütéshez előállított plazmid a pCBRS.NR (1. ábra / b).

Az előállított plazmidkivonatból a pCBRS.NR teljes, a T-DNS határszakaszok közötti régióját felszaporítottuk a NR-5'-F és NR-3'-R primerekkel a DreamTaq Green Mastermix felhasználásával (ld. fentebb; a PCR programban 53°C anellációt és 7 perces lánchosszabítást használtunk). A keletkezett PCR termékeket a korábbiakban leírtaknak megegyező módon a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kittel (Applied Biosystems) szekvenáltuk a NR-5'-F, NR-5'-R, trpCP02, CT74T01, NR-3'-F, NR-3'-R, ezeken kívül pedig a Z-hphF-rc és Z-hphR-rc primerekkel. Ez utóbbiak a Zeilinger (2004) által használt *hph* primerek *reverse* komplementált változatai. A szekvenálási reakció termékeinek kapilláris elektroforézisét a Szegedi Biológiai Kutatóközpont szolgáltató laboratóriumában végezték.

A plazmidok előállításának folyamatában és a kolónia PCR-ek során használt összes primer szekvenciája megtalálható a 4. táblázatban.

Az EukNR kiütésére alkalmas plazmid Agrobacterium-ba transzformálása és Ampelomyces transzformálás ATMT-val

A keletkezett pCBRS.NR plazmidot a *Rhizobium radiobacter* (*A. tumefaciens*) AGL1 (Lazo és mtsai 1991) törzsébe transzformáltuk egy elektroporációt alkalmazó protokoll szerint (Kámán-Tóth és mtsai 2018), ~100 ng plazmid-DNS felhasználásával. A transzformáns baktériumok szelekciójához a szuszpenziót 0,1% glükózt és 50 µg/ml kanamicint tartalmazó táptalajra szélesztettük és a lemezeket két napig 27°C-on inkubáltuk. A plazmid pozitív klónokban való jelenlétének kimutatásához steril fogpiszkáló segítségével a kolóniák egy-egy kis darabját 25 µl PCR tisztaságú vízbe juttattuk, 95°C-on inkubáltuk 10 percig, majd 3 percig centrifugáltuk 12 000 g-vel. A felülúszó 1 µl-ét használtuk templátként a PCR-ek során. A reakciókhoz a NR-5'-F és CT74T01 ill. trpCP02 és NR-3'-R primerpárokat (4. táblázat) és a DreamTaq Green Mastermixet használtuk a fentiekben leírtak szerint. Az első olyan klónt választottuk ki a későbbi gombatranszformáláshoz, amely mindkét PCR-ben pozitívnak mutatkozott.

Az *Ampelomyces* RS1-a törzsének transzformálását és a transzformánsok szelekcióját a pCBCT plazmiddal való transzformálásnál leírt protokollokat követve végeztük. A transzformánsok fenntartása, a törzsek DNS-izolálásához való tenyésztése és a DNS-izolálás szintén a pCBCT plazmiddal való transzformálásnál ismertetett módon történt. A szelekciót követően 20 független transzformáns törzset oltottunk szét, melyeket NRKO A-tól NRKO T-ig jelöltünk.

A célzott génkiütés igazolása és a transzformánsok molekuláris módszerekkel való jellemzése

Transzformánsok PCR-alapú genotipizálása

Az *Ampelomyces* transzformációt és szelekciót követően a potenciális *knock-out* törzsek igazolása három különböző primerpárral való PCR-ekkel történt, DreamTaq DNS-polimeráz felhasználásával. Egy *forward* illetve egy *reverse* primert terveztünk a célgéntől 5' irányban (*upstream*) található gén (a *Pa. nodorum* SNOG06021 génjének homológja) kódoló szakaszának 3' végére, illetve a 3' (*downstream*) szomszédos gén (a *Pa. nodorum* SNOG06023 homológja, a nitrit-reduktázt kódoló gén) kódoló szakaszának 5' végére, a SnapGene Viewer 3.3.1 szoftver felhasználásával. E két primert a T-DNS-en kötő két másik primerrel (Z-hphF-rc illetve Z-hphR-rc) használtuk párban (4. táblázat; 12. ábra / c). A

reakcióban a pCBRS.NR plazmid tiszta kivonatát használtuk pozitív, és az RS1-a vad típusú törzs DNS-ét nem templát kontrollként. A harmadik reakció során a 06021-01F és 06023-01R primereket használtuk párban. E reakciókban az RS1-a vad típusú törzs DNS-ét használtuk pozitív kontrollként. Mindegyik PCR-ben molekuláris biológiai tisztaságú vizet használtuk negatív kontrollként. A PCR protokoll a fentiekkel nagyrészt azonos volt, de az anellációs hőmérsékletet a második reakció esetén 55°C-ra emeltük. Az extenziós szakasz hossza az első két reakcióban 1 perc 30 másodperc, a harmadik PCR-ben 5 perc volt. Az amplikonokat az LGC Genomics GmbH céghez küldtük szekvenálásra. A szekvenálás azokkal a primerekkel történt, amelyet az egyes PCR-ek során is alkalmaztunk. A szekvenciák elemzése és a megfelelő referenciaszakaszokkal való összevetése a fentiekben leírtak szerint történt. Azokat a transzformánsokat tekintettük célzott génkiütésen sikeresen átesett transzformánsoknak, amelyek genomi DNS-éből mindhárom PCR-ben sikerült a megfelelő terméket felszaporítani.

A transzformánsok transzgén-kópiaszámának meghatározása

Ha az adott törzsekben sikeresen meg is valósult a célzott génkiütés, akkor sem lehet kizárni, hogy nem célzott, további T-DNS inzertek is beépültek a célorganizmus genomjába (Solomon és mtsai 2008). Hogy biztosak lehessünk benne, hogy a KO transzformánsokban csak egy kópiában található meg a T-DNS, kópiaszám-meghatározást végeztünk qPCR módszerrel. A *hph* gént egy kópiában tartalmazó (ld. Eredmények) RS1-a F13 és RS1-a A2 törzsek genomi DNS-ét használtuk kalibrátor mintaként; az *ACT1* gént választottuk egy kópiás belső kontroll génként. A qPCR-ben használt qACT-F1 és qACT-R1 primereket (2. táblázat) a SnapGene Viewer szoftver felhasználásával terveztük a vad típusú RS1-a törzs aktin (*ACT1*) szekvenciája alapján (JN621896; Pintye és mtsai 2012). A qACT-F1 és qACT-R1 primereket az RS1-a törzs genomi DNS-éből elkészített hígítási soron teszteltük (tömény DNS-kivonat, és 10x, 10²x, 10³x 10⁴x hígított DNS), hogy ellenőrizzük a qPCR log-lineáris koncentráció-tartományát és a hatékonyságát. A qPCR protokoll és a reakció-összetétel azonos volt a GFP-transzformánsok kópiaszámának meghatározásához használt reakciókéval. A primerpár hatékonysága ~95% volt és a tesztelt hígított DNS-ek mindegyike a log-lineáris szakaszba esett (az illesztett egyenes korrelációs együtthatója $R^2 = 0,999$). A transzformánsokba épült transzgének kópiaszámainak mérését és a számításokat a GFP-transzformánsoknál ismertetett módon végeztük.

4. táblázat. A pCBRS és a pCBRS.NR plazmidok előállításához és a pCBRS.NR plazmiddal transzformált *Ampelomyces*-törzsek genotipizálásához használt primerek listája. A szekvenciákban az aláhúzás az élesztő rekombinációs klónozáshoz a primerek 5' végéhez hozzáadott szakaszokat jelöli, amelyek egy másik (a leendő plazmidban szomszédos) fragment végével átfedő szakaszokat visznek be a PCR termékbe. A csillaggal jelölt primereket két különböző kombinációban alkalmaztuk (ld. a szövegben).

primer jelölése	irányultság	szekvencia (5' → 3')	felszaporított szakasz	termék mérete
URA3_CB07	forward	<u>TATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACTAACGCTCACCGGGCTGGTTG</u>	pCB301 vektor váz	~3,6 kb
2μ_CB8	reverse	<u>GTTCTACAAAATGAAGCACAGATGCTTCGTTTCTAGTGGACTGATGGGCTGCCTGTAT</u>		
CB8_2μ	forward	<u>ACCACTCGATACAGGCAGCCCATCAGTCCACTAGAAACGAAGCATCTGTGCTTCA</u>	pRS426 2μ origo	~1,4 kb
P1_rev	reverse	<u>AATAAAAAAAAAATGATGAATTGAATTGAA</u> GATCCAATATCAAAGGAAAT		
P2_fwd	forward	<u>CAATGCTATCATTTCTTTGATATTGGATCTTCAATTCAATTCATCATT</u>	pRS426 URA3	~1,1 kb
CB07_URA3	reverse	<u>GGCGAGGGCAACCAGCCCGGTGAGCGTTAGTTTTGCTGGCCGCATC</u>		
BS03	forward	CGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGC	pCBRS	~5,9 kb
BS04	reverse	ATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTC		
NR-5'-F	forward	<u>GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGACATCTGGGTGTCATCCGAC</u>	EukNR 5' szomszédos régió	~1 kb
NR-5'-R	reverse	<u>CAAAAAATGCTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTGCTATCGAGGACGGGTAGT</u>		
trpCP02	forward	GACAGAAGATGATATTGAAGGAGCAT	hph	~1,4 kb
CT74T01	reverse	GTTGGAGATTTAGTAACGTTAAGTGGAT		
NR-3'-F	forward	<u>CGGCCGATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACGGCACATGCTAGGAGATCAT</u>	EukNR 3' szomszédos régió	~1 kb
NR-3'-R	reverse	<u>CGAGGTGACGGTATCGATAAGCTTGATATTACGGAAGCAATGCTCAGAT</u>		
*06021-01F	forward	AAGAGAAGTTGCTTGGGTGA	EukNR 5' rekombináldott régió	~1,4 kb
Z-hphF-rc	reverse	CAGAACTTCTCGACAGACGTCCG		
Z-hphR-rc	forward	GATCCCCATGTGTACTACTGGC	EukNR 3' rekombináldott régió	~1,7 kb
*06023-01R	reverse	ATCGGTACAGGTTCCGCCAT		
*06021-01F	forward	AAGAGAAGTTGCTTGGGTGA	EukNR vagy a helyére beépült hph	~5,1 kb vagy ~3,5 kb
*06023-01R	reverse	ATCGGTACAGGTTCCGCCAT		

Egy nitrát-reduktáz-hiányos transzformáns mikoparazita képességének vizsgálata

Az NRKO B transzformánssal a GFP transzformánsoknál ismertetett módon végeztünk mikoparazita tesztekét uborkalisztharmattal és árpalisztharmattal. A mintavétel szintén a fentebb ismertetettek szerint történt. A kísérleteket kétszer végeztük el. Az uborkalisztharmattal végzett mikoparazita tesztet követően a mikoparazitizmus mértékét a fent ismertetett módon, piknídiumszámolással határoztuk meg. A vad típus és az NRKO B transzformáns esetén kapott adatsort *t*-teszttel hasonlítottuk össze $p < 0,05$ szignifikancia-szint mellett. Az NRKO B törzset a kísérlet végén visszaizoláltuk és hB tartalmú táptalajon növesztettük a fent leírtaknak megfelelően.

Az EukNR KO genotípus fenotipikus azonosítása táptalajos tesztben

A transzformánsok jellemzésére fenotípusos tesztet végeztünk öt KO (NRKO A, B, E, F és G) és két nem KO transzformáns (NRKO C és D) valamint a vad típusú RS1-a törzs bevonásával. Ehhez MCzA táptalajon aktívan nöövő, három hetes telepeket különböző táptalajokra oltottuk tovább, melyek a következők voltak: (i) minimál táptalaj (MM), a következő, Kaminskyj (2001) receptjén alapuló összetétel szerint: 10 g/l glükóz, 0,52 g/l KCl, 0,52 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 1,52 g/l KH_2PO_4 , 2 mg/l $Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$, 20 mg/l $CuSO_4 \times 5 H_2O$, 35,7 mg/l $FePO_4$, 36,4 mg/l $MnSO_4 \times H_2O$, 40 mg/l Na_2MoO_4 , 0,4 mg/l $ZnSO_4 \times 7 H_2O$, 20 g/l agar; ezen kívül kétféle nitrogéntartalmú adalékot tartalmazó minimál táptalaj: (ii) MM, benne 10 mM nátrium-nitrát ill. (iii) 10 mM alanin tartalmú MM. Két hét elteltével a telepekből 5 mm átmérőjű telepkorongokat vágunk ki és azonos, friss táptalajra helyeztük. A kísérletben 9 cm átmérőjű Petri-csészéket használtunk és Petri-csészénként az adott vad típusú törzs ill. transzformáns három telepdarabját helyeztünk el, egymástól kb. azonos távolságra. Mindegyik kombinációból két Petri-csészét készítettünk. A gombák telepmorfológiáját a friss táptalajra oltás után két hónappal vizsgáltuk meg. A fenotípusos tesztet kétszer végeztük el.

AZ *AMPELOMYCES*-DNS JELENLÉTÉNEK KIMUTATÁSÁRA ALKALMAS qPCR MÓDSZER DIAGNOSZTIKAI HATÁRÉRTÉKÉNEK MEGHATÁROZÁSA

Egy, a levéldarabok mintavételi területéről származó, 2013-ban izolált törzs ITS szakaszát Phusion High-Fidelity DNS polimeráz felhasználásával amplifikáltuk az ITS1F (Gardes & Bruns 1993) és az ITS4 (White és mtsai 1990) primerekkel. A reakció során a következő programot alkalmaztuk: kezdeti denaturáció 98°C-on 2 percig, majd 35 ciklusban 98°C 10 mp, 55°C 20 mp és 72°C-on történő lánchosszabbítás 21 mp-ig; a reakció végén 5 percig 72°C. A PCR terméket 1%-os agaróz gélen futtattuk, majd az Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche) felhasználásával gélből tisztítottuk, ezt követően 3' terminális adenzin hozzáadását (*tailing*) végeztük LC *Taq* polimerázzal (Thermo Fisher Scientific). A terméket pCRII-TOPO vektorba klónoztuk a TOPO TA Cloning Kittel (Life Technologies), a kolóniák közül a korábban ismertetett módon szelektáltunk és plazmidkivonatot állítottunk elő. Az inzertet az M13 *forward* primerrel szekvenáltattuk az előzőekben leírtak szerint. A fentiekben részletezett módszert követve 10^8 plazmid/ μ l koncentrációjú törzsoldatot, majd ebből 10^7 -től 10^2 *Ampelomyces*-ITS plazmid/ μ l tartalmú tízszeres hígítási sort készítettünk molekuláris biológiai tisztaságú vízzel.

Az együttműködő finnországi kutatócsoport által elküldött, laboratóriumunkba szállított lándzsás útifű (*Pl. lanceolata*) növényeket 16 órás megvilágítás mellett, 22°C-os izolált fülkében tartottuk. Ezek *P. plantaginis* lisztharmatgombával fertőzött leveleiből, illetve kontrollként izolált fülkében, lisztharmat- és *Ampelomyces*-mentes környezetben nevelt lándzsás útifű növények leveléből és gyökeréből izoláltunk DNS-t az E.Z.N.A. Plant DNA Kittel (Omega Bio-Tek), a gyártói protokollt követve. A növényi és a lisztharmat DNS-t is tartalmazó DNS-kivonattal hígítva egy második, 10^7 -től 10^2 *Ampelomyces*-ITS plazmid/ μ l tartalmú tízszeres plazmid hígítási sort készítettünk. A hígításhoz használt növényi és lisztharmat DNS-t is tartalmazó kivonat koncentrációja 8,8 ng/ μ l volt, amelyet Nanodrop 2000c spektrofotométerrel határoztuk meg.

Mindkét hígítási sor mintáival és a kontroll mintákkal qPCR méréseket végeztünk Bio-Rad CFX96 Touch C1000 qPCR gépben a következő összetétellel: összesen 10 μ l végtérfogat, ebből 5 μ l iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0,5 μ l 5 μ M-os primerek (AQ-F264, GATGAAGAACGCAGCGAAAT; és AQ-R462, GCTGCCAATTGCTTTGAGAT) és 1 μ l target DNS. Az alkalmazott qPCR program a következő volt: 10 percig tartó denaturáció 95°C-on, majd 40 ciklusig 30 sec 95°C, 30 sec

60°C és 30 sec 72°C, reakció végén 5 percig 72°C. A primerek tervezését, a reakcióösszetétel és qPCR program megállapítását a finnországi kutatócsoport végezte, és a munka során begyűjtött terepi mintákon is ezt alkalmazták (Tollenaere és mtsai 2014). Minden mintát három technikai ismétlésben mértünk, az ismétlésekben kapott értékeket a további számítási lépések előtt átlagoltuk. A reakciókban DNS-mentes és plazmidot nem tartalmazó minták szolgáltak negatív, illetve nem templát kontrollként. A méréseket kétszer végeztük el, függetlenül készített hígítási sorok felhasználásával.

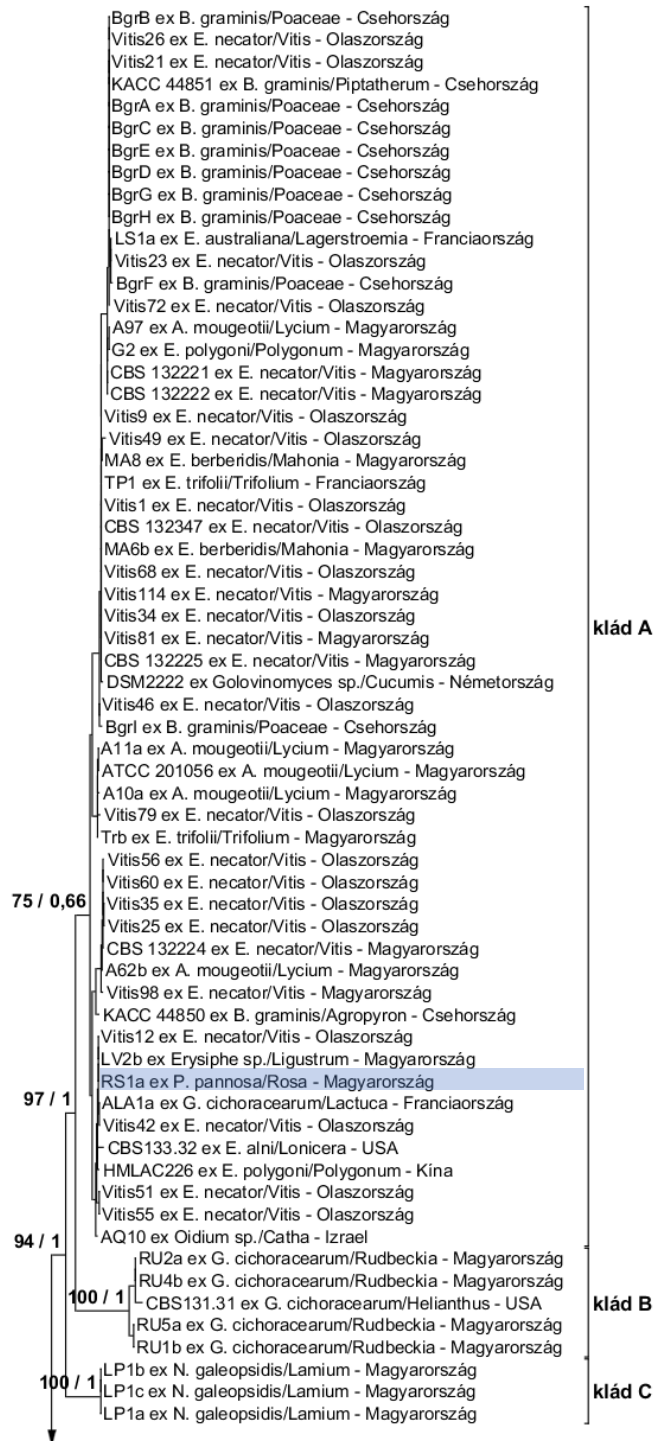
EREDMÉNYEK

AZ *AMPELOMYCES*-TÖRZSEK FILOGENETIKAI VISZONYAI NÉGY LÓKUSZ SZEKVENCIÁI ALAPJÁN

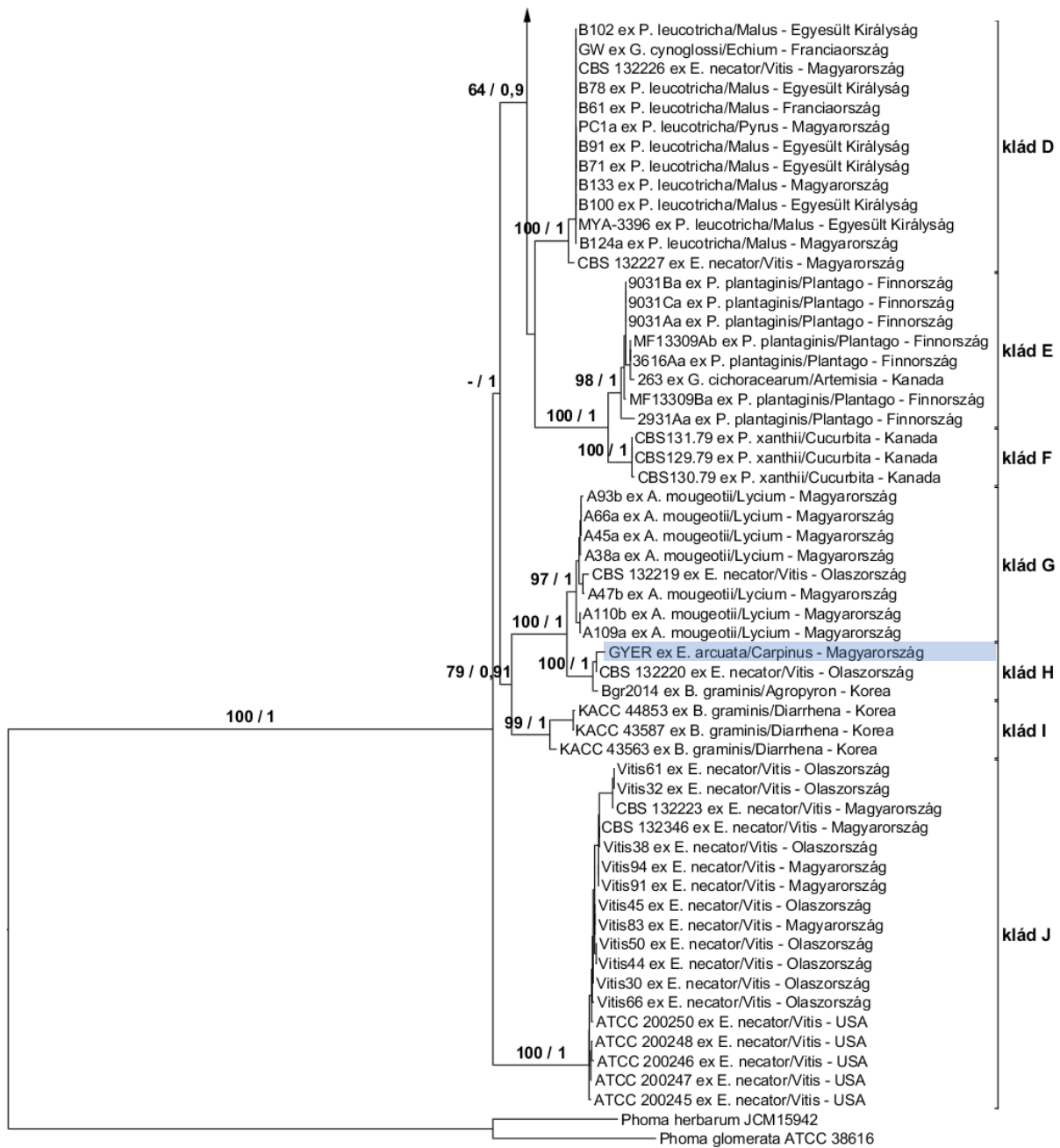
Munkánk során öt új *Ampelomyces*-törzset izoláltunk (F1. táblázat). E törzsek szekvenciáit is beleszámítva összesen 206 új szekvenciát határoztunk meg: 120 *Ampelomyces*-törzsből az *EukNR*, 68 törzsből az *RPBI*, illetve 12 törzsből az *ACTI* gén egy-egy szakaszának szekvenciáját, valamint hat törzs ITS szekvenciáját. Az újonnan kapott adatokat korábban meghatározott szekvenciákkal egészítettük ki, amellyel egy olyan adatbázist építettünk fel, amely tartalmazza összesen 120 *Ampelomyces*-törzs ITS, *ACTI*, *RPBI* és *EukNR* szekvenciáit. Ezek felhasználásával négy lókuszos filogenetikai elemzéseket futtattunk.

A molekuláris filogenetikai elemzések során az elemzésbe vont törzsek összesen tíz, jól elkülönülő, magas támogatottsági értékekkel rendelkező kládba rendeződtek (2. ábra). Ezeket sorrendben A-J betűkkel jelöltük. A ML módszeren és a Bayes statisztikán alapuló elemzések azonos eredményt mutattak és a kapott támogatottsági értékek is hasonlóak voltak az A klád kivételével, amely a Bayes statisztikán alapuló elemzésben alacsony támogatást kapott (poszterior valószínűség = 0,66). A legtöbb törzset tartalmazó A kládba 56 törzs került, mely törzsek összesen öt különböző lisztharmat nemzetség (*Erysiphe*, *Arthrocladiella*, *Golovinomyces*, *Podosphaera* és *Blumeria*) fajaiból származnak. A klád törzsei összesen nyolc országból és három kontinensről származtak. A legnagyobb klád testvércsoportjaként egy öt törzs által alkotott kisebb kládot (B klád) kaptunk. Mind az öt törzset *Golovinomyces cichoracearum* gazdagombából izolálták, két különböző kontinensről. A C kládot egy helyről, egy időben izolált három törzs alkotja, mindegyikük *Neoerysiphe galeopsidis* lisztharmatfajból származik. A C klád az A és B kládok testvércsoportja. A D kládot 13 törzs alkotja, amelyek közül 10 törzset *P. leucotricha* lisztharmatgomba-fajból izoláltak. Az E és F kládot nyolc, illetve három törzs alkotja, melyek közül egy kivételével mindegyik törzs a *Podosphaera* nemzetségbe tartozó lisztharmatból származik. Ezek a kládok egymás testvércsoportjai; ezt a támogatottsági értékek is megerősítik. A G, H és I klád együttesen egy másik, önálló leszármazási vonalat képvisel magas támogatottsággal; a kládok nyolc, illetve három-három törzsből állnak. A G kládban egy kivételével az összes törzs az *A. mougeotii* fajból származik. A H klád három törzsét két különböző lisztharmatgomba-nemzetség három különböző fajából izolálták. Az I-vel jelölt klád három törzse azonos gazdagombából (*B. graminis*), azonos területről származik. A J klád, melyet 18 törzs alkot, a második legtöbb

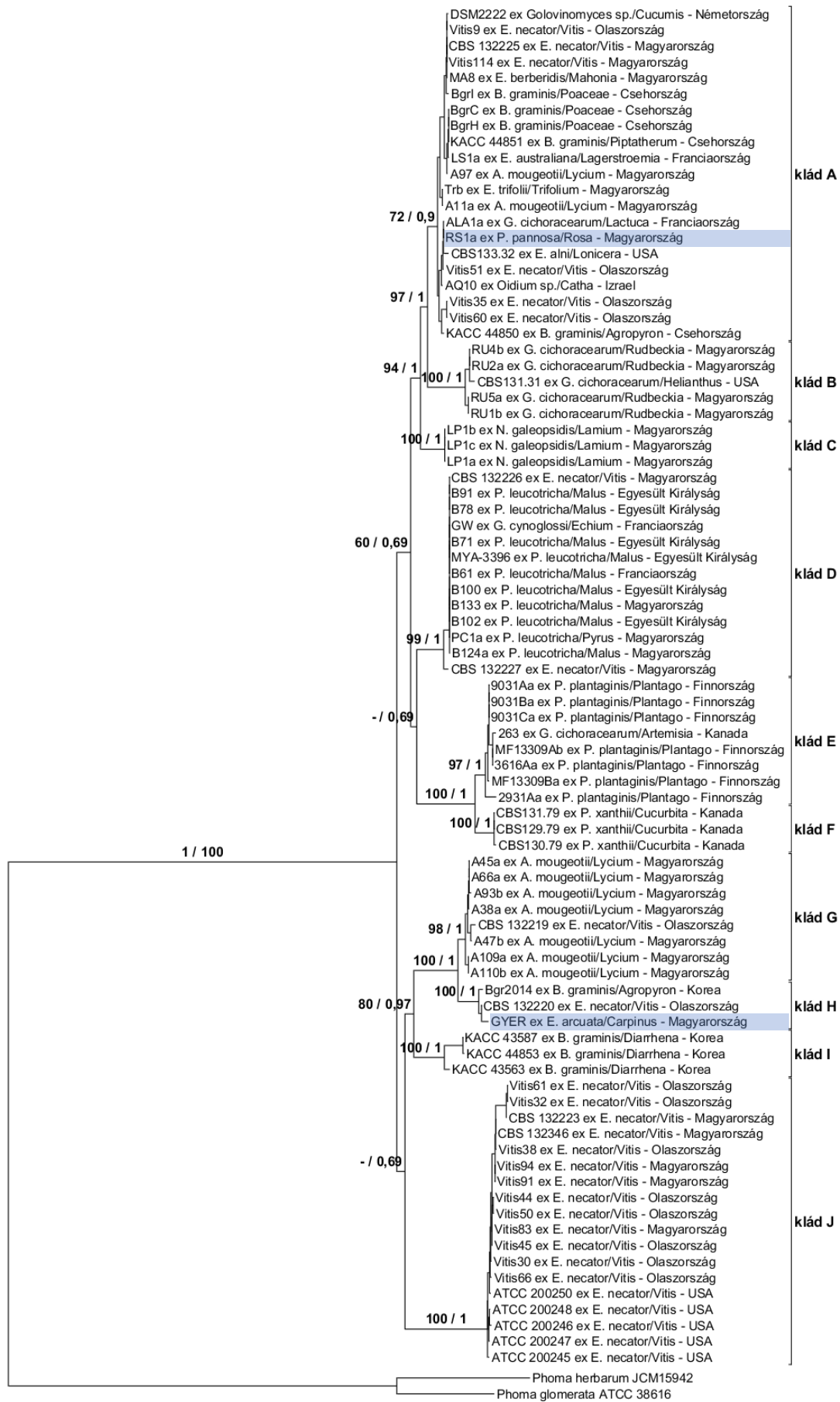
törzset tartalmazó klád. Az ide tartozó *Ampelomyces*-törzsek mindegyike szőlőlisztharmatból (*E. necator* gazdagombából) származik. Az *A. mougeotii*-, a *B. graminis*- és az *E. necator*-fajokból származó *Ampelomyces*-törzsek azonban nem kizárólag az említett G, I, illetve J kládokban található meg, hanem egyéb kládokba is kerültek ugyanezen gazdafajokból származó más *Ampelomyces*-törzsek.



2. ábra (folytatódik a következő oldalon).



2. ábra. Az elemzésbe vont 120 *Ampelomyces*-törzs *maximum likelihood* (ML) elemzéssel készült filogenetikai fája (legvalószínűbb fa) négy lókuszt alapján. A törzsek neve után a gazda lisztharmatgombafaj neve, majd a lisztharmat gazdanövényének nemzetségneve, végül a gyűjtés helye szerepel. Az ágakon az ML és Bayes elemzésben kapott támogatottsági értékeket a következőképpen tüntettük fel: *bootstrap* támogatottság százalékban/posztérrior valószínűségi érték. A 70, illetve 0,9 alatti értékeket és a nagyobb kládokon belüli csoportok támogatottsági értékeit nem tüntettük fel. A kulcsoportot a *Phoma herbarum* (JCM15942) és a *Phoma glomerata* (ATCC38616) alkotja. A mérce 0,05 várható változást jelöl pozícióként és áganként. A transzformációs kísérletekben használt RS1-a és GYER törzseket háttérkiemelés mutatja.



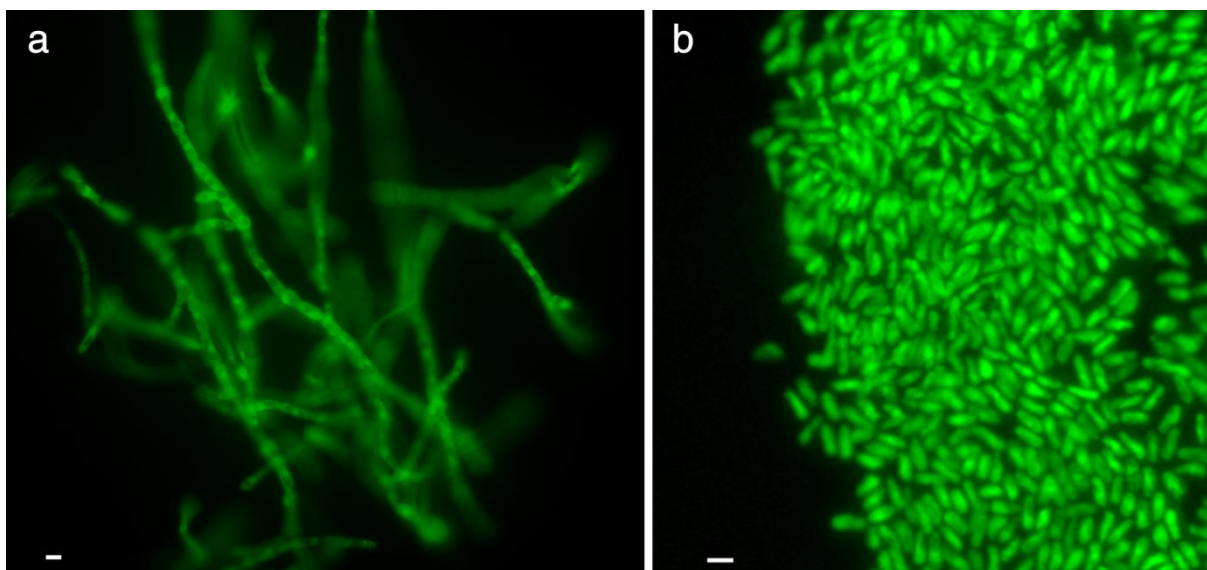
3. ábra (az előző oldalon). Az elemzésbe vont 87 *Ampelomyces*-törzs *maximum likelihood* (ML) elemzéssel készült filogenetikai fája (legvalószínűbb fa) négy lókuszt alapján. A törzsek neve után a gazda liztharmatgombafaj neve, majd a liztharmat gazdanövényének nemzetsége, végül a gyűjtés helye szerepel. Az ágakon az ML és Bayes elemzésben kapott támogatottsági értékeket a következőképpen tüntettük fel: *bootstrap* támogatottság százalékban/poszterior valószínűségi érték. A 70, illetve 0,9 alatti értékeket és a nagyobb kládokon belüli csoportok támogatottsági értékeit nem tüntettük fel. A kulcsoportot a *Phoma herbarum* (JCM15942) és a *Phoma glomerata* (ATCC38616) alkotja. A mérce 0,05 várható változást jelöl pozícióként és áganként. A transzformációs kísérletekben használt RS1-a és GYER törzseket háttérkiemelés mutatja.

Két további elemzéshez a taxonmintázás kiegyensúlyozottabbá tétele érdekében az A klád törzseinek számát lecsökkentettük. Ezek a szűkített, 87 *Ampelomyces*-törzset tartalmazó elemzések ugyanazt a csoportosítást eredményezték, mint a 120 törzssel futtatott elemzések. A tíz említett klád hasonló támogatottsági értékekkel szerepel az így kapott törzsfákon is (3. ábra). Az A klád mind a Bayes statisztikán alapuló, mind az ML elemzésekben is magasan támogatott.

Az ATMT-módszer teszteléséhez használt két törzs két különböző kládba tartozik: az RS1-a törzs az A, míg a GYER a H kládba csoportosult (2. és 3. ábra).

GFP-TRANSZFORMÁCIÓ ÉS A TRANSZFORMÁNSOK JELLEMZÉSE

Az ATMT után nyolc-tíz hét elteltével higromicin B-rezisztens törzsek jelentek meg a szelekciós táptalajon, melyek folyamatos, de az *Ampelomyces*-törzsekre egyébként is jellemző (Liang és mtsai 2007, Legler és mtsai 2016) lassú növekedést mutattak. A transzformáció hatékonysága körülbelül 10% volt az RS1-a, és kb. 30% a GYER törzs esetén. A transzformánsok egy kivételével erős zöld fluoreszcenciát mutattak kék fényel való gerjesztésre (4. ábra / a). A fluoreszcenciát nem mutató törzset kizártuk a további vizsgálatokból. A transzformáns törzsek egy része sporulált szelektív táptalajon. Az ilyen esetekben a keletkezett konídiumok is fluoreszkáltak kék fényel való megvilágítás hatására (4. ábra / b).



4. ábra. Az *Ampelomyces* RS1-a törzs B3 transzformánsának zöld fluoreszcenciát mutató képletei két héttel a nem szelektív táptalajra oltás után. (a) Hifák; mércé: 5 µm. (b) Konídiumok; mércé: 10 µm.

A transzformánsok higromicinmentes táptalajon is megtartották a fluoreszcens képességüket és a higromicinrezisztenciát a munka teljes időtartama alatt. A transzformánsok közül hét RS1-a, illetve hat GYER transzformáns törzset választottunk ki további jellemzésre (5. táblázat). A *hph* és az *SGFP* transzgének genomban való meglétének bizonyítására futtatott PCR-ek minden törzs esetében a várt, kb. 500-600 nukleotid nagyságú termékeket eredményezték. A PCR termékek szekvenciái teljesen megegyeztek a pCBCT (Gorfer és mtsai 2007) vektor *hph* és *SGFP* génjeinek megfelelő szakaszaival. A vad típusú törzsekből nem kaptunk PCR terméket ezekben a reakciókban. A qPCR mérések szerint a transzformáns törzsek közül hét egy kópiában tartalmazza az inzertet. Négy transzformáns esetén kettő, és egy esetén három kópiában épült be az inzert (5. táblázat).

5. táblázat. A kiválasztott hat GYER és hét RS1-a transzformáns jelölése, T-DNS kópiaszáma, táptalajon való növekedésének és *Podosphaera xanthii* lisztharmatgombafajban kifejtett mikoparazitizmusának mértéke a vad típushoz viszonyítva.

A transzformáns jelölése	T-DNS kópiaszám	Táptalajon való növekedés mértéke a vad típushoz képest és a megfelelő p értékek	A mikoparazitizmus mértéke a vad típushoz képest és a megfelelő p értékek		
GYER törzs transzformánsai					
B9	2	nem különbözik	1,000	nem meghatározott	-
L1	1	gyorsabb	< 0,0001	nem meghatározott	-
P1	nem meghatározott	gyorsabb	0,0001	nem meghatározott	-
Q7	1	gyorsabb	< 0,0001	nem meghatározott	-
W6	1	nem különbözik	0,132	nem meghatározott	-
Y6	2	gyorsabb	0,0002	nem meghatározott	-
RS1-a törzs transzformánsai					
A2	1	nem különbözik	0,746	nem különbözik	0,228
B3	3	gyorsabb	0,004	nem különbözik	0,988
C10	1	nem különbözik	0,978	nem különbözik	0,999
E2	1	nem különbözik	0,423	nem különbözik	0,999
F13	1	nem különbözik	0,984	nem különbözik	0,999
G4	2	nem különbözik	0,120	nem különbözik	1,000
J1	2	nem különbözik	0,994	nem különbözik	0,196

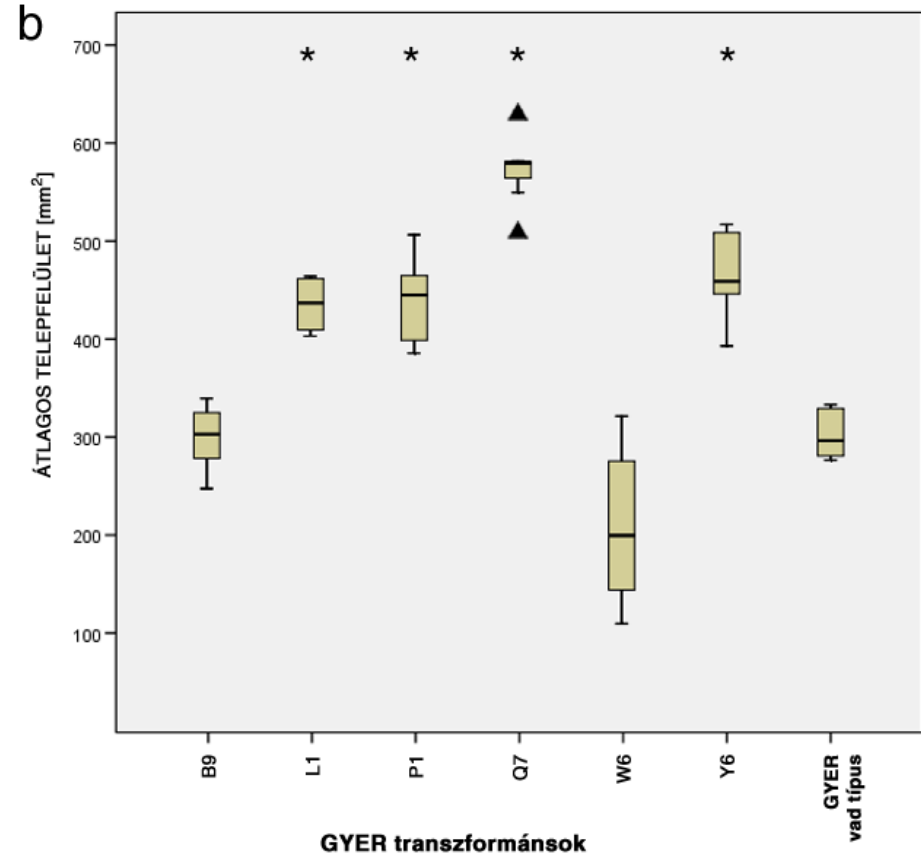
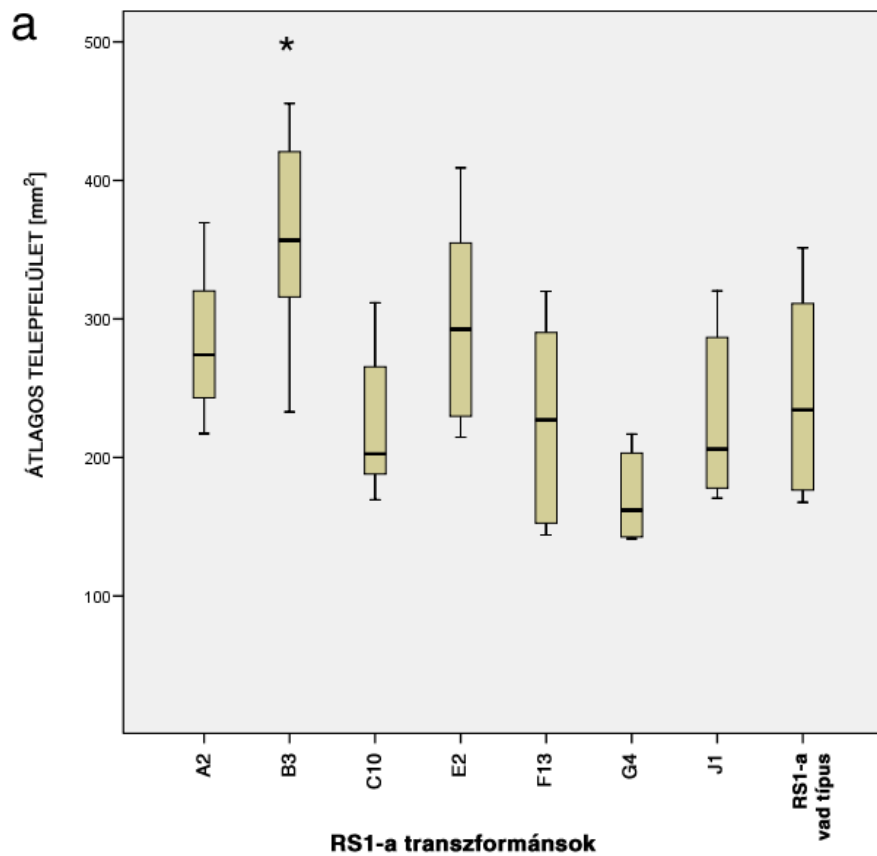
A GFP-t kifejező transzformánsok morfológiája és tenyésztésben való növekedése

A transzformánsok kolóniáinak morfológiája nem tért el a vad típusú törzsekétől. A sporuláló RS1-a transzformánsok estén a keletkezett piknídiumok és konídiumok morfológiája is hasonló volt a vad típuséhoz. A GYER törzs transzformánsai ritkán sporuláltak, de ezekben a ritka esetekben megfigyelt piknídiumok és konídiumok nem tértek el a vad típus struktúráitól. A növekedési tesztek szerint a vizsgált hatból négy GYER ($p \leq 0,0001$) és a vizsgált hétből egy RS1-a ($p = 0,004$) transzformáns növekedése szignifikánsan eltért a vad típusétól (5. táblázat, 5. ábra). A növekedésükben a vad típustól szignifikánsan eltérő transzformánsok közül kettőben egy, egy-egy további transzformánsban pedig két illetve három kópiában volt jelen a T-DNS (5. táblázat); a vad típustól növekedésükben lényegesen nem különböző transzformánsokban egy, vagy két kópiában volt jelen (5. táblázat).

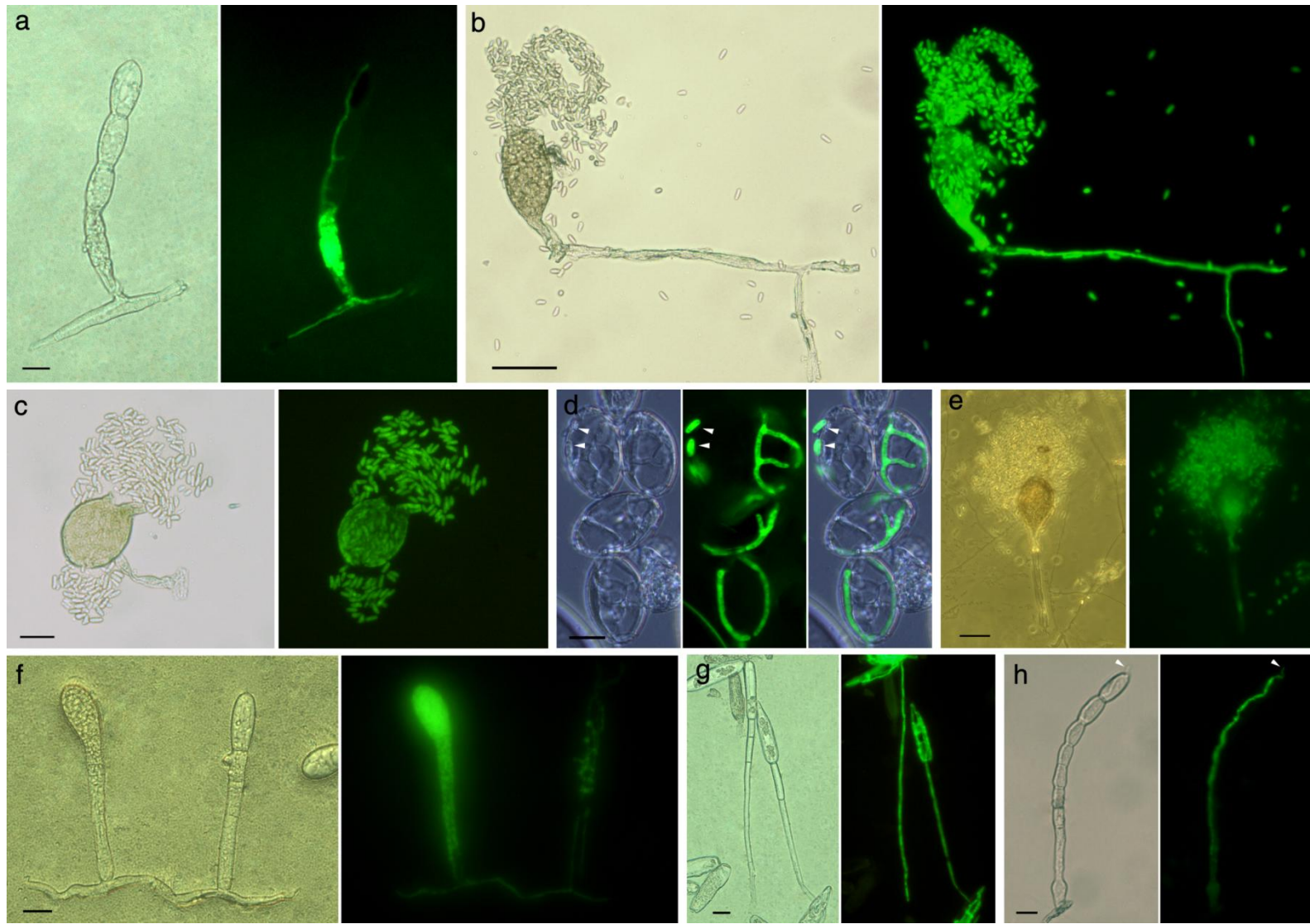
A GFP-t kifejező transzformánsok mikoparazita aktivitása

A mikoparazita tesztek minden esetben az RS1-a transzformánsokkal és vad típussal végeztük, mivel a GYER törzs és transzformánsai nem sporuláltak megbízhatóan a munka során. Az uborkalisztharmattal végzett mikoparazita tesztek mindegyikében megfigyelhető volt a mikoparazita piknídiumainak kialakulása az inokulációt követő tizedik napon. Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva megfigyelhető volt, hogy az RS1-a transzformánsok intracelluláris hifái és piknídiumai, és az ezekből kiáramló konídiumok zöld fluoreszcens fényt bocsátottak ki (6. ábra). A vad típusú törzssel inokulált lisztharmattelepekben fluoreszcencia nem volt látható. A vízzel végzett negatív kontroll kezelésekből származó mintákban *Ampelomyces* struktúrákat nem találtunk.

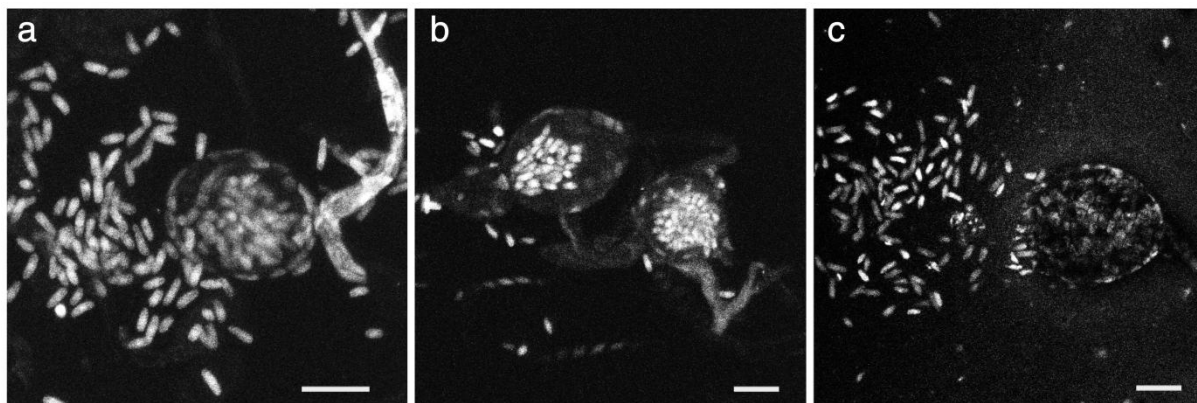
A lisztharmatgomba-konídiumokban található intracelluláris hifák fluoreszcens mikroszkópiával lényegesen jobban megfigyelhetők, mint a DIC mikroszkópiával (6. ábra / d). A mikroszkópos vizsgálatok alapján nem észleltünk különbséget az RS1-a vad típus és a hét vizsgált transzformáns mikoparazita képessége (tehát a lisztharmatgomba-struktúrákba való behatolás, intracelluláris növekedés és piknídiumképzés, majd az azt követő sporuláció) között. A transzformánsokkal végzett mikoparazita tesztek a későbbi ismétlések során is hasonló eredményt adtak, mint az első kísérletben, azaz a telepekben megfigyelhető fluoreszcens jel intenzitása nem csökkent a transzformánsok hosszabb ideig való fenntartása során sem. Az inokulációs kísérleteket követően visszaizolált B3 transzformáns 50 mg/l higromicin tartalmú táptalajon növekedésnek indult és kék fénnel megvilágítva zöld fluoreszcens jelet adott, azaz a mikoparazitizmus, majd a későbbi visszaizolálás során is megtartotta a transzformánsokra jellemző fenotípust.



5. ábra. RS1-a és GYER *Ampelomyces*-törzsek transzformánsainak négy héttel a táptalajra oltás után mért telepfelületét mutató dobozdiagramok. (a) Hét RS1-a transzformáns és a vad típus növekedése. (b) Hat GYER transzformáns és a vad típus növekedése. A második és harmadik kvartiliseket a négyszögek jelölik, a köztük fekvő vízszintes a mediánt mutatja. A függőleges szakaszok alsó és felső vége a minimum és maximum mért értékeket mutatják. A háromszögek kiugró adatokat jelölnek. A megfelelő vad típustól való szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) csillag jelöli.



6. ábra (az előző oldalon). Az RS1-a törzs GFP-t kifejező transzformánsainak mikoparazitizmusa tíz nappal az inokulációt követően, öt különböző lisztharmatfajban, azok gazdanövényein. (a) A J1 transzformáns fiatal piknídiuma, amely uborkanövényen, a *Podosphaera xanthii* konídiumtartójának második sejtjében képződött. A képen konídiumtartó többi sejtjét kolonizáló intracelluláris hifák is megfigyelhetők. A bal oldalon DIC optikával készült fotó, a jobb oldalon pedig a fluoreszcens kép látható. Mércé: 20 µm. (b) A G4 transzformáns érett piknídiuma, amely a *P. xanthii* konídiumtartójában fejlődött és az intracelluláris piknídium falának felszakadása miatt konídiumokat bocsát ki. A bal oldalon DIC optikával készült fotó, a jobb oldalon pedig a fluoreszcens kép látható. Mércé: 50 µm. (c) A B3 transzformáns érett, konídiumokat kibocsátó piknídiuma *P. xanthii* lisztharmatban. A bal oldalon DIC optikával készült fotó, a jobb oldalon pedig a fluoreszcens kép látható. Mércé: 50 µm. (d) A G4 transzformáns *P. xanthii* konídiumaiban található intracelluláris hifái. A fehér nyílak az *Ampelomyces* konídiumokat mutatják a *P. xanthii* konídiumok mellett. Balról jobbra a DIC optikával készült fotó, a fluoreszcens kép és a kettő két egymásra vetítve látható. Mércé: 10 µm. (e) A B3 transzformáns konídiumokat kibocsátó piknídiuma, amely *Erysiphe necator* telepeken fejlődött, szőlőnövényeken. A bal oldalon DIC optikával készült fotó, a jobb oldalon pedig a fluoreszcens kép látható. Mércé: 50 µm. (f) Két, paradicsomon fejlődött *Pseudoidium neolycopersici* konídiumtartó, amelyeket a G4 transzformáns parazitál. A bal oldali konídiumtartóban egy fiatal piknídium képződik, a jobb oldaliban pedig a piknídiumképződés egy korai fázisa látható, amelyben intracelluláris hifák anasztomózisa történik. A lisztharmatgomba további képleteiben is megfigyelhető a mikoparazita intracelluláris hifája. A bal oldalon DIC optikával készült fotó, a jobb oldalon pedig a fluoreszcens kép látható. Mércé: 20 µm. (g) A G4 transzformáns paprikanövényt fertőző *Leveillula taurica* lisztharmatgomba konídiumtartóiban és konídiumaiban megfigyelhető intracelluláris hifái. A bal oldalon DIC optikával készült fotó, a jobb oldalon pedig a fluoreszcens kép látható. Mércé: 20 µm. (h) A C10 transzformáns *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* lisztharmat konídiumtartójában növekvő intracelluláris hifája árpán. A hifa kinőtt a csúcsi konídiumból (fehér nyíl). A bal oldalon DIC optikával készült fotó, a jobb oldalon pedig a fluoreszcens kép látható. Mércé: 20 µm. Az a, c és e-h képekhez a mintákat ragasztószalaggal vettük, amely csökkenti a DIC optika hatását, de nem csökkentette a fluoreszcens képek minőségét.

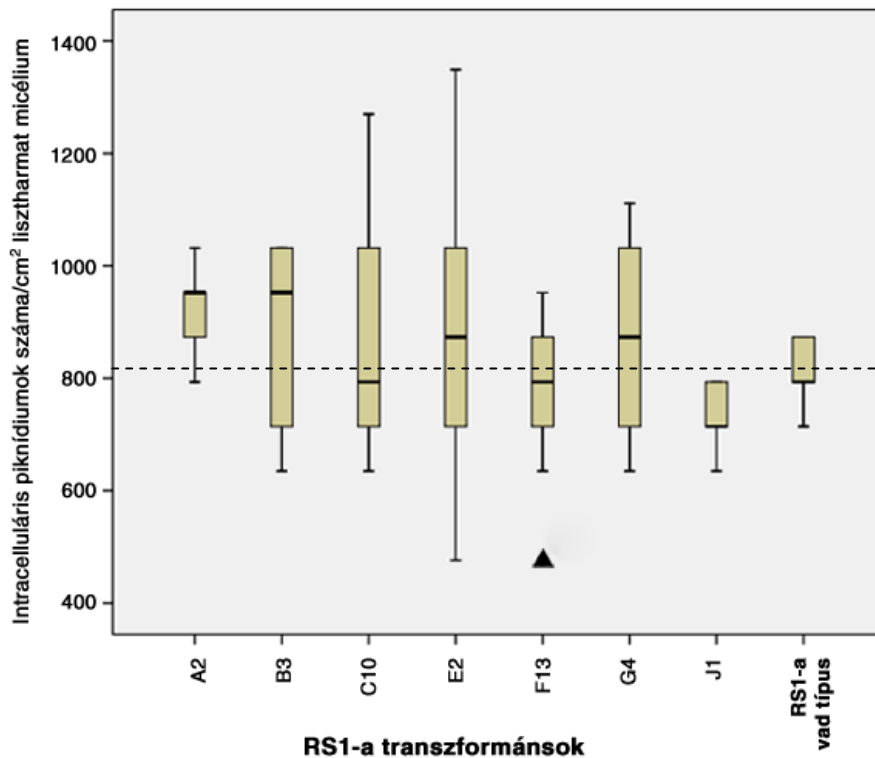


7. ábra. A J1 transzformáns *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* lisztharmat konídiumtartóiban képződött piknídiumai árpán, az inokuláció után 10 nappal. A mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk és z irányú sorozatfelvételek felhasználásával állítottuk elő a képen látható projekciókat. (a) Érett, a konídiumtartó lábsejtjében fejlődött piknídium, amely konídiumokat bocsát ki. Mércé: 20 μ m. (b) Két intracelluláris piknídium, amelyek közül az egyik konídiumokat bocsát ki. Mércé: 20 μ m. (c) Egy intracelluláris piknídium, amelyből a konídiumok már nagyrészt kiürültek. Mércé: 20 μ m. A képek azt mutatják, hogy a piknídiumok falának GFP jele gyenge, vagy láthatatlan, míg a konídiumok fluoreszcenciája mindig erős.

A paprika-, paradicsom-, árpa- és szőlőlisztharmattal végzett mikoparazita tesztekben is megmutatkozott, hogy az intracelluláris *Ampelomyces*-képletek, elsősorban a lisztharmatgomba-hifákban, konídiumtartókban és konídiumokban található intracelluláris hifák sokkal jobban vizualizálhatók, mint hagyományos, DIC vagy fáziskontraszt optikával (6. ábra / e-h). A konfokális mikroszkópos vizsgálatok szerint a transzformánsok érett, intracelluláris piknídiumainak falára nem jellemző erős GFP-fluoreszcencia (7. ábra). A vastag, sötétbarna fallal rendelkező piknídiumokból látható GFP-jel főként a benne található fluoreszcens konídiumokból származott. Ez néhány esetben sejthető volt a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során is (6. ábra / b, c, e), de a CLSM-mel való megfigyelés biztosabban alátámasztotta (7. ábra).

A transzformánsok mikoparazita képességének meghatározása

A hét tesztelt RS1-a transzformáns és a vad típus mikoparazita képességének mértékében nem találtunk szignifikáns különbséget ($p > 0,1$). Az egy négyzetcentiméternyi lisztharmattelepen képződött piknídiumok száma a transzformánsok esetén 811 ± 66 (átlag \pm standard hiba), míg a vad típus esetén 848 ± 178 volt (8. ábra).

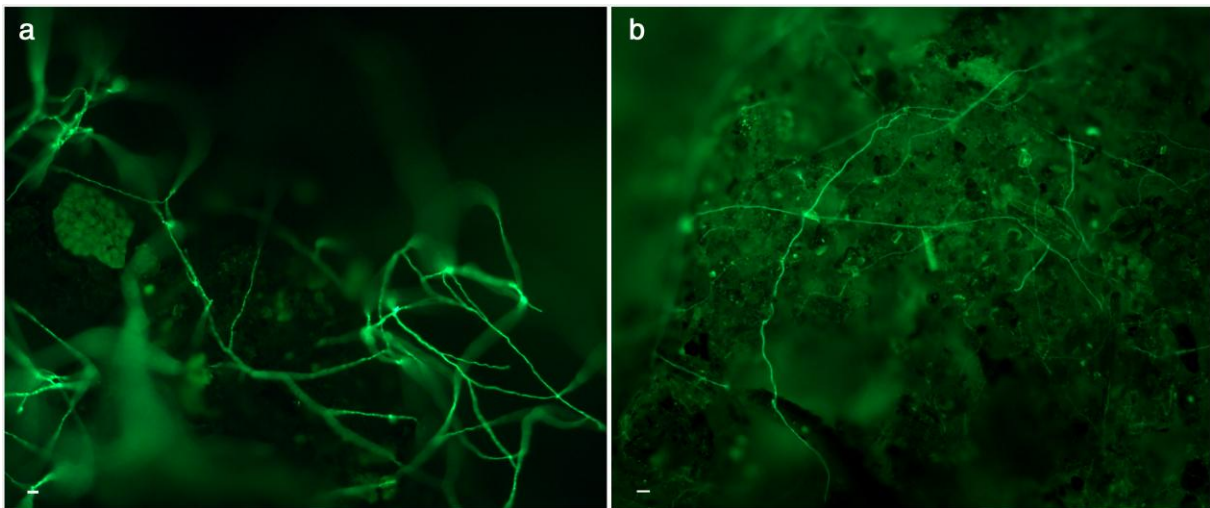


8. ábra. Az RS1-a vad típus és az abból származó transzformánsok mikoparazitizmusának mértékét (az egy cm^2 lisztharmattelepre eső piknídiumszámmal kifejezve) mutató dobozdiagramok. A második és harmadik kvartiliseket a négyszögek jelölik, a köztük fekvő vízszintes a mediánt mutatja. A függőleges szakaszok alsó és felső vége a minimum és maximum mért értékeket mutatják. A háromszög kiugró adatot jelöl. A vad típustól való szignifikáns eltérést nem találtunk. A transzformánsok által 1 cm^2 lisztharmattelepen képzett piknídiumok átlagos számát (811) szaggatott vonal jelöli.

GFP-EXPRESSZÁLÓ *AMPELOMYCES*-TÖRZSEKKEL VÉGZETT FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

***Ampelomyces* növekedése autoklávozott szubsztráton**

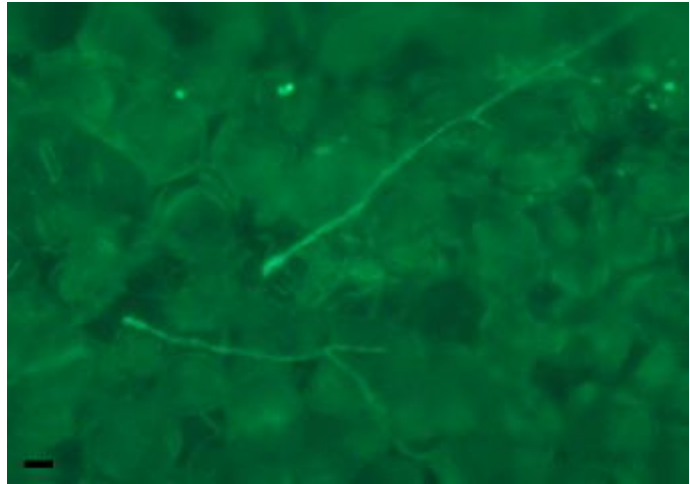
A szubsztrátra juttatott konídiumok az inokulációt követő hetedik napra csíráztak és a kinövő hifák növekedésnek indultak a kísérletben biztosított steril közegben. A hifák a szemcséken és azok között is láthatóak voltak. A vad típusú törzs hifáit csak az utóbbi módon figyeltük meg, valószínűleg a fluoreszcens jel hiánya, a DIC, fáziskontraszt és hagyományos megvilágítást alkalmazó mikroszkópia nyújtotta nehézségek miatt. Ezzel ellentétben a transzformánsok jól megfigyelhetők voltak a GFP-expresszió következtében jelen levő fluoreszcens jel miatt (9. ábra). Az *Ampelomyces* hifákon kívül nem észleltünk más képleteket, tehát a kísérlet során piknídiumok nem alakultak ki.



9. ábra. Az RS1-a B3 transzformáns hifái autoklávozott szubsztráton, 30 nappal az inokulációt követően. (a) A transzformáns levegőbe emelkedett hifái. Mércé: 20 μ m. (b) Talajszemcsén futó hifák. Mércé: 20 μ m.

***Ampelomyces* konídiumok csírázása és fejlődése lisztharmatmentes uborkaleveleken**

Tíz nappal a lisztharmatmentes levelek inokulációja után a tesztelt két transzformáns konídiumainak csírázását és hifáik növekedését lehetett megfigyelni (10. ábra). A vad típusal inokulált leveleken fluoreszcencia nem volt látható. Szaprotróf piknídiumok nem alakultak ki az inokulált leveleken. A leveleken való

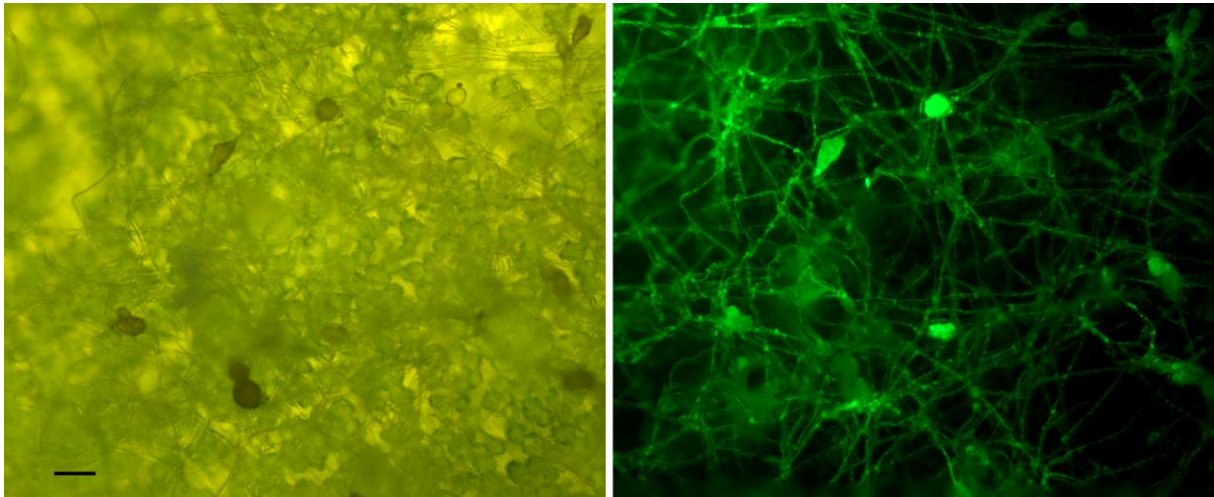


Ampelomyces-növekedés a vad típus esetében is megfigyelhető volt hagyományos mikroszkópiával, a

transzformánsok konídiumainak és hifáinak vizualizációja azonban lényegesen egyszerűbb és jobb volt a fluoreszcens jelnek köszönhetően.

10. ábra. A B3 transzformáns csírázott konídiumai lisztharmatmentes uborkaleveleken, 10 nappal az inokulációt követően. Mércse: 10 μm .

Az uborkanövényeken, amelyeket az *Ampelomyces*-szel való inokulálást követően 4-21 nappal később *P. xanthii*-val inokuláltunk, minden esetben találhatóak voltak érett, konídiumokat nagy mennyiségben kibocsátó *Ampelomyces* piknídiumok. A mikoparazitált teleprészek csupán a levélfelületek kis részén voltak megfigyelhetőek. Mintánként változó számú, de általában kevés piknídium képződött ezeken a leveleken. A transzformánsokra jellemző GFP-expresszió nagyban segítette a mikoparazita megfigyelését a mintákban a vad típus hagyományos mikroszkópiával való megfigyeléséhez képest (11. ábra).



11. ábra. Az RS1-a B3 transzformáns 10 napos uborkalisztharmatban fejlődött intracelluláris hifái és piknídiumai. A transzformáns konídiumait négy nappal a lisztharmattal való inokuláció előtt juttattuk az uborkalevelek felületére. Bal oldalon a hagyományos megvilágítással, míg a jobb oldalon a fluoreszcens módban készült felvétel látható. Mércé: 50 µm.

Ampelomyces potenciális szaprotróf növekedésének tesztje öregedő leveleken

A cserepekbe, a talajra helyezett levéldarabokon a kísérlet 30 napos időtartama alatt végig megfigyelhetők voltak transzformánsok képletei. A kísérlet első 9-12 napjában a GFP fluoreszcens jele erős volt, a további napokban a jel erőssége csökkent, miközben a levelek is bomlásnak indultak. A levéldarabokon található *Ampelomyces*-piknídiumok a folyadékban való lefedés hatására gyakran konídiumtömeget bocsátottak ki a mikroszkópi preparátumokban. A kísérlet végére a GFP-fluoreszcencia a minták többségében teljesen eltűnt. A transzformánsokra jellemző GFP-jelet nem figyeltük meg a vad típusú törzset hordozó levéldarabokon, azonban a növényi anyag és a talajszemcsék háttérfluoreszcenciája ezekben a mintákban is látható volt. Újonnan képződött, szaprotróf, tehát nem a mikoparazitizmus során, a gazdagomba képleteiben kialakuló piknídiumok nem voltak láthatóak sem a növényi anyagon, sem a környező talajszemcséken.

CÉLZOTT GÉNKIÜTÉS MEGVALÓSÍTÁSA AZ RS1-A TÖRZSBEN

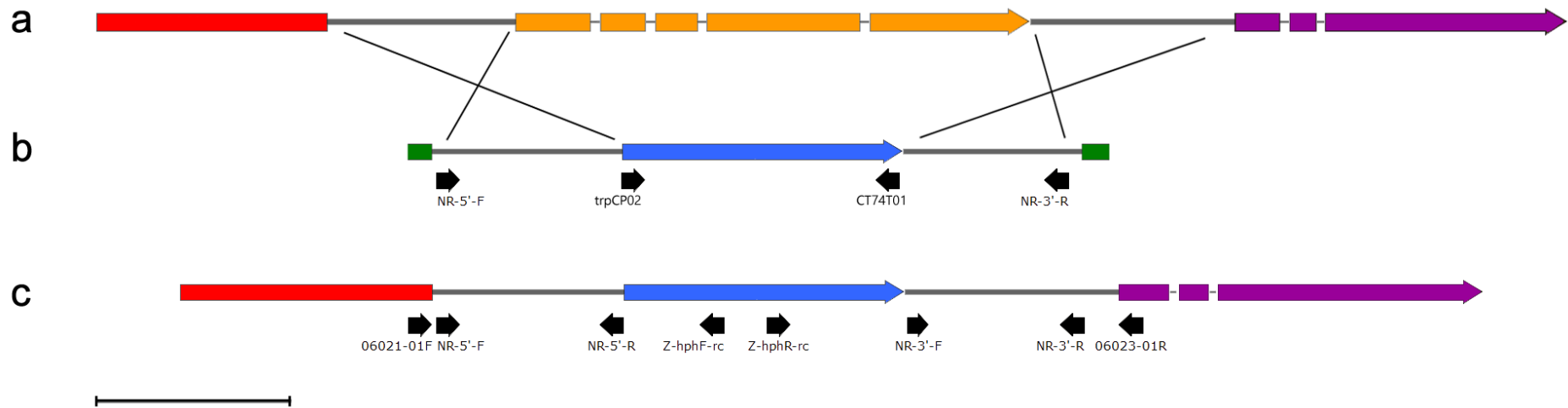
Az Ampelomyces RS1-a törzs transzformálása a pCBRS.NR plazmiddal

Az élesztő rekombinációs klónozás módszerét alkalmazva előállítottuk a pCBRS plazmidot, amely egy *E. coli*–*Agrobacterium*–élesztő *shuttle* vektor, majd a *hph* génnel és az *EukNR* gént határoló szakaszokkal együtt felhasználtuk az RS1-a *Ampelomyces*-törzs *EukNR* génjének kiütésére tervezett pCBRS.NR plazmid előállítására (1. ábra). A plazmiddal való gombatranszformációt követően 20 transzformáns indult növekedésnek szelektív táptalajon. Ez körülbelül 20%-os transzformációs hatékonyságnak felel meg.

Transzformánsok PCR-alapú genotipizálása és az inzert kópiaszámának meghatározása

Nyolc törzsből, az 5' és 3' rekombinálódó szakaszokat célzó diagnosztikus PCR a várt, ~1,4 kb és ~1,7 kb méretű PCR termékeket eredményezett. A PCR termékek szekvenálása szerint a fragmentek szekvenciája teljesen megegyezett a transzformáláshoz használt vektor megfelelő szakaszainak szekvenciájával. Az *EukNR* géntől *upstream* található gén 3' végére és a *downstream* szomszédos gén 5' végére tervezett primerekkel futtatott PCR-ben egy ~3,5 kb méretű PCR terméket kaptunk ezekben a törzsekben, míg a vad típusban és a többi transzformánsban egy ~5 kb méretű terméket kaptunk (12. ábra). A szekvenálás megerősítette, hogy a diagnosztikus PCR-ekben a megfelelő szakaszokat szaporítottuk fel. A PCR-alapú genotipizálás szerint húszból nyolc transzformánsban valóban megtörtént a célzott génkiütés (6. táblázat), ez azt jelenti, hogy a kiütni kívánt gén megcélzásának hatékonysága 40%, míg a génkiütés hatékonysága (tehát a keletkezett KO transzformánsok aránya a transzformációhoz használt összes telepet figyelembe véve) 8%-os volt.

A qPCR mérési eredmények szerint az összes törzsből (ideértve a nem KO transzformánsokat is) legalább tizenhatban egy kópiában található meg az inzert. A nyolc, PCR alapján KO-ként diagnosztizált transzformánsból legalább hétben az inzert egy kópiában található meg, azaz nem található másik *hph* (T-DNS) szakasz, amely véletlenszerűen beépült volna a gomba genomjába a célhelytől eltérő pozícióba. A nyolcadik KO transzformánsban és három további nem KO transzformánsban nem sikerült pontosan meghatározni az inzert kópiaszámát, annak ellenére, hogy kétszer, egymástól függetlenül készített DNS kivonatokból is megkíséreltük.



12. ábra. Az *Ampelomyces* RS1-a törzs nitrát-reduktáz (*EukNR*) gén célzott kiütésének megvalósítása. (a) Az RS1-a vad típusú törzs *EukNR* génje és annak környezete. Az *EukNR* gén kódoló régiójának exonjait narancssárga szakaszok, a két szomszédos gén exonjait pedig piros ill. lila szakaszok jelölik. Az intronokat az exonszakaszokat összekötő vékony fekete vonalak jelölik. A gének közötti régiókat szürke vonalak jelzik. (b) A pCBRS.NR plazmida bejuttatott T-DNS. A kék szakasz a szelektív markergént (*hph*) mutatja, a zöld szakaszok pedig a T-DNS határoló régióit jelentik. A fekete nyilak a felettük való szakaszokra kötődő primereket jelölik. A *hph* génnel szomszédos régiók (szürke vonalak) szekvenciájukban megegyeznek az (a) ábrarészen látható, az *EukNR* génnel szomszédos régiókkal. Az (a) és (b) ábrarészek közötti keresztek a kettős rekombinációt szimbolizálják. (c) A lókuszt szerkezete a célzott génkiütés után. Az *EukNR* gén a *hph* génnel cserélődött. A fekete nyilak a felettük való szakaszokra kötődő primereket jelölik. Az ábrán a különböző szakaszok hosszát méretarányosan ábrázoltuk, a primerek kivételével, amelyeket a láthatóság kedvéért a valódinál hosszabbnak ábrázoltuk. A mérce hossza 1 kilobázis.

6. táblázat. A húsz pCBRS.NR plazmával transzformált RS1-a transzformáns jelölése, genotípusa három genotipizáló PCR alapján és T-DNS kópiaszáma.

NRKO transzformáns	PCR-alapú genotipizálás eredménye	inzert kópiaszáma a transzformánsban
A	<i>knock out</i> (KO)	1
B	KO	1
C	nem KO	1
D	nem KO	5 vagy több
E	KO	1
F	KO	1
G	KO	1
H	KO	1
I	nem KO	1
J	nem KO	1
K	KO	1 vagy 2
L	KO	1
M	nem KO	2 vagy több
N	nem KO	1
O	nem KO	1
P	nem KO	1
Q	nem KO	2 vagy 3
R	nem KO	1
S	nem KO	1
T	nem KO	1

Mikoparazita tesztek egy KO transzformánssal

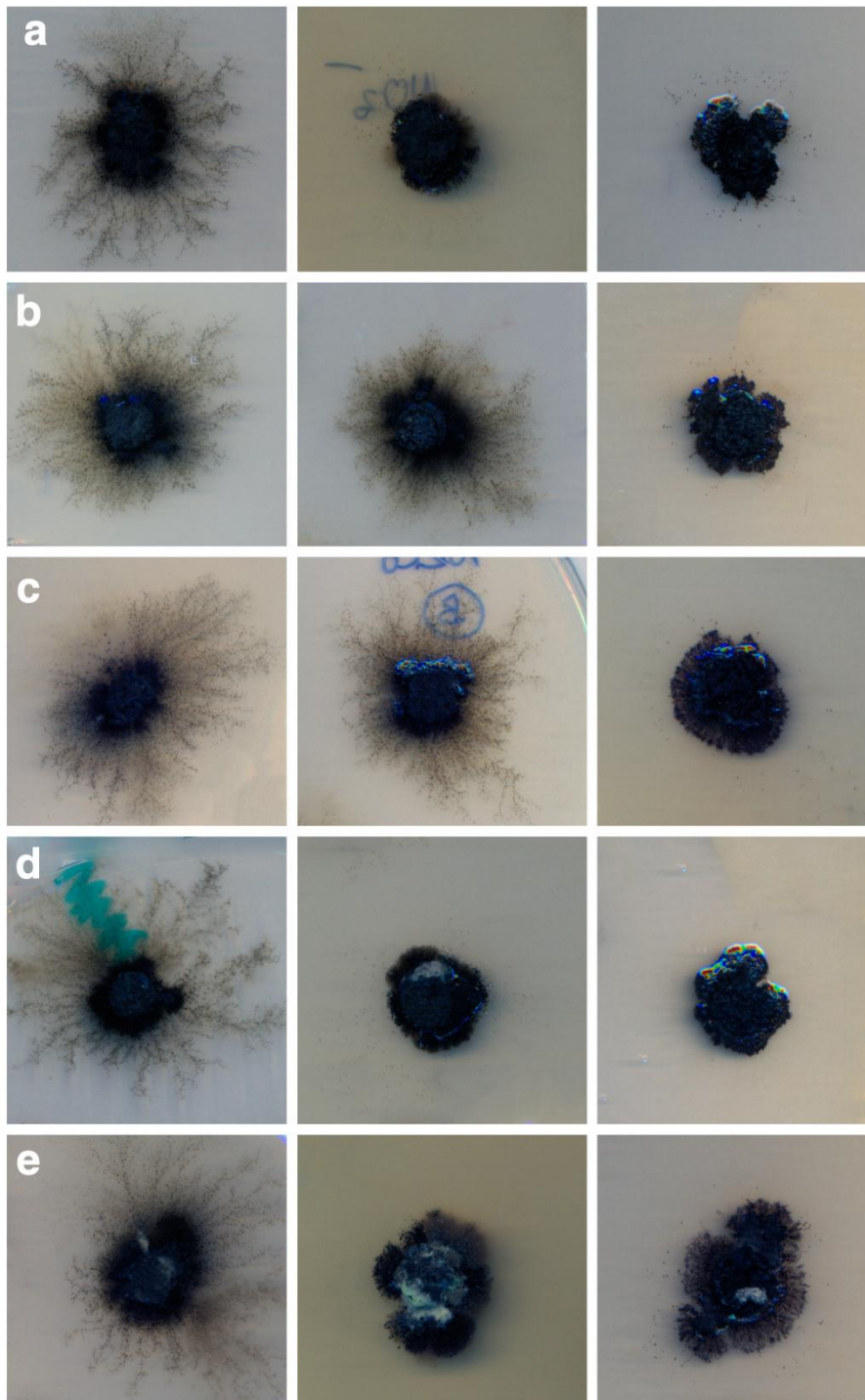
Az RS1-a NRKO B KO transzformáns képes volt az uborkalisztharmat és az árpalisztharmat képleteit kolonizálni és intracelluláris hifákat, piknídiumokat és spórákat képzett (13. ábra) Az uborka-lisztharmattal szemben kifejtett miko-parazitizmus mértéke nem különbözött a vad típusétól ($p > 0,1$). A mikoparazita tesztekét követően a transzformánst sikeresen visszaizoláltuk. A visszaizolált transzformáns növekedett higromicin B tartalmú táptalajon.



13. ábra. Az RS1-a NRKO B transzformáns uborkalisztharmatban fejlődött intra-celluláris piknídiuma 10 nappal a lisztharmatra való inokuláció után. A piknídium konídiumtömeget bocsát ki. Mércse: 50 μ m.

Transzformánsok fenotípusának táptalajos tesztje

A fenotípusus tesztekben a vad típus, valamint a KO és nem KO transzformánsok alanintartalmú táptalajon kompakt, vastag, sötét, jól sporuláló, az RS1-a vad típusra tipikusan jellemző növekedést mutattak (14. ábra jobb oldali fotói). A minimál táptalajon ezzel ellentétben minden telep gyenge növekedést mutatott, a kialakult telepek vékonyak, szerteágazók voltak, gyenge sporulációval (14. ábra bal oldali fotók). A nátrium-nitrát tartalmú táptalajon az RS1-a vad típus és a nem KO transzformánsok egymáshoz hasonló, a vad típusra tipikusan jellemző növekedést mutatták (14. ábra / a, d-e). A KO transzformánsok morfológiája nátrium-nitrát jelenlétében is hasonló volt a minimál táptalajon látható morfológiához (14. ábra / b-c).

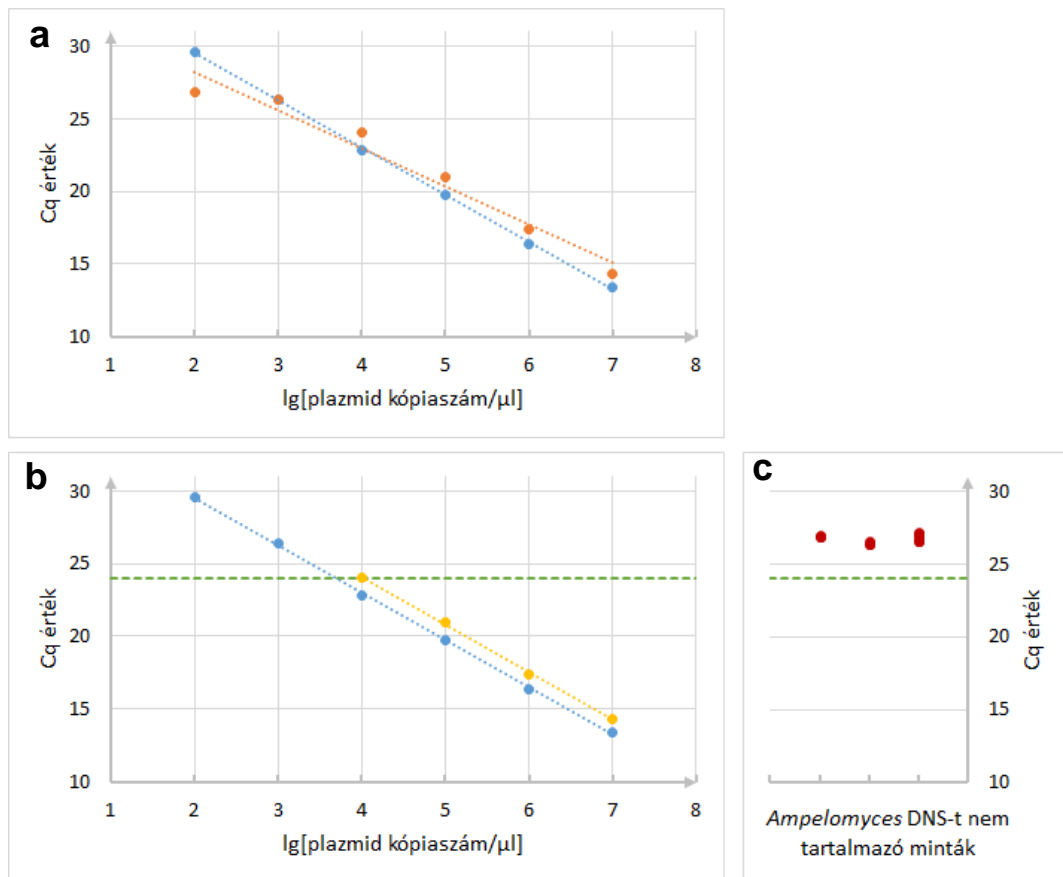


14. ábra. Az RS1-a vad típusú törzs és a pCBRS.NR plazmiddal transzformált négy *Ampelomyces* transzformáns telepmorfológiája különböző nitrogénforrást tartalmazó táptalajokon, két hónappal az átoltás után. A bal oldalon a minimál táptalajon, nitrogén hiányában növény telepek; középen 10 mM nátrium-nitrát ill. a jobb oldalon a 10 mM alanin tartalmú táptalajon jellemző telepmorfológia látható. (a) RS1-a vad típus telepei. (b-c) Két KO transzformáns (NRKO A és NRKO B) telepei. (d-e) Két nem KO transzformáns (NRKO C és NRKO D) telepei.

AZ *AMPELOMYCES*-DNS KIMUTATÁSÁRA ALKALMAS QPCR MÓDSZER

DIAGNOSZTIKAI HATÁRÉRTÉKE

A diagnosztikai határérték meghatározásához egy Åland-ról származó törzs ITS fragmentjét hordozó plazmid hígításaival futtattunk qPCR méréseket. A mért C_q értékeket a plazmid kópiaszám logaritmusának függvényében ábrázoltuk és a pontokra egyenest illesztettünk. A vízzel hígított plazmidok esetén széles skálán, a 10²-10⁷ kópia/μl tartományban pontos lineáris illeszkedést kaptunk (R² = 0,9995; 15. ábra / a). Az *Ampelomyces*-szel nem fertőzött *P. plantaginis* és gazdanövényéből előállított vegyes háttér-DNS kivonatba (8,8 ng/μl) hígítva a 10⁴ és 10⁷ *Ampelomyces*-ITS plazmid kópia/μl nagyságrendek között a mérőegyes (standard görbe) korrelációs koefficiense magas volt (R² = 0,9993), azaz a minták a qPCR log-lineáris szakaszába esnek (15. ábra / b). Az összes adatpontot figyelembe véve a korreláció alacsonyabb (R² = 0,9608), amely elmarad az általánosan elvárt (Broeders és mtsai 2014) 0,98-as értéktől (15. ábra / a). Az alacsony kópiaszám esetén kapott pontok elhelyezkedéséről látható, hogy nem esnek az 10⁴ és 10⁷ plazmid kópia/μl-es minták méréseiből kapott egyenesre. Az összes mért pontra illesztett egyenes pedig, azon kívül, hogy gyengébb korrelációs koefficiens mutat, nem párhuzamos a tiszta plazmidkivonat hígítási lépéseiből kapott egyenessel. A log-lineáris szakaszra eső legalacsonyabb kópiaszám a 10⁴ kópia/μl, az ehhez tartozó C_q átlagérték 24,07 volt. Az *Ampelomyces*-szel nem inokulált lizstarmatos levelekből kivont, illetve a lizstarmattal nem fertőzött levelekből és gyökerekből kivont DNS-mintákra 26,26 - 27,08 közötti C_q értékeket kaptunk (15. ábra / c).



15. ábra. *Ampelomyces* ITS-t tartalmazó plazmidokkal készített qPCR mérőegyenesek és *Ampelomyces* DNS-mentes mintákban mérhető Cq értékek. (a) Plazmidokat vízzel hígítva 10^2 - 10^7 kópia/μl koncentrációtartományban illesztett egyenes (kék; $R^2 = 0,9995$) és plazmidokat lisztharmatos *Pl. lanceolata* levelekből kivont DNS-be hígítva 10^2 - 10^7 kópia/μl koncentrációtartományban felvett egyenes (narancssárga; $R^2 = 0,9608$). (b) Plazmidokat vízzel hígítva 10^2 - 10^7 kópia/μl koncentrációtartományban illesztett egyenes (kék; $R^2 = 0,9995$) és plazmidokat lisztharmatos *Pl. lanceolata* levelekből kivont DNS-be hígítva 10^4 - 10^7 kópia/μl koncentrációtartományban illesztett egyenes (sárga; $R^2 = 0,9993$). Zöld vízszintes: Cq = 24 diagnosztikai határérték. (c) Balról jobbra sorrendben *Pl. lanceolata* levélből, gyökérből, illetve lisztharmattal fertőzött levélből kivont DNS-ből mért Cq értékek. Zöld vízszintes: Cq = 24 diagnosztikai határérték.

EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

AZ *AMPELOMYCES*-TÖRZSEK NEMZETSÉGEN BELÜLI FILOGENETIKAI VISZONYAI NÉGY LÓKUSZ ALAPJÁN

Korábbi munkákban rámutattak, hogy szükséges lenne az *Ampelomyces* nemzetség taxonómiai revíziója (Legler és mtsai 2016), valamint arra, hogy a nemzetségben multilókuszos filogenetikai elemzések is szükségesek a nemzetség fajainak elkülönítéséhez (Park és mtsai 2010). Ezen észrevételek ellenére a korábbi vizsgálatok egyikének sem volt célja a nemzetség taxonómiai, ill. nevezéktani rendezése. A taxonómiai revízió megalapozásához összesen 120 törzs bevonásával, négy lókuszos alapján, ~2900 karakter alapján végeztünk filogenetikai elemzéseket. A törzsek és a felhasznált karakterek viszonylag magas száma lehetővé teszi, hogy az elemzések hozzájáruljanak a nemzetség revíziójához szükséges taxonómiai koncepció kialakításához, és így a nemzetség fajainak formális taxonómiai leírásához. A molekuláris filogenetikai elemzéseink mindegyike tíz kládba osztotta az *Ampelomyces*-törzseket. Ezek alapján a nemzetség tíz fajra bontható és új fajok formális leírása javasolható.

Laboratóriumunkban folytak az *Ampelomyces* nemzetség taxonómiájának revíziójához szükséges telep-morfológiai és mikroszkópos morfológiai vizsgálatok is, ezeket Dr. Pintye Alexandra végezte. Az e munka során vizsgált karakterek (telep-morfológiai bélyegek három különböző táptalajon, konídiumok mérete, klamidospórák megléte, piknídiumok mérete 35 kiválasztott törzsben) egyike alapján sem lehet különböző morfológia csoportokat kialakítani. A morfológiai jelek közül nem találtunk olyat, amely egy-egy, a molekuláris filogenetikai vizsgálatokban kapott kládra specifikusan jellemző lenne, azaz a filogenetikai módszerekkel kapott csoportosítást a vizsgált morfológiai- és telep-bélyegekkel nem sikerült alátámasztani. Ennek következtében a taxonómiai koncepció kialakításához elsődlegesen a molekuláris vizsgálatok eredményeire szükséges alapozni.

A korábbi vizsgálatokban is szereplő törzsek segítségével megvizsgáltuk, hogy a munkánk során kapott kládok megfeleltethetők-e a korábbi elemzések során kapott kládokkal. Ebből az látható, hogy a kládok egy része megfelel a korábbi vizsgálatokban kapottaknak. Vannak olyanok, amelyek bár az elemzésekben megjelentek külön ágakként, de nem különítették el őket önálló csoportokként, pl. az E és F kládnak megfelelő ágakat együtt négyes kládként jelölték (Kiss és mtsai 2011). Esetenként két, a jelen munkában jól elkülönülő kládot alkotó törzsek, pl. A és B klád törzsei nem alkottak elkülönülő kládokat, hanem keverten voltak megtalálhatók (Pintye és mtsai 2012 klád 1.-ben), míg más elemzések

során ugyanezek elkülönültek (Liang és mtsai 2007 munkájában a 4. és 5. klád). Két klád (C és I kládok), mint korábban egyáltalán nem ismert új klád jelent meg az *Ampelomyces*-törzsek filogenetikai fáján. Mindezek oka az lehet, hogy korábbi munkákban az elemzésekbe vont törzsek száma nem volt elég magas (Park és mtsai 2010) és/vagy elég széles körű az izolátumok származási helyét vagy idejét tekintve. A másik jelentős különbség, hogy a korábbi munkákban maximum kettő lókuszt szekvenciáit használták fel, míg jelen elemzésben négy lókuszt szerepelt; ez megbízhatóbbá teszi a csoportok egymástól való elkülönítését. Munkánk megalapozza a taxonómiai revíziót, amelyet követően az újonnan izolált törzsek könnyebben azonosíthatók lesznek, illetve könnyebben megállapítható lesz, ha új genotípust (kládot, vagy potenciálisan új fajt) képviselnek.

Elemzésünk elméletileg vezethetett volna az *Ampelomyces* nemzetség genetikai variabilitását vizsgáló korábbi munkákhoz képest több klád elkülönítésére a több lókuszon alapuló elemzések miatt. Azonban Pintye és mtsai (2012), kizárólag ITS alapján készült törzsfáját megvizsgálva látható, hogy ezen is megtalálható a négy lókuszos elemzésünkben kapott tíz kládból nyolc (a másik két kládot alkotó törzsek pedig korábbi munkákban egyáltalán nem szerepeltek). Ez azt mutatja, hogy a kizárólag ITS-en alapuló csoportosítás megfelel a több lókuszt alapján, jelen munkában kapottak, ami azt jelenti, hogy az ITS jól használható az *Ampelomyces* csoportok elkülönítésére. Az ITS a gombák körében általánosan jól használható hivatalos 'DNS-vonalkód' (*barcode*), azaz a fajszintű azonosítást lehetővé tévő szakasz (Schoch és mtsai 2012). Az *Ampelomyces*-fajok leírását követően feltehetően az egyes *Ampelomyces*-fajok azonosítása is lehetséges lesz az ITS vonalkód szekvenciáik alapján.

AZ EGYES AMPELOMYCES GENOTÍPUSOK GAZDAGOMBÁKKAL VALÓ ASSZOCIÁCIÓJA

Az elemzésekben kapott tíz kládból ötben (A, D, E, G és H) több különböző lisztharmatgombafajból izolált törzsek találhatók, azaz ezekben az esetekben valószínűtlen a kizárólagos gazdaspecificitás megléte. A B és J kládokba egy-egy adott lisztharmatgombafajból izolált törzsek kerültek, a B kládban a *G. cichoracearum*-ból, az J kládban pedig az *E. necator* fajból izolált *Ampelomyces*-törzsek találhatók. A J kládba tartozó négy törzsről (ATCC 200245-200250) kísérletesen bizonyított, hogy képes a *P. xanthii* és a *P. aphanis* lisztharmatgombafajokat is megfertőzni (Angeli és mtsai 2012b), azaz itt sem lehet szó szűk gazdaspecificitásról. Korábbi elemzésekben (Park és mtsai 2010, Pintye és mtsai 2012) kapott törzsfák a B és J kládunknak megfelelő kládjait megvizsgálva az is látható, hogy

a kládba tartozó törzsek gazdagombái közé nem kizárólag az említett két faj tartozik. Ez azt mutatja, hogy ebben az esetben is kevésbé valószínű a kizárólagos gazdaspecificitás.

A másik három kládot (C, F és I), amelyekbe csak egy gazdafajból származó törzsek kerültek, három-három törzs alkot. E kládonként három törzset egy-egy ország területén gyűjtötték. Ennek következtében, és főként a kládokat alkotó törzsek alacsony száma miatt a gazdagombákkal való esetleges asszociáltságokról nem lehet megalapozott következtetéseket levonni. Ennek vizsgálatára további, ebbe a kládba tartozó, lehetőleg reprezentatív mintagyűjtés során izolált törzs bevonására lenne szükség. A kizárólagos gazdaspecificitás e három törzs közül csupán az F klád esetén zárható ki biztosan, hiszen a CBS130.79 törzsről kísérletesen bizonyított, hogy nem csak az eredeti gazdagombát képes parazitálni (Liang és mtsai 2007). Eredményeink megerősítik, hogy az *Ampelomyces*-törzsek többségére nem jellemző erős gazdaspecificitás (Pintye és mtsai 2012), azaz hogy adott *Ampelomyces*-genotípusok csak adott lisztharmatot vagy -csoportot képesek parazitálni.

Adataink azonban nem mondanak ellent annak a lehetőségnek, hogy van „bizonyos mértékű gazdaspecializáció” (Park és mtsai 2010) e mikoparaziták körében. Ebben az esetben helyesebb az ún. strukturális specificitás jelenségéről (Poulin és mtsai 2011) beszélni, amely abban mutatkozik meg, hogy az adott parazita képes különböző gazdagombákat parazitálni, azonban a különböző gazdákon eltérő arányban, vagy különböző abundanciával fordulnak elő a természetben (Poulin és mtsai 2011).

A strukturális specificitás is eredményezhet gazdagombákhoz való asszociációt. Park és mtsai (2010) munkájuk címében az asszociáció kifejezés szerepel, azonban a cikk szövegében a specializáció szót esetenként az asszociáció szinonimájaként használják. A gazdaspecificitás bizonyításához vagy elvetéséhez azonban minden esetben kísérletek szükségesek, önmagában nem elegendő a filogenetikai vizsgálatokban kapott egyes genotípusok és a gazdagombák asszociáltságának vizsgálata, hiszen, ha van is asszociáció, nem jelent feltétlenül szűk gazdaspecializációt is, amint azt az almalisztharmat kórokozójával (*P. leucotricha*) asszociált *Ampelomyces*-törzsek példája mutatja (Szentiványi és mtsai 2005, Kiss és mtsai 2011).

Bizonyos gazdagombák és *Ampelomyces* genotípusok közötti esetleges asszociációra eredményeink is utalnak, hiszen az elemzésünk szerint egyes kládokban szembetűnő egy-egy lisztharmatfaj vagy -nemzetség, mint a kládba tartozó törzsek leggyakoribb gazdagombája. Az E és F kládban (amelyek egymás testvérkládjai) például egy kivételtől eltekintve *Podosphaera*-fajokból származó törzsek találhatóak. Az elemzésbe vont, összes *Podosphaera* spp.-ből származó *Ampelomyces*-törzs egy kivétellel a D, E vagy F kládba tartozik.

A D kládba nagyrészt a *P. leucotricha* lisztharmatgombáról izolált törzsek találhatók meg. Erről a kládról ismert, hogy speciális csoportot takar, az almalisztharmat életciklusából adódó időbeli izoláció miatt (Kiss és mtsai 2011). A *Golovinomyces* nemzetségből, illetve az *A. mougeotii*- és az *E. necator*-fajokból izolált törzsek, bár több kládban megjelentek, nagy arányban kerültek a B, ill. a G és a J kládokba. Ezek az esetleges asszociációra utaló jelek fakadhatnak a mintázás hibájából (*bias*), de biológiai alapjuk is lehet, mint például az említett strukturális specificitás megléte. Az asszociáltság kérdésének tisztázására a jövőben érdemes lehet további, megfelelő mintázáson alapuló vizsgálatokat tervezni. Eredményeink szerint nem zárható ki, hogy a gazdagombákkal való kapcsolat hatással lehetett az *Ampelomyces* nemzetség genetikai sokféleségére is, amely folyamat azonban nem vezetett szűk gazdaspecificitáshoz (Pintye és mtsai 2012).

AZ AMPELOMYCES-TÖRZSEK TRANSZFORMÁLHATÓK ATMT-VEL

GFP-t kifejező *Ampelomyces*-transzformánsok létrehozásához és a nitrátreduktáz-hiányos transzformánsok létrehozásához az ATMT-t alkalmaztuk, amelyet a funkcionális genetikai aranykor csodafegyverének tartanak (Idnurm és mtsai 2017). A módszer eredményesnek bizonyult e gombák transzformálására is, és más munkákban (Li és mtsai 2005) tapasztaltakhoz hasonló hatékonyságot értünk el mindkét (a pCBCT és a pCBRS.NR plazmidokkal való) transzformációs kísérletben. Az ATMT módszer két, filogenetikailag eltérő és sporulációs tulajdonságukat tekintve erősen különböző fiziológiai állapotban lévő törzsön, két különböző konstrukcióval egyaránt sikeresen használható volt: az RS1-a törzs stabilan és erősen sporulál tenyészetben (Legler és mtsai 2016), míg a GYER általában nem sporulál, amikor esetenként igen, akkor is csak nagyon gyengén, a transzformációs munka során pedig egyáltalán nem sporulált. A sikeres transzformációk bizonyítják, hogy a módszer használható filogenetikailag és fiziológiailag különböző *Ampelomyces*-törzsek transzformációjára. Feltételezhető, hogy a módszer más kládokba tartozó törzseken is eredményesen használható. Meg kell azonban jegyezni, hogy mivel az *Ampelomyces*-törzsek tenyészetben nagyon lassan növekednek, az egész folyamat (a transzformáláshoz való előnövesztéstől a szelektált transzformánsok növekedéséig) hosszú időt (akár 4-6 hónapot is) vesz igénybe, azaz más gombák transzformálásához képest nagyon időigényes. Más gombafajok esetén akár 10-12 nap alatt is elvégezhető a folyamat összes lépése (Michielse és mtsai 2008).

A GFP-t expresszáló törzsek fluoreszcens jele és a higromicin B-rezisztens fenotípusa azt mutatják, hogy a pCBCT plazmiddal bejuttatott génszakaszokon található heterológ gének és az azok expresszióját biztosító szabályozó régiók funkcionálisak mindkét tesztelt törzsből. A GFP-expressziót és higromicin B-rezisztenciát a törzsek szelekciós ágenszt nem tartalmazó táptalajon is megtartották több mint három éven át. Ugyanezt tapasztaltuk a higromicin B-rezisztenciával kapcsolatban az *EukNR*-hiányos transzformánsok esetén. A GFP transzformánsok mesterséges táptalajon és a liztharmatképletekben képződött piknídiumaik által termelt konídiumok szintén fluoreszkálnak. Mind a GFP-t kifejező, mind az *EukNR* KO transzformánsok visszaizolálhatók voltak inokulációs kísérleteket követően, és a visszaizolált telepek a kísérletekhez használt transzformánsokhoz hasonlóan higromicin B rezisztensek voltak. E jelenségek egyaránt azt mutatják, hogy az ATMT-módszerrel előállított transzformánsok mitotikusan stabilak, a bejuttatott T-DNS szakasz a genomjukba épült és ott tartósan megmarad.

A legtöbb esetben mind a pCBCT, mind a pCBRS.NR plazmiddal előállított transzformánsok genomjába egy példányban épült be a T-DNS. Az egy kópiás beépülés általában jellemző az ATMT-módszere (Li és mtsai 2017). A GFP-t expresszáló törzsekben, amelyekben egynél több példányban található meg az inzert, a nagyobb kópiaszám csak két esetben járt együtt a növekedési erély erős megváltozásával, háromban nem. A vad típustól eltérő növekedéssel jellemezhető törzsek között vannak egy és több kópiás inzertet hordozó transzformánsok is. Ez azt mutatja, hogy a két jellemző között nincs egyértelmű közvetlen összefüggés. Ettől függetlenül későbbi vizsgálatokba olyan transzformánsokat érdemes bevonni, amelyek egy kópiában tartalmazzák az inzertet és a mikoparazita képességük mértéke, valamint a növekedési jellemzőik sem különböznek a vad típustól.

A GFP-transzformánsok a mikoparazita tesztek mindegyikében sikeresen behatoltak a liztharmattellepekbe és intracellulárisan fejlődtek, piknídiumokat képeztek és sporuláltak, a vad típushoz hasonlóan. A mérési adatok szerint mennyiségi különbség sem volt a vad típus és a tesztelt transzformánsok mikoparazitizmusa mértéke között. Ezt arra utal, hogy valószínűleg a mikoparazitizmusban szerepet játszó és ahhoz szükséges gének egyike sem sérült a transzformáció következtében.

A mikoparazita tesztekben a transzformánsok és a vad típusú RS1-a törzs képes volt különböző liztharmatgombafajok telepeit parazitálni és bennük piknídiumokat képezni. Ezek az eredmények újabb kísérletes bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az *Ampelomyces*-törzsekre nem jellemző erős gazdaspecializáció (Kiss és mtsai 2011, Legler és mtsai 2016),

megerősítve ezzel a filogenetikai elemzések eredményeiből levont következtetéseket. A tesztelt lisztharmatgombafajok egymással csak távoli rokonságba tartoznak, sőt eltértek a fajtól, amelyből az RS1-a törzset eredetileg izolálták, ennek ellenére a törzs képes volt azokat hatékonyan parazitálni.

A GFP-EXPRESSZIÓ MEGKÖNNYÍTI AZ *AMPELOMYCES*-TÖRZSEK VIZUALIZÁCIÓJÁT

A fluoreszcens fehérjék expresszióját több mikoparazita kölcsönhatás vizualizációjának megkönnyítésére használták korábban, különféle mikoparazita–gazdagomba párosítások esetén (Amey és mtsai 2002, Lübeck és mtsai 2002, Lu és mtsai 2004, Sarrocco és mtsai 2006, Bitsadze és mtsai 2015). Ez a módszer a lisztharmatgombák és az *Ampelomyces* mikoparaziták közötti kapcsolat megkönnyítésére is sikeresen használható volt. A GFP-expresszió következtében az *Ampelomyces* struktúrák megfigyelése könnyebb a vad típusénál, hiszen azok jóval szembetűnőbbek a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokban. Továbbá, különféle mintákban az adott, GFP-t expresszáló *Ampelomyces* struktúrák fluoreszcens mikroszkóppal sokkal könnyebben láthatóvá tehetők, mint a hagyományos, fáziskontraszt vagy DIC optikákkal. Ez a különbség nagyon kifejezett az intracelluláris hifák esetén. Az intracelluláris hifákat már De Bary (1870) is megfigyelte hagyományos mikroszkópos technika alkalmazásával, majd a lisztharmatgomba hifákban, konídiumtartókban és konídiumokban való fejlődésüket is dokumentálták (Speer 1979, Szentiványi & Kiss 2003, Kiss és mtsai 2010). Az *Ampelomyces*-képletek megfigyelése, elsősorban a mikoparazita kapcsolat első szakaszában, azonban nehézkes lehet, hiszen ekkorra még nem fejlődtek ki a piknídiumok. A transzformánsok fluoreszcens jelének következtében a mikoparaziták jól láthatóak a konídiumok csírázásától a későbbi növekedési fázisokig. A fokozott láthatóság következtében kísérleteinkben is megfigyelhettük a konídiumok lisztharmatmentes környezetben, a leveleken való csírázását és a hifák lisztharmatgomba-konídiumokban való intracelluláris növekedését. Ezen kívül lehetséges volt az inokulációhoz használt *Ampelomyces*-transzformánsok hifáinak megkülönböztetése más gombákétól azokban a kísérletekben, amelyek nem steril körülmények között zajlottak. Hasonlóan jól láthatóak voltak az *Ampelomyces* hifák a talajszemcséken is.

A GFP-transzformánsokat funkcionális kísérletekben is felhasználtuk. Ezek a kísérletek a mikoparazita biológiájára irányultak, elsősorban azzal a céllal, hogy tisztázzuk, hogy mi történik a gombával a mikoparazitizmust megelőzően, majd azt követően. Az életrajz ezen szakaszairól ellentmondásos állítások és ismeretek vannak (Brimner & Boland 2003, Kiss

2004). A biológiai védekezésre használható szervezetek hatékonyságának biztosításában kulcsfontosságú a megfelelő mértékű túlélés és perzisztencia (Jeger és mtsai 2009). A szakirodalomban található általános elképzelés szerint az *Ampelomyces* spp. megtelepedéséhez aktívan növekedő lisztharmattelepekre van szükség (Sztejnberg és mtsai 1989, Falk és mtsai 1995b, Kiss és mtsai 2004, Kiss 2008). A lisztharmatmentes uborkalevelek GFP-transzformánsokkal való inokulációját követően kimutattuk, hogy a mikoparaziták képesek akár 21 napig is túlélni a leveleken anélkül, hogy a gazdagomba jelenlétére szükségük lenne. Ez idő eltelte után a törzsek még képesek voltak a gazdagomba képleteibe hatolni és azokkal mikoparazita interakcióba lépni, miután a leveleket lisztharmattal megfertőztük. Ezt a jelenséget korábban még nem mutatták ki, annak ellenére, hogy néhány terméket lisztharmat ellen megelőző kezelésre ajánlanak (Paulitz & Bélanger 2001, Bélanger & Labbé 2002) vagy használtak (Kaur és mtsai 2018), ami feltételezi, hogy az *Ampelomyces*-alapú készítmények bizonyos ideig aktívak maradnak a kijuttatást követően. Megfigyelésünk így az *Ampelomyces* gyakorlati felhasználása szempontjából is fontos, hiszen feltételezhető, hogy a biológiai védekezés céljából kijuttatott *Ampelomyces*-alapú növényvédőszernek az a része sem vész kárba, amelyik lisztharmattal nem fertőzött növényi részekre kerül. Az így kijuttatott biofungicid preventív védekezést fejthet ki, azaz a később várható lisztharmatfertőzéssel szemben bizonyos mértékig hatásos lehet. A növények föld feletti részein fertőző kórokozók ellen használt *Trichoderma*-törzseket gyakran célzottan preventív módon használják fel biológiai védekezésre (pl. Xu és mtsai 2010, Marraschi és mtsai 2019).

Azokon a kísérleti növényeken, amelyekre előbb *Ampelomyces*-inokulumot juttattunk, majd ezeket lisztharmattal megfertőztük, a mikoparazitizmus mértéke elmaradt azoktól a pozitív kontroll inokulációk után tapasztaltnál, amelyekben az erős kezdeti lisztharmatfertőzöttség következtében a mikoparazita azonnal megtámadhatta a gazdagombát. Az előbbi esetben egységnyi idő után a levelek kisebb részét borították csak a mikoparazita piknídiumai és teleprészenként is kisebb számú piknídium képződött. Ennek két, egymást nem kizáró oka lehetséges. A kísérletben minden esetben az *Ampelomyces* inokulációt követő lisztharmatfertőzés után 10 nappal vizsgáltuk a mikoparazitizmust. E 10 napos lisztharmattelepek fiatalok, a gazdanövényt még nem fertőzik teljes intenzitással, emiatt feltehetően kevésbé alkalmasak erőteljes mikoparazitizmus fenntartására. Másrészt valószínű, hogy a lisztharmatmentes leveleken való, akár 21 napig tartó intervallumot a mikoparazita képletei csak bizonyos arányban élték túl, egy részük elveszett, és emiatt a mikoparazitizmus

hatékonysága csökkent. A kísérletek kibővítésével, és a mikoparazitizmus mértékének mérésével megállapítható lenne ennek a veszteségnek a pontos értéke. *Trichoderma*-törzsekkel végzett kísérletekben azt tapasztalták, hogy a kijuttatott mennyiségnek kb. fele-nyegyede található meg a leveleken 28 nap elteltével (Samuelian 2016). Hozzáadott adalékanyagokkal elérték, hogy 15 nap után az eredeti kijuttatott mennyiséghez hasonló mennyiségben marad fenn a kijuttatott törzs (Navaneetha és mtsai 2015). Egy másik kísérletben összesen 35 törzset tesztelték és 21 nap elteltével a törzsek mindegyikét sikerült visszaizolálni (Galletti és mtsai 2008).

Az *Ampelomyces* életciklus aktív mikoparazitizmuson kívül eső szakaszának vizsgálatára két kísérletet végeztünk. A transzformánsok hifáit és piknídiumait tartalmazó lisztharmatos levéldarabok talajra helyezését követően a transzformánsok fluoreszcens jele 9-12 nap elteltével gyengült, majd a kísérlet végére nagyrészt megszűnt. Ez a GFP-expresszió mértékének csökkenésére, majd megszűnésére utal, ami a transzformánsok aktív metabolizmusának csökkenésére, vagy leállítására enged következtetni. Lényeges, hogy új piknídiumok (és ezzel új spórák) kialakulását nem figyeltük meg a kísérletben. Ezekhez az eredményekhez hasonlóan a transzformánsok konídiumainak talajra való inokulációját követően sem történt újabb piknídiumok képzése. Ebben a kísérletben a hifák fluoreszcens jele többé-kevésbé látható maradt a kísérlet végéig, azonban a másik kísérlettől eltérően itt steril, zárt és kiszáradásmentes környezetben tartottunk a törzseket. Valószínűleg ez a szaprotróf növekedés számára feltételezhetően ideális környezet az oka annak, hogy a fluoreszcens jel sokáig megfigyelhető volt a steril talajszemcséken. Fontos azonban, hogy még ebben az ideálisnak tűnő környezetben sem történt erős szaprotróf növekedés és piknídiumképződés.

Hasonlóan ezekhez az eredményekhez, azokon a lisztharmatmentes leveleken sem figyeltünk meg piknídiumképződést, amelyekre *Ampelomyces* konídiumokat juttattunk ki. Piknídiumképződés csak e kísérlet második szakaszában volt tapasztalható, amikor már a gazdagomba képletei is jelen voltak a leveleken. Mindezek az eredmények jól illeszkednek abba a képbe, amely szerint az *Ampelomyces*-gombák esetén erős, piknídiumképződéssel is járó szaprotróf növekedés kizárólag táptalajon figyelhető meg (Sztejnberg és mtsai 1989, Liang és mtsai 2007, Legler és mtsai 2016, Liyanage és mtsai 2018). Kísérleteinkben a lisztharmatmentes környezetekben és a bomló levelek környezetében figyeltük meg a transzformánsok minimális hifális növekedését, de egyik esetben sem történt piknídiumképződés.

Mivel a kísérleteinkben nem találtunk lisztharmatgombák jelenlététől függetlenül lejátszódó *Ampelomyces* piknídiumképzést, ezért a korábbi mikológiai irodalomban ismertetett (De Bary 1870, Yarwood 1939), szaprotróf piknídiumokkal való áttelelés jelensége nem nyert megerősítést. A korábbi kísérletes eredmények mindegyike, amely az *Ampelomyces* spp. áttelelésére vonatkozik, azt mutatta, hogy az áttelelésre alkalmas képletek minden esetben lisztharmatgomba-képletekkel kapcsolatosak (Falk és mtsai 1995a, Szentiványi & Kiss 2003, Kiss és mtsai 2011).

Saját eredményeink és irodalmi adatok is azt mutatják tehát, hogy az *Ampelomyces*-törzsek fő élettere (gazdagombáikhoz hasonlóan) a gazdanövények föld feletti részeihez, a filloszférához kötődik. A filloszférában elsődlegesen mint lisztharmat-mikoparaziták vannak jelen. Kísérleteinkben a gazdagombák jelenléte nélkül nem mutattak sporulációt sem a leveleken, sem a talajon, csak gyenge növekedés és perzisztálás nyert bizonyítást. Lehetséges, hogy a gazdanövények környezetében a gazdagomba nélkül bizonyos ideig fennmaradnak (hiszen táptalajon is fenntarthatók), de a lisztharmatgombáktól, mint gazdáktól független életteret valószínűleg nem képesek huzamosabb ideig elfoglalni a természetben. Ennek következtében megalapozatlannak tűnik az *Ampelomyces*-gombák a talajban élő más gombák és egyéb organizmusok elleni potenciális negatív hatását feltételezni (Brimner & Boland 2003). Ezzel kapcsolatban hasonló következtetésre jutott Kiss (2004) is, akinek következtetését kísérletes eredményeink is megerősítik.

AZ ÉLESZTŐ REKOMBINÁCIÓS KLÓNOZÁS FELHASZNÁLÁSA PLAZMID-KONSTRUKCIÓK ÖSSZEÁLLÍTÁSÁRA

Az élesztő rekombinációs klónozás módszerét alkalmazva előállítottunk egy *E. coli*–*Agrobacterium*–élesztő *shuttle* vektort. A módszer egyszerű és hatékony (Joska és mtsai 2014); a vektor előállítása a hagyományos, restrikciós emésztésen és fragmentligáláson alapuló klónozás útján feltehetően sokkal több időt és költségráfordítást igényelt volna (Joska és mtsai 2014). A létrehozott pCBRS plazmidon (1. ábra / a) megtalálható gének funkcióinak együttes jelenléte miatt a plazmid, mint vektor váz (*backbone*) felhasználása a további lépésekben minden esetben *E. coli*–*Agrobacterium*–élesztő *shuttle* vektort eredményez (Joska és mtsai 2014). A keletkezett vektor az ATMT szempontjából egy 'üres' vektor, mivel a T-DNS határszakaszai között nem tartalmazott semmilyen inzertet. A T-DNS szakaszok közé hagyományos klónozással is építhető inzert (Kilaru & Steinberg 2015), de a mi

megközelítésünkben ezt a vektor vázat egy következő rekombinációs klónozás kiindulási fragmentjeként használtuk fel, és másik három fragmenttel együtt, egy lépésben hoztuk létre a KO megvalósításához szükséges plazmidot. A pCBRS.NR plazmid elméletileg közvetlenül, a hat alkotórész PCR termékeiből kiindulva egy lépésben is előállítható lett volna, hiszen a módszerrel nagyobb számú fragment egybeépítése is lehetséges (Kuijpers és mtsai 2013). Ebben az esetben azonban nem rendelkezünk külön a pCBRS plazmid vázzal, amelyet más plazmidok előállításához használhatunk a későbbiekben. Mivel ezt külön lépésben előállítottuk, a további munkákban plazmid vázként felhasználhatjuk.

CÉLZOTT GÉNKIÜTÉS MEGVALÓSÍTÁSA HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓVAL EGY *AMPELOMYCES*-TÖRZSBEN

A homológ rekombinációval végzett célzott génkiütés a mikoparazita gombák körében általánosan alkalmazott eljárás. A módszert elsősorban a mikoparazitizmusban szerepet játszó gének funkcionális genetikai vizsgálataiban használják (pl. Liu és mtsai 2016, Bansal és mtsai 2019). Munkánkban a célzott génkiütés teszteléséhez a nitrát-reduktázt céloztuk meg, és bizonyítottuk, hogy homológ rekombinációval lehetséges a célzott génkiütés megvalósítása egy *Ampelomyces*-törzsbén. A pCBRS.NR plazmiddal előállított transzformánsokban a potenciális homológ rekombinációs helyek felszaporítására olyan primerpárokat alkalmaztunk, amelyek egy tagja az *EukNR* génnel szomszédos génre kötődik, míg a másik a T-DNS-re. Ezekben a reakciókban csak akkor kapunk terméket, amennyiben a genomba beépült T-DNS fizikai helyzete ezt lehetővé teszi, azaz ha ténylegesen megtörtént a célzott génkiütés a törzsekben (12. ábra / c). A teljes *EukNR* lókuszt célzó reakciókban a vad típusból és azokból a transzformánsokból, amelyekben nem történt célzott génkiütés, megkaptuk az intakt lókusznak megfelelő méretű PCR terméket. A KO transzformánsokban az *EukNR* kódoló régiója helyére beépült *hph* kazetta amplifikálódott, amelynek mérete rövidebb az intakt kódoló régiójánál, így gékép alapján megkülönböztethető volt. A pCBRS.NR plazmiddal előállított transzformánsok közül nyolcban történt célzott génkiütés (6. táblázat), ez azt jelenti, hogy az *EukNR* gén megcélzásának hatékonysága 40% volt. Ez átlagos értéknek számít, hiszen a legtöbb gombafaj esetén 14-75%-os hatékonyságot tapasztaltak (Michielse és mtsai 2005). Az elért hatékonyság arra utal, hogy az ATMT jól alkalmazható *Ampelomyces*-törzsekben való célzott génkiütésre.

A táptalajos tesztekben az *EukNR* KO genotípus következtében kialakult fenotípust tettük láthatóvá. Minimál táptalajon minden esetben, és a KO transzformánsok esetén a nitrát tartalmú táptalajon is gyenge növekedés, vékony telepek és gyenge sporuláció volt tapasztalható. Ez a morfológia tipikusan a nitráthiány („nitrátéhség”) táptalajon való megnyilvánulása (Tomsett & Garrett 1980, Espeso és mtsai 2019). A PCR-alapú genotipizálás és a táptalajos tesztek eredményei egyaránt bizonyítják, hogy sikeresen megvalósult a célzott génkiütés az *Ampelomyces*-transzformánsokban.

Az előbb ismertetett jellemzők alapján kijelenthetjük, hogy az élesztő rekombinációs klónozással való plazmid előállítás és az azt követő *Agrobacterium*-közvetítette transzformálás együttesen lehetségessé teszik az *Ampelomyces*-törzsek funkcionális genetikai vizsgálatainak megindítását. Az ilyen típusú munkához megfelelő alapot ad az *Ampelomyces*-lisztharmat kapcsolatban szerepet játszó gének transzkripciós adatbázisa (Siozios és mtsai 2015) és egy publikusan elérhető teljes *Ampelomyces*-genom³. A jövőbeli munkákban érdemes lehet a mikoparazitizmusban közvetlenül szerepet játszó (Woo és mtsai 1999), a másodlagos anyagcsere-termékek szintézisében fontos (Luo és mtsai 2018), vagy szabályozó funkciókat betöltő gének (Sun és mtsai 2018) vizsgálata, azok szerepének mikoparazita folyamatban való tisztázása. Lehetséges, hogy bizonyos gének kiütésével a mikoparazita képesség hatékonysága megnövekedik (Fang & Chen 2018).

Az NRKO B transzformánssal végzett mikoparazita tesztekben a gomba képes volt az árpalisztharmat és az uborkalisztharmat telepeit parazitálni. A mikoparazitizmus mértéke nem különbözött a vad típusnál mérhetőtől. A *Penicillium rubens*, egy merőben más típusú biokontroll célra használt gomba esetén már vizsgálták a nitrátanyagcsere és a biokontroll képesség közötti összefüggést (Espeso és mtsai 2019). Ebben az esetben nem *EukNR*-hiányos törzsekkel dolgoztak, azonban a tesztelt törzsek más mutációk (egy szabályozó gén, illetve egy transzporter hibája) miatt voltak képtelenek a nitráthasznosításra (Espeso és mtsai 2019). Az első mutáns esetén a nitrátredukáló képesség komplementációval való visszaállítása némileg csökkentette a biokontroll hatást *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ellen. Egy másik mutáns, amely egy, az előzőtől eltérő gén hibája miatt nem képes a nitrát redukálására, azonos mértékű biokontroll hatást fejtett ki, mint a másik mutáns. A szerzők ebből arra következtettek, hogy a *Pe. rubens* esetén a nitrátmetabolizmus a biokontroll képesség egy faktora (Espeso és mtsai 2019). A saját kísérleteinkben erre utaló jeleket nem találtunk,

³ <https://genome.jgi.doe.gov/Ampqui1/Ampqui1.home.html>

amelynek oka lehet, hogy a két biokontroll gomba felhasználási módja, és feltehetően a hatásmódja is teljesen eltérő.

A KO transzformáns mikoparazitizmusának mértéke nem különbözött a vad típusnál mérhetőtől, ami arra enged következtetni, hogy a nitrát-reduktáz gén nem szükséges a mikoparazitizmus folyamatához. A GFP-t expresszáló transzformánsokkal végzett funkcionális kísérleteink (ld. fentebb) is azt az általánosan elfogadott álláspontot látszanak alátámasztani, miszerint e mikoparazita gombák elsősorban a liztharmatgombák intracelluláris hiperparazitáiként vannak jelen a természetben és a szaprotróf életmód csak minimális jelentőségűnek tűnik az életciklusban. Ennek ellenére e mikoparaziták genomjában a nitrát-reduktáz gén megtalálható, hiszen a tíz különböző klád mindegyikéből sikeresen felszaporítottuk és szekvenáltuk egy szakaszát; és funkcionális is, hiszen az *Ampelomyces*-törzsek növeszthetők Czapek-Dox agaron (Sztejnberg és mtsai 1989), amely a nitrátredukáló képességükre utal (Gorfer és mtsai 2014). Ugyanezt mutatta az RS1-a törzs minimál táptalajon való növekedése abban az esetben is, amikor csak a nitrát volt az egyetlen hozzáférhető nitrogénforrás a táptalajban. A nitrátredukáló képesség megtartása egyértelműen szaprotróf bélyeg, azonban az *Ampelomyces*-ek legjellemzőbbnek tartott életterében, a liztharmatgomba-képletekben feltehetőleg csak redukált nitrogénformákkal találkoznak, hiszen a liztharmatokban nincsen nitrátredukáló rendszer, hanem gazdanövényeiktől szerves formában vesznek fel nitrogént (Spanu és mtsai 2010). Emiatt felvetődik a kérdés, hogy miért lehet mégis működő *EukNR* gén az *Ampelomyces*-törzsekben. A nitrát-reduktáznak az ún. asszimilatórikus (a sejt anyagainak felépítéséhez felhasznált redukált nitrogén előállítás) funkciója mellett más szerepe is lehet a gombákban. Anaerob körülmények között számos gomba képes fermentációval kapcsolt nitrát redukcióra, amelynek során a nitrát elektronakceptorként hasznosul (Zhou és mtsai 2002). Ebben a folyamatban a nitrát-reduktáz is részt vesz (Takasaki és mtsai 2004) és főként talajlakó gombáknál lehet jelentősége. A transzformánsok vizsgálatával kapott eredményeink alapján kevésbé valószínű, hogy az *Ampelomyces*-törzsek életciklusában jelentős lenne a talajban való fennmaradás, azonban a nitrát-reduktáz egy további funkciója is ismert. A nitrogén-monoxid (NO) számos folyamatban (pl. növekedés, reprodukció) szerepel szabályozó molekulaként a gombák körében (Cánovas és mtsai 2016, Pengkit és mtsai 2016), és a nitrát-reduktáz részt vesz az endogén NO előállításában (Marcos és mtsai 2016). Ez, vagy a nitrát-reduktáz egyéb funkciói magyarázhatják, hogy miért lehet jelen mégis az *EukNR* gén az *Ampelomyces*-törzsekben.

AMPELOMYCES SPP. TEREPI MINTÁKBÓL VALÓ KIMUTATÁSÁRA ALKALMAS qPCR DIAGNOSZTIKAI HATÁRÉRTÉKE

Az *Ampelomyces* hiperparaziták jelenlétének molekuláris alapú kimutatására fejlesztett qPCR módszerhez használandó diagnosztikai határérték meghatározására egy analitikai megközelítést (Caraguel és mtsai 2011) alkalmaztunk. A módszer tízszeres hígításokban meghatározott log-lineáris szakaszára eső legalacsonyabb koncentrációjú hígításhoz tartozó Cq átlagérték 24,07 volt. A kisebb mennyiségű, magasabb Cq értéket eredményező target DNS-minták detektálása bizonytalan, hiszen ezek target koncentrációja nem tartozik a módszer log-lineáris szakaszba.

Az *Ampelomyces*-mentesen tartott mintákból készített DNS kivonatainkban 26,26 - 27,08 közötti Cq értékeket kaptunk. Ez arra utal, hogy a háttér DNS-ből (a cél-DNS-t, azaz *Ampelomyces*-DNS-t nem tartalmazó DNS-kivonat) is történt amplifikáció. Ennek oka lehet, hogy a *forward* primer 100%-os szekvenciabeli egyezést mutat a *P. plantaginis*, és 95%-os hasonlóságot mutat a *Pl. lanceolata* megfelelő szakaszaival; a *reverse* primer pedig 60%-ban egyezik mind a növény, mind a gazdagomba megfelelő szakaszaival (ld. Tollenaere és mtsai 2014). A megfelelő diagnosztikai határérték megválasztása, azon kívül, hogy elkerüljük az *ad hoc* (objektív módszerrel nem megalapozott) határérték megválasztást, fontos az álpozitív minták elkerülésében is. Az általunk használt *in vitro* módszerrel kapott diagnosztikai határérték (24,07) gyakorlatilag megegyezik az együttműködő finnországi kutatócsoport által a mi munkánktól függetlenül, más megközelítéssel, kísérleti mintákat felhasználva megállapított értékkel (Cq = 24). Ennélfogva, összegezve a két kísérlet eredményeit, kijelenthetjük, hogy a Cq = 24-es határérték robusztus diagnosztikai határértékként alkalmazható az *Ampelomyces* spp. a mintavételi területen gyűjtött levélmintákból való kimutatására. A meghatározott Cq határérték csak olyan DNS-kivonatok esetén használható, amelyeket azonos típusú mintákból, és azonos DNS-izoláló módszerrel állítottak elő, mint amelyet a Cq érték meghatározásához is használtunk.

A kidolgozott módszer jövőbeli munkáink során is kiegészítheti, vagy nagy mennyiségű minta feldolgozásának szükségessége esetén helyettesítheti az *Ampelomyces*-képletek mikroszkópos vizsgálatokon alapuló kimutatását.

ÖSSZEFOGLALÁS

A lisztharmat az egyik leggyakrabban előforduló növénybetegség. Az *Ampelomyces* nemzetségbe tartozó piknídiumos gombák a lisztharmatgombák gyakori mikoparazitái, és biofungicid készítmények formájában a lisztharmatok elleni biológiai növényvédelemben is alkalmazhatók. A nemzetség taxonómiai viszonyai nem tisztázottak és a jól ismert mikoparazita folyamatokat megelőző, vagy azokat követő, a gazdaszervezet nélküli potenciális előfordulásuk is vitatott. Célkitűzéseink a következők voltak:

(i) Az *Ampelomyces* nemzetségen belüli leszármazási viszonyok feltárására a korábbiaknál kiterjedtebb molekuláris filogenetikai elemzések megvalósítása a formálisan leírható fajok elkülönítésének megalapozására. (ii) Az *Ampelomyces* mikoparaziták lisztharmatokban és lisztharmatmentes környezetekben való vizualizációjának megkönnyítésére két törzs zöld fluoreszcens fehérjével (GFP-vel) történő transzformációja, valamint a transzformánsokkal mikoparazita tesztek és más funkcionális kísérletek beállítása. (iii) Homológ rekombináción alapuló célzott génkiütés megvalósítása egy *Ampelomyces*-törzsben. (iv) qPCR-módszer fejlesztése *Ampelomyces*-törzsek terepen gyűjtött, lisztharmatos növényekből kivont összgenomi DNS-mintákból való kimutatására.

A molekuláris filogenetikai vizsgálatok alapján az *Ampelomyces* nemzetségen belül tíz kládot különítettünk el, amelyek alapján új fajok leírása javasolható.

Agrobacterium-közvetítette transzformációval GFP-t kifejező transzformánsokat hoztunk létre, melyek felhasználásával kimutattuk, hogy az *Ampelomyces* konídiumok csíráztak a talajra kerülve és a lisztharmatmentes leveleken egyaránt. A leveleken a lisztharmat jelenléte nélkül is életben maradtak és minimum 21 napig képesek voltak az ezt az időszakot követően újonnan kialakuló lisztharmattelepeket is megfertőzni. A transzformánsok vizualizációja a fluoreszcenciájuknak köszönhetően lényegesen meghaladta a vad típusét mikoparazita tesztek és a többi kísérletek során. A mikoparazitizmust követően a levelekkel a talajba kerülve az *Ampelomyces*-képletek minimális növekedést mutattak, piknídiumképzés pedig egyáltalán nem történt. A nitrát-reduktáz gén kiütésével kimutattuk, hogy az *Ampelomyces*-törzsekben használható a homológ rekombináción alapuló célzott génkiütés. A nitrát-reduktáz hiánya nem befolyásolta a tesztelt törzs mikoparazita képességét.

Az *Ampelomyces*-törzsek molekuláris kimutatására fejlesztett módszer finomításához *in vitro* tesztek végeztünk, amelyek alapján a módszer pontosabban használható terepen begyűjtött össz-genomi DNS-mintákból történő detekciós célokra.

SUMMARY

Powdery mildew infections are amongst the most commonly encountered plant diseases. Pycnidial fungi of the genus *Ampelomyces* are common mycoparasites of powdery mildew fungi, and some selected strains have been registered as commercial biofungicides of powdery mildew infections of important crops. The taxonomy of the genus needs revision. The environmental fate of these mycoparasites in the absence of their powdery mildew hosts, before and after the well-known mycoparasitic process is controversial. The objectives of this work were to: (i) Infer the phylogenetic relationships within the genus *Ampelomyces* based on molecular phylogenetic analyses aiming at defining groups that could be formally described as new species of *Ampelomyces*. (ii) Improve visualization of *Ampelomyces* in powdery mildew structures and in powdery mildew-free environments using transformants expressing the green fluorescent protein (GFP) gene, and conduct mycoparasitic tests and other functional experiments with the GFP-transformants. (iii) Test if homologous recombination-based targeted gene knock out can be achieved in *Ampelomyces* using the same transformation method. (iv) Develop a qPCR method to detect *Ampelomyces* strains in total genomic samples extracted from powdery mildew-infected plant samples collected in the field.

Our molecular phylogenies revealed that the strains included in this study belong to ten well supported clades, which can be formally described as newly recognized *Ampelomyces* species.

The *Agrobacterium*-mediated transformation was successfully applied to obtain GFP-expressing transformants of *Ampelomyces* strains. Using these we demonstrated that conidia of *Ampelomyces* readily germinate on the soil as well as on powdery mildew-free leaves of the host plants. We showed for the first time that *Ampelomyces* can persist up to 21 days on mildew-free host plant surfaces, where it can attack powdery mildew structures as soon as these appear after this period. Detection of *Ampelomyces* structures, and especially hyphae, was greatly enhanced when diverse powdery mildews, leaf and soil samples containing GFP transformants were examined with fluorescence microscopy. As a saprobe in decomposing, powdery mildew-infected leaves on the ground, and also in autoclaved soil, *Ampelomyces* developed new hyphae, but did not sporulate.

By knocking out the nitrate reductase encoding gene it was demonstrated that *Ampelomyces* amenable to targeted gene knock out. The mycoparasitic activity of the tested knock-out transformant was similar to the wild type strain.

An *in vitro* fine-tuning approach was used to develop precise qPCR method for the detection of *Ampelomyces* in total genomic DNA samples extracted from field-collected, powdery mildew-infected plants.

IRODALOMJEGYZÉK

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.

Amano K, 1986. *Host Range and Geographical Distribution of the Powdery Mildew Fungi*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.

Amey RC, Athey-Pollard A, Burns C, Peter MR, Bailey A, Foster GD, 2002. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. *Mycological Research* 106, 4-11.

Amey RC, Mills PR, Bailey A, Foster GD, 2003. Investigating the role of a *Verticillium fungicola* β -1, 6-glucanase during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. *Fungal Genetics and Biology* 39, 264-275.

Angeli D, Maurhofer M, Gessler C, Pertot I, 2012a. Existence of different physiological forms within genetically diverse strains of *Ampelomyces quisqualis*. *Phytoparasitica* 40, 37-51.

Angeli D, Puopolo G, Maurhofer M, Gessler C, Pertot I, 2012b. Is the mycoparasitic activity of *Ampelomyces quisqualis* biocontrol strains related to phylogeny and hydrolytic enzyme production? *Biological Control* 63, 348-358.

Angeli D, Saharan K, Segarra G, Sicher C, Pertot I, 2017. Production of *Ampelomyces quisqualis* conidia in submerged fermentation and improvements in the formulation for increased shelf-life. *Crop Protection* 97, 135-144.

Aveskamp M, De Gruyter J, Woudenberg J, Verkley G, Crous PW, 2010. Highlights of the *Didymellaceae*: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65, 1-60.

Bansal R, Mukherjee M, Horwitz BA, Mukherjee PK, 2019. Regulation of conidiation and antagonistic properties of the soil-borne plant beneficial fungus *Trichoderma virens* by a novel proline-, glycine-, tyrosine-rich protein and a GPI-anchored cell wall protein. *Current Genetics* 65, 953-964.

Bélanger R, Labbé C, 2002. Control of powdery mildews without chemicals: prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. In: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, eds. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. St. Paul, MN, USA: APS Press, 256-267.

Bertani G, 1951. Studies on lysogenesis I: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62, 293.

- Bitsadze N, Siebold M, Koopmann B, Tiedemann A, 2015. Single and combined colonization of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia by the fungal mycoparasites *Coniothyrium minitans* and *Microsphaeropsis ochracea*. *Plant Pathology* 64, 690-700.
- Borchsenius F, 2009. FastGap 1.2. *Department of Biological Sciences, University of Aarhus, Aarhus, Denmark*.
- Braun U, Cook RTA, 2012. *Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews)*. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Brimner TA, Boland GJ, 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 100, 3-16.
- Broeders S, Huber I, Grohmann L, *et al.*, 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology* 37, 115-126.
- Bubner B, Baldwin IT, 2004. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Reports* 23, 263-271.
- Burns M, Valdivia H, 2008. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *European Food Research and Technology* 226, 1513-1524.
- Caffi T, Legler SE, Bugiani R, Rossi V, 2013. Combining sanitation and disease modelling for control of grapevine powdery mildew. *European Journal of Plant Pathology* 135, 817-829.
- Cánovas D, Marcos JF, Marcos AT, Strauss J, 2016. Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel? *Current Genetics* 62, 513-518.
- Caraguel CG, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL, 2011. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 2-15.
- Carroll AM, Sweigard JA, Valent B, 1994. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genetics Reports* 41, 22.
- Cesati V, 1852. *Ampelomyces quisqualis* Ces. *Botanische Zeitung* 10, 301-302.
- Chandelier A, Planchon V, Oger R, 2010. Determination of cycle cut off in real-time PCR for the detection of regulated plant pathogens. *EPPO bulletin* 40, 52-58.
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P, 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119-122.

Cottenet G, Blancpain C, Sonnard V, Chuah PF, 2013. Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 6831-6844.

Cove D, 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. *Heredity* 36, 191-203.

Crous PW, Carris LM, Giraldo A, *et al.*, 2015. The genera of fungi-fixing the application of the type species of generic names—G 2: *Allantophomopsis*, *Latorua*, *Macrodiplodiopsis*, *Macrohilum*, *Milospium*, *Protostegia*, *Pyricularia*, *Robillarda*, *Rotula*, *Septoriella*, *Torula*, and *Wojnowicia*. *IMA Fungus* 6, 163-198.

Cubero OF, Crespo A, Fatehi J, Bridge PD, 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Systematics and Evolution* 216, 243-249.

Davelos AL, Jarosz AM, 2004. Demography of American chestnut populations: effects of a pathogen and a hyperparasite. *Journal of Ecology* 92, 675-685.

De Bary A, 1870. *Eurotium*, *Erysiphe*, *Cicinnobolus*, nebst Bemerkungen über die Geschlechtsorgane der Ascomyceten. In: A. DB, M. W, eds. *Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze*. Frankfurt A.M., Germany: Winter Verlag, Frankfurt A.M., Germany, 1-95. (1.)

De Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG, 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16, 839-842.

De Gruyter J, Aveskamp MM, Woudenberg JH, Verkley GJ, Groenewald JZ, Crous PW, 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research* 113, 508-519.

Djonović S, Pozo MJ, Kenerley CM, 2006. *Tvbgn3*, a β -1, 6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7661-7670.

Edwards K, Johnstone C, Thompson C, 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19, 1349.

Ellwood SR, Liu Z, Syme RA, *et al.*, 2010. A first genome assembly of the barley fungal pathogen *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Genome Biology* 11, R109.

Emmons CW, 1930. *Cicinnobolus cesatii*, a study in host-parasite relationships. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 421-441.

- Espeso EA, Villarino M, Carreras M, *et al.*, 2019. Altered nitrogen metabolism in biocontrol strains of *Penicillium rubens*. *Fungal Genetics and Biology* 132, 103263.
- Falk SP, Gadoury DM, Cortesi P, Pearson RC, Seem RC, 1995a. Parasitism of *Uncinula necator* cleistothecia by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology* 85, 794-800.
- Falk SP, Gadoury DM, Pearson RC, Seem RC, 1995b. Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Plant Disease* 79, 483-490.
- Fang C, Chen X, 2018. Potential biocontrol efficacy of *Trichoderma atroviride* with cellulase expression regulator *ace1* gene knock-out. *3 Biotech* 8, 302.
- Frandsen RJN, Frandsen M, Giese H, 2012. Targeted gene replacement in fungal pathogens via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. In. *Plant Fungal Pathogens*. Springer, 17-45.
- Galletti S, Burzi PL, Cerato C, Marinello S, Sala E, 2008. *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. *BioControl* 53, 917-930.
- Gardes M, Bruns TD, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.
- Gietz RD, Schiestl RH, 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* 2, 31.
- Glawe DA, 2008. The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46, 27-51.
- Gorfer M, Blumhoff M, Klaubauf S, *et al.*, 2011. Community profiling and gene expression of fungal assimilatory nitrate reductases in agricultural soil. *ISME Journal* 5, 1771-1783.
- Gorfer M, Klaubauf S, Bandian D, Strauss J, 2007. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. *Mycological Research* 111, 850-855.
- Gorfer M, Klaubauf S, Berger H, Strauss J, 2014. The fungal contribution to the nitrogen cycle in agricultural soils. *Metagenomics of the Microbial Nitrogen Cycle: Theory, Methods and Applications*, 209-225.
- Gu Y, Ko W, 1997. Water agarose medium for studying factors affecting germination of conidia of *Ampelomyces quisqualis*. *Mycological Research* 101, 422-424.

- Hamada N, Abe N, 2009. Physiological characteristics of 13 common fungal species in bathrooms. *Mycoscience* 50, 421-429.
- Hane JK, Lowe RG, Solomon PS, *et al.*, 2007. Dothideomycete–plant interactions illuminated by genome sequencing and EST analysis of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *The Plant Cell* 19, 3347-3368.
- Hanif M, Pardo A, Gorfer M, Raudaskoski M, 2002. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Current Genetics* 41, 183-188.
- Hashioka Y, Nakai Y, 1980. Ultrastructure of pycnidial development and mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* parasitic on *Erysiphales*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 21, 329-338.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-994.
- Hibbett D, Abarenkov K, Kõljalg U, *et al.*, 2016. Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia* 108, 1049-1068.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Idnurm A, Bailey AM, Cairns TC, *et al.*, 2017. A silver bullet in a golden age of functional genomics: the impact of *Agrobacterium*-mediated transformation of fungi. *Fungal Biology and Biotechnology* 4, 6.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H, 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Jeger MJ, Jeffries P, Elad Y, Xu X-M, 2009. A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. *Journal of Theoretical Biology* 256, 201-214.
- Jeon J, Park S-Y, Chi M-H, *et al.*, 2007. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genetics* 39, 561.
- Joska TM, Mashruwala A, Boyd JM, Belden WJ, 2014. A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *Journal of Microbiological Methods* 100, 46-51.
- Jousimo J, Tack AJ, Ovaskainen O, *et al.*, 2014. Ecological and evolutionary effects of fragmentation on infectious disease dynamics. *Science* 344, 1289-1293.

Kámán-Tóth E, Pogány M, Dankó T, Szatmári Á, Bozsó Z, 2018. A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method. *3 Biotech* 8, 148.

Kaminskyj SG, 2001. Fundamentals of growth, storage, genetics and microscopy of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics Reports* 48, 25-31.

Katoh K, Standley DM, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30, 772-780.

Kaur L, Gupta B, Sharma IM, Joshi AK, 2018. Eco-friendly management of powdery mildew of mango through biocontrol agents. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7, 392-396.

Kilaru S, Steinberg G, 2015. Yeast recombination-based cloning as an efficient way of constructing vectors for *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* 79, 76-83.

Kiss L, 1997. Genetic diversity in *Ampelomyces* isolates, hyperparasites of powdery mildew fungi, inferred from RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Mycological Research* 101, 1073-1080.

Kiss L, 2001. The role of hyperparasites in host plant-parasitic fungi relationships. In: Jeger MJ, Spence NJ, eds. *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations*. CAB International, Wallingford, UK, 227-236.

Kiss L, 2004. How dangerous is the use of fungal biocontrol agents to nontarget organisms? *New Phytologist* 163, 453-455.

Kiss L, 2008. Intracellular mycoparasites in action: Interactions between powdery mildew fungi and *Ampelomyces*. In: Boddy L, Frankland JC, Wes PV, eds. *Stress in Yeasts and Filamentous Fungi*. London, UK: Academic Press, 37-52. (British Mycological Society Symposia Series; vol. 27.)

Kiss L, Nakasone KK, 1998. Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of powdery mildew fungi. *Current Genetics* 33, 362-367.

Kiss L, Pintye A, Kovacs GM, *et al.*, 2011. Temporal isolation explains host-related genetic differentiation in a group of widespread mycoparasitic fungi. *Molecular Ecology* 20, 1492-1507.

Kiss L, Pintye A, Zséli G, *et al.*, 2010. Microcyclic conidiogenesis in powdery mildews and its association with intracellular parasitism by *Ampelomyces*. *European Journal of Plant Pathology* 126, 445-451.

- Kiss L, Russell JC, Szentiványi O, Xu X, Jeffries P, 2004. Biology and biocontrol potential of *Ampelomyces* mycoparasites, natural antagonists of powdery mildew fungi. *Biocontrol Science and Technology* 14, 635-651.
- Korbie DJ, Mattick JS, 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* 3, 1452.
- Kovács GM, Trappe JM, Alsheikh AM, Bóka K, Elliott TF, 2008. *Imaia*, a new truffle genus to accommodate *Terfezia gigantea*. *Mycologia* 100, 930-939.
- Kuijpers NG, Solis-Escalante D, Bosman L, *et al.*, 2013. A versatile, efficient strategy for assembly of multi-fragment expression vectors in *Saccharomyces cerevisiae* using 60 bp synthetic recombination sequences. *Microbial Cell Factories* 12, 47.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-1874.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA, 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Nature Biotechnology* 9, 963-967.
- Lee S-Y, Lee S-B, Kim C-H, 2004. Biological control of powdery mildew by Q-fect WP (*Ampelomyces quisqualis* 94013) in various crops. *IOBC/WPRS Bulletin* 27, 329-331.
- Legler SE, Pintye A, Caffi T, *et al.*, 2016. Sporulation rate in culture and mycoparasitic activity, but not mycohost specificity, are the key factors for selecting *Ampelomyces* strains for biocontrol of grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*). *European Journal of Plant Pathology* 144, 723-736.
- Li D, Tang Y, Lin J, Cai W, 2017. Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories* 16, 168.
- Li M, Gong X, Zheng J, Jiang D, Fu Y, Hou M, 2005. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters* 243, 323-329.
- Liang C, Yang J, Kovács GM, *et al.*, 2007. Genetic diversity of *Ampelomyces* mycoparasites isolated from different powdery mildew species in China inferred from analyses of rDNA ITS sequences. *Fungal Diversity* 24, 225-240.
- Liu J-Y, Li S-D, Sun M-H, 2016. Transaldolase gene *Tal67* enhances the biocontrol activity of *Clonostachys rosea* 67-1 against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 474, 503-508.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.

- Liyanage KK, Khan S, Brooks S, *et al.*, 2018. Morpho-molecular characterization of two *Ampelomyces* spp. (Pleosporales) strains mycoparasites of powdery mildew of *Hevea brasiliensis*. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-10.
- Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, *et al.*, 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1987-1994.
- Löytynoja A, Goldman N, 2008. Phylogeny-aware gap placement prevents errors in sequence alignment and evolutionary analysis. *Science* 320, 1632-1635.
- Lu Z, Tombolini R, Woo S, Zeilinger S, Lorito M, Jansson JK, 2004. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3073-3081.
- Luo C, Zhao H, Yang X, *et al.*, 2018. Functional analysis of the melanin-associated gene *CmMRI* in *Coniothyrium minitans*. *Frontiers in Microbiology* 9, 2658.
- Lübeck M, Knudsen IMB, Jensen B, Thrane U, Janvier C, Jensen DF, 2002. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. *Mycological Research* 106, 815-826.
- Ma H, Kunes S, Schatz PJ, Botstein D, 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* 58, 201-216.
- Marcos AT, Ramos MS, Marcos JF, Carmona L, Strauss J, Cánovas D, 2016. Nitric oxide synthesis by nitrate reductase is regulated during development in *Aspergillus*. *Molecular Microbiology* 99, 15-33.
- Marraschi R, Ferreira ABM, Da Silva Bueno RN, *et al.*, 2019. A protocol for selection of *Trichoderma* spp. to protect grapevine pruning wounds against *Lasiodiplodia theobromae*. *Brazilian Journal of Microbiology* 50, 213-221.
- Massart S, Jijakli HM, 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. *Journal of Microbiological Methods* 69, 229-241.
- Matheny PB, Liu YJ, Ammirati JF, Hall BD, 2002. Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *American Journal of Botany* 89, 688-698.
- Mendoza-Mendoza A, Pozo MJ, Grzegorski D, *et al.*, 2003. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 15965-15970.
- Menge D, Marthamakobe, 2016. Biological control of cashew powdery mildew using *Ampelomyces quisqualis* Ces. *Journal of Biological Control* 30, 226-235.

Michielse CB, Hooykaas PJ, Van Den Hondel CA, Ram AF, 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics* 48, 1-17.

Michielse CB, Hooykaas PJ, Van Den Hondel CA, Ram AF, 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols* 3, 1671-1678.

Mukherjee PK, Kenerley CM, 2010. Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a VELVET protein, Vel1. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2345-2352.

Nagy LG, Kocsubé S, Csanádi Z, *et al.*, 2012. Re-Mind the Gap! Insertion – Deletion Data Reveal Neglected Phylogenetic Potential of the Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) of Fungi. *PLoS One* 7, e49794.

Navaneetha T, Prasad R, Venkateswara R, 2015. Liquid formulation of *Trichoderma* species for management of gray mold in castor (*Ricinus communis* L.) and Alternaria leaf blight in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Biofertilizers and Biopesticides* 6.

Németh MZ, Pintye A, Horváth ÁN, *et al.*, 2019. Green fluorescent protein transformation sheds more light on a widespread mycoparasitic interaction. *Phytopathology* 109, 1404-1416.

Oldenburg KR, Vo KT, Michaelis S, Paddon C, 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Research* 25, 451-452.

Pardo AG, Hanif M, Raudaskoski M, Gorfer M, 2002. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycological Research* 106, 132-137.

Park MJ, Choi YJ, Hong SB, Shin HD, 2010. Genetic variability and mycohost association of *Ampelomyces quisqualis* isolates inferred from phylogenetic analyses of ITS rDNA and actin gene sequences. *Fungal Biology* 114, 235-247.

Parratt SR, Barres B, Penczykowski RM, Laine AL, 2017. Local adaptation at higher trophic levels: contrasting hyperparasite-pathogen infection dynamics in the field and laboratory. *Molecular Ecology* 26, 1964-1979.

Parratt SR, Laine A-L, 2016. The role of hyperparasitism in microbial pathogen ecology and evolution. *ISME Journal* 10, 1815-1822.

Parratt SR, Laine A-L, 2018. Pathogen dynamics under both bottom-up host resistance and top-down hyperparasite attack. *Journal of Applied Ecology*.

Paulitz TC, Bélanger RR, 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39, 103-133.

Pengkit A, Jeon SS, Son SJ, *et al.*, 2016. Identification and functional analysis of endogenous nitric oxide in a filamentous fungus. *Scientific Reports* 6, 1-14.

Philipp W-D, Grauer U, Grossmann F, 1984. Ergänzende Untersuchungen zur biologischen und integrierten Bekämpfung von Gurkenmehltau unter Glas durch *Ampelomyces quisqualis*/Additional investigations on biological and integrated control of cucumber powdery mildew in greenhouses by *Ampelomyces quisqualis*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 438-443.

Philipp WD, 1985. Extracellular enzymes and nutritional physiology of *Ampelomyces quisqualis* Ces., hyperparasite of powdery mildew, *in vitro*. *Journal of Phytopathology* 114, 274-283.

Pintye A, Bereczky Z, Kovacs GM, *et al.*, 2012. No indication of strict host associations in a widespread mycoparasite: grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) is attacked by phylogenetically distant *Ampelomyces* strains in the field. *Phytopathology* 102, 707-716.

Pintye A, Ropars J, Harvey N, *et al.*, 2015. Host phenology and geography as drivers of differentiation in generalist fungal mycoparasites. *PLoS One* 10, e0120703.

Poulin R, Krasnov BR, Mouillot D, 2011. Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends in Parasitology* 27, 355-361.

Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, *et al.*, 2005. The G protein α subunit Tgal of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology* 42, 749-760.

Reithner B, Schuhmacher R, Stoppacher N, Pucher M, Brunner K, Zeilinger S, 2007. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genetics and Biology* 44, 1123-1133.

Rogers CW, Challen MP, Green JR, Whipps JM, 2004. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiology Letters* 241, 207-214.

Rogers CW, Challen MP, Muthumeenakshi S, Sreenivasaprasad S, Whipps JM, 2008. Disruption of the *Coniothyrium minitans* *PIF1* DNA helicase gene impairs growth and capacity for sclerotial mycoparasitism. *Microbiology* 154, 1628-1636.

Rogers D, 1959. On *Cicinobolus*. *Mycologia* 51, 96-98.

Rotem Y, Yarden O, Sztejnberg A, 1999. The mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* expresses *exgA* encoding an α -1, 3-glucanase in culture and during mycoparasitism. *Phytopathology* 89, 631-638.

- Samuelian S, 2016. Potential of *Trichoderma harzianum* for control of banana leaf fungal pathogens when applied with a food source and an organic adjuvant. *3 Biotech* 6, 8.
- Sarrocco S, Mikkelsen L, Vergara M, Jensen DF, Lübeck M, Vannacci G, 2006. Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. *Mycological Research* 110, 179-187.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671-675.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, *et al.*, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6241-6246.
- Seifert KA, Wingfield BD, Wingfield MJ, 1995. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Canadian Journal of Botany* 73, 760-767.
- Shishkoff N, Mcgrath M, 2002. AQ10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. *Plant Disease* 86, 915-918.
- Silvestro D, Michalak I, 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* 12, 335-337.
- Singh P, Singh S, Tetali S, Lagashetti A, 2017. Biocontrol of powdery mildew of grapes using culture filtrate and biomass of fungal isolates. *Plant Pathology & Quarantine* 7, 181-189.
- Siozios S, Tosi L, Ferrarini A, *et al.*, 2015. Transcriptional reprogramming of the mycoparasitic fungus *Ampelomyces quisqualis* during the powdery mildew host-induced germination. *Phytopathology* 105, 199-209.
- Solomon PS, Ipcho SV, Hane JK, Tan K-C, Oliver RP, 2008. A quantitative PCR approach to determine gene copy number. *Fungal Genetics Reports* 55, 5-8.
- Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, *et al.*, 2010. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science* 330, 1543-1546.
- Speer E, 1979. Beitrag zur Morphologie von *Ampelomyces quisqualis* Ces. *Sydowia* 31, 242-246.
- Staben C, Jensen B, Singer M, *et al.*, 1989. Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics Reports* 36, 79.

- Staden R, Beal KF, Bonfield JK, 1998. The Staden Package. In: Misener S, Krawetz SA, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Totowa, NJ 07512: The Humana Press Inc., 115-130. (132.)
- Stamatakis A, 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312-1313.
- Stiller JW, Hall BD, 1997. The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 4520-4525.
- Stöver BC, Müller KF, 2010. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11, 7.
- Sullivan RF, White JF, 2000. *Phoma glomerata* as a mycoparasite of powdery mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 425-427.
- Sun Z-B, Wang Q, Sun M-H, Li S-D, 2019. The heat shock protein 70 gene is involved for colony morphology, sporulation and mycoparasitism of *Clonostachys rosea*. *FEMS Microbiology Letters* 366, fnz188.
- Sun Z-B, Wang Q, Zhang J, *et al.*, 2018. The transcription factor-encoding gene *crtf* is involved in *Clonostachys chloroleuca* mycoparasitism on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiological Research* 210, 6-11.
- Sundheim L, Krekling T, 1982. Host-parasite relationships of the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and its powdery mildew host *Sphaerotheca fuliginea*. *Journal of Phytopathology* 104, 202-210.
- Sz. Nagy G, Kiss L, 2006. A check-list of powdery mildew fungi of Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 41, 79-91.
- Szentiványi O, Kiss L, 2003. Overwintering of *Ampelomyces* mycoparasites on apple trees and other plants infected with powdery mildews. *Plant Pathology* 52, 737-746.
- Szentiványi O, Kiss L, Russell JC, *et al.*, 2005. *Ampelomyces* mycoparasites from apple powdery mildew identified as a distinct group based on single-stranded conformation polymorphism analysis of the rDNA ITS region. *Mycological Research* 109, 429-438.
- Sztejnberg A, Galper S, Mazar S, Lisker N, 1989. *Ampelomyces quisqualis* for biological and integrated control of powdery mildews in Israel. *Journal of Phytopathology* 124, 285-295.
- Tack AJ, Laine A-L, 2014. Spatial eco-evolutionary feedback in plant-pathogen interactions. *European Journal of Plant Pathology* 138, 667-677.

- Takasaki K, Shoun H, Yamaguchi M, *et al.*, 2004. Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. Role of acetyl CoA synthetase in anaerobic ATP synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 12414-12420.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, *et al.*, 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31, 21-32.
- Thines M, Crous PW, Aime MC, *et al.*, 2018. Ten reasons why a sequence-based nomenclature is not useful for fungi anytime soon. *IMA Fungus* 9, 177-183.
- Tollenaere C, Pernechele B, Makinen HS, *et al.*, 2014. A hyperparasite affects the population dynamics of a wild plant pathogen. *Molecular Ecology* 23, 5877-5887.
- Tomsett AB, Garrett RH, 1980. The isolation and characterization of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 95, 649-660.
- Vági P, Knapp DG, Kósa A, Seress D, Horváth ÁN, Kovács GM, 2014. Simultaneous specific in planta visualization of root-colonizing fungi using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mycorrhiza* 24, 259-266.
- Voigt K, Wöstemeyer J, 2000. Reliable amplification of actin genes facilitates deep-level phylogeny. *Microbiological Research* 155, 179-195.
- Wei W, Zhu W, Cheng J, *et al.*, 2016. Nox complex signal and MAPK cascade pathway are cross-linked and essential for pathogenicity and conidiation of mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Scientific Reports* 6, 1-13.
- Whelan JA, Russell NB, Whelan MA, 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods* 278, 261-269.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press, 315-322. (18.)
- Winston F, Dollard C, Ricupero-Hovasse SL, 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11, 53-55.
- Wittrup K, Benig V, 1994. Optimization of amino acid supplements for heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Techniques* 8, 161-166.
- Woo S, Donzelli B, Scala F, *et al.*, 1999. Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 419-429.

- Woodward R, 1927. Studies on *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) Salm. I. The mode of perennation. *Transactions of the British Mycological Society* 12, 173-204.
- Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ, 1999. A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 40, 711-717.
- Xu X, Robinson J, Jeger M, Jeffries P, 2010. Using combinations of biocontrol agents to control *Botrytis cinerea* on strawberry leaves under fluctuating temperatures. *Biocontrol Science and Technology* 20, 359-373.
- Yarwood CE, 1939. An overwintering pycnidial stage of *Cicinnobolus*. *Mycologia* 31, 420-422.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL, 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134.
- Zeilinger S, 2004. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Current Genetics* 45, 54-60.
- Zeilinger S, Reithner B, Scala V, Peissl I, Lorito M, Mach RL, 2005. Signal transduction by Tga3, a novel G protein α subunit of *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1591-1597.
- Zhou Z, Takaya N, Nakamura A, Yamaguchi M, Takeo K, Shoun H, 2002. Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1892-1896.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok témavezetőimnek, Dr. Kiss Leventének és Dr. Kovács M. Gábornak, akik munkájukkal, tanácsaikkal és építő kritikáikkal segítették szakmai fejlődésemet és példájukkal formálták a kutatómunkához való hozzáállásomat.

Hálás vagyok Dr. Markus Gorfernek, amiért lehetővé tette, hogy két hónapot töltsék az Austrian Institute of Technology kutatóhelyén Tullnban, és hogy megismertett olyan módszerekkel, amelyek nélkül a dolgozatban szereplő munka nem valósulhatott volna meg.

Köszönöm Dr. Vági Pálnak a konfokális mikroszkópos, Horváth Áronnak a statisztikai elemzésekkel kapcsolatos, és Dr. Pintye Alexandrának a kísérletes munkákban nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Szövényi Péternek a nem publikált szekvenciaadatok rendelkezésre bocsátását. Köszönöm a nélkülözhetetlen technikai segítséget Rohm Csillának, Csorba Ildikónak és Dr. Tóth Endrének.

Köszönöm az ATK Növényvédelmi Intézet minden dolgozójának, és különösen a Növénykórtani Osztály kutatóinak, hogy munkámat mindig barátságos és kellemes légkörben végezhettem.

Köszönöm feleségemnek és családomnak, hogy a munkám során mellettem álltak, segítettek és támogattak.

A dolgozatban szereplő kutatást az OTKA/NKFIH (NN100415), az Osztrák-Magyar Akció Alapítvány (90öu16) és a Széchenyi 2020 program, Magyarország Kormánya és az Európai Regionális Fejlesztési Alap (GINOP-2.3.2-15-2016-00061) támogatták.

FÜGGELÉK

F1. táblázat. A filogenetikai vizsgálatainkba vont összes *Ampelomyces*-törzs és a külsoportot alkotó két taxon származási helyének és izolálási időpontjának, valamint az eredeti gazda lisztharmat gombafajának listája és az elemzésekhez használt, korábban meghatározott ITS és *ACT1* szekvenciák GenBank azonosítószámai. Az újonnan izolált törzseket vastag szedve jelöltük.

A törzs jelölése	Lisztharmatfaj, amelyből izolálták	Lisztharmat gazdanövénye	Gyűjtés éve	Gyűjtés helye	ITS génbaki azonosító	ACT1 génbaki azonosító
263	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Artemisia absinthium</i>	1974	Kanada	AF035782	
2931A-a	<i>Podosphaera plantaginis</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	2013	Finnország	KM066092	
3616A-a	<i>Podosphaera plantaginis</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	2013	Finnország	KM066096	
9031A-a	<i>Podosphaera plantaginis</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	2013	Finnország	KM066093	
9031B-a	<i>Podosphaera plantaginis</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	2013	Finnország	KM066091	
9031C-a	<i>Podosphaera plantaginis</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	2013	Finnország	KM066097	
A10-a	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124896	
A11-a	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124897	
A38-a	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124915	
A45-a	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124920	
A47-b	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124921	
A62-b	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124924	
A66-a	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124926	
A93-b	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124935	
A97	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124938	
A109-a	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124945	
A110-b	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	2007	Magyarország	HM124947	
ALA1-a	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Lactuca</i> sp.	2008	Franciaország	HM124956	
AQ10	<i>Oidium</i> sp.	<i>Catha edulis</i>	-	Izrael	AF035783	
ATCC200245	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis</i> sp.	1989	USA	HM125018	JN621870
ATCC200246	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis riparia</i>	1991	USA	HM125015	JN621866
ATCC200247	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis riparia</i>	1992	USA	JN417758	JN621867
ATCC200248	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis riparia</i>	1991	USA	HM125016	JN621868
ATCC200250	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis riparia</i>	1991	USA	HM125017	JN621869
ATCC201056	<i>Arthrocladiella mougeotii</i>	<i>Lycium halimifolium</i>	1990	Magyarország	AF035780	JN621873
B61	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus robusta</i>	2008	Franciaország	HM124960	
B71	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus domestica</i>	2008	Egyesült Királyság	JN417760	JN621883

B78	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus domestica</i>	2008	Egyesült Királyság	JN417761	JN621884
B91	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus domestica</i>	2008	Egyesült Királyság	JN417762	JN621885
B100	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus domestica</i>	2008	Egyesült Királyság	JN417763	JN621886
B102	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus brevipes</i>	2008	Egyesült Királyság	JN417764	JN621887
B124-a	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus domestica</i>	2008	Magyarország	HM124964	JN621888
B133	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus domestica</i>	2008	Magyarország	JN417765	JN621889
Bgr2014	<i>Blumeria graminis</i>	<i>Agropyron tsukushiense</i>	2014	Dél-Korea		
BgrA	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
BgrB	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
BgrC	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
BgrD	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
BgrE	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
BgrF	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
BgrG	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
BgrH	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
BgrI	<i>Blumeria graminis</i>	nem azonosított fűféle	2009	Csehország		
CBS12979	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	1975	Kanada	HQ108038	
CBS13079	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	1975	Kanada	U82449	
CBS13131	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>	1931	USA	AF035781	
CBS13179	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	1975	Kanada	HQ108040	
CBS13332	<i>Erysiphe alni</i>	<i>Lonicera</i> sp.	1932	USA	HM124974	
CBS132219	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417738	JN621846
CBS132220	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417739	JN621847
CBS132221	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417749	JN621857
CBS132222	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417750	JN621858
CBS132223	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417751	JN621859
CBS132224	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417752	JN621860
CBS132225	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417753	JN621861
CBS132226	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417756	JN621864
CBS132227	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417757	JN621865
CBS132346	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417754	JN621862
CBS132347	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417714	JN621822
DSM2222	<i>Golovinomyces</i> sp.	<i>Cucumis</i> sp.		Németország	U82450	JN621871
G2	<i>Erysiphe polygoni</i>	<i>Polygonum</i> sp.	2002	Magyarország	DQ490770	
GW	<i>Erysiphe cynoglossi</i>	<i>Echium</i> sp.	2008	Franciaország	HM124984	
GYER	<i>Erysiphe arcuata</i>	<i>Carpinus betulus</i>	2008	Magyarország	HM124983	
HMLAC226	<i>Erysiphe polygoni</i>	<i>Polygonum aviculare</i>	2003	Kína	DQ490766	JN621872
KACC43563	<i>Blumeria graminis</i>	<i>Diarrhena japonica</i>	2006	Dél-Korea		

KACC43587	<i>Blumeria graminis</i>	<i>Diarrhena japonica</i>	2007	Dél-Korea		
KACC44850	<i>Blumeria graminis</i>	<i>Agropyron sp.</i>	2009	Csehország		
KACC44851	<i>Blumeria graminis</i>	<i>Piptatherum virescens</i>	2009	Csehország		
KACC44853	<i>Blumeria graminis</i>	<i>Diarrhena japonica</i>	2009	Dél-Korea		
LP1-a	<i>Neoerysiphe galeopsidis</i>	<i>Lamium purpureum</i>	2013	Magyarország		
LP1-b	<i>Neoerysiphe galeopsidis</i>	<i>Lamium purpureum</i>	2013	Magyarország		
LP1-c	<i>Neoerysiphe galeopsidis</i>	<i>Lamium purpureum</i>	2013	Magyarország		
Ls1-a	<i>Erysiphe australiana</i>	<i>Lagerstroemia sp.</i>	2014	Franciaország		
LV2-b	<i>Erysiphe sp.</i>	<i>Ligustrum vulgare</i>	2007	Magyarország	HM124990	JN621892
MA6-b	<i>Erysiphe berberidis</i>	<i>Mahonia aquifolium</i>	2007	Magyarország	HM124996	JN621893
MA8	<i>Erysiphe berberidis</i>	<i>Mahonia aquifolium</i>	2007	Magyarország	HM124997	JN621894
MF13309A-b	<i>Podosphaera plantaginis</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	2013	Finnország	KM066094	
MF13309B-a	<i>Podosphaera plantaginis</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	2013	Finnország	KM066095	
MYA-3396	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Malus domestica</i>	2002	Egyesült Királyság	AY663818	JN621882
PC1-a	<i>Podosphaera leucotricha</i>	<i>Pyrus calleryana</i>	2014	Magyarország		
RS1-a	<i>Podosphaera pannosa</i>	<i>Rosa sp.</i>	2007	Magyarország	HM125010	JN621896
RU1-b	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Rudbeckia sp.</i>	2007	Magyarország	HM125006	
RU2-a	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Rudbeckia sp.</i>	2007	Magyarország	HM125007	
RU4-b	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Rudbeckia sp.</i>	2007	Magyarország	HM125008	
RU5-a	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Rudbeckia sp.</i>	2007	Magyarország	HM125009	
TP	<i>Erysiphe trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	2007	Franciaország	HM125019	JN621895
TRb	<i>Erysiphe trifolii</i>	<i>Trifolium sp.</i>	2007	Magyarország		
Vitis1	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417710	JN621818
Vitis9	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417711	JN621819
Vitis12	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417713	JN621821
Vitis21	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417715	JN621823
Vitis23	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417716	JN621824
Vitis25	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417717	JN621825
Vitis26	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417718	JN621826
Vitis30	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417719	JN621827
Vitis32	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417720	JN621828
Vitis34	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417721	JN621829
Vitis35	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417722	JN621830
Vitis38	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417723	JN621831
Vitis42	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417725	JN621833
Vitis44	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417726	JN621834
Vitis45	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417727	JN621835
Vitis46	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417728	JN621836

Vitis49	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417729	JN621837
Vitis50	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417730	JN621838
Vitis51	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417731	JN621839
Vitis55	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417732	JN621840
Vitis56	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417733	JN621841
Vitis60	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417734	JN621842
Vitis61	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417735	JN621843
Vitis66	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417736	JN621844
Vitis68	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417737	JN621845
Vitis72	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417740	JN621848
Vitis79	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Olaszország	JN417743	JN621851
Vitis81	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417744	JN621852
Vitis83	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417745	JN621853
Vitis91	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417746	JN621854
Vitis94	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417747	JN621855
Vitis98	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417748	JN621856
Vitis114	<i>Erysiphe necator</i>	<i>Vitis vinifera</i>	2009	Magyarország	JN417755	JN621863

Külcsoport

<i>Phoma glomerata</i> ATCC38616	<i>Podosphaera macularis</i>	-	-	Oroszország	AF035779	
<i>Phoma herbarum</i> JCM15942	-	-	2007	Japán		

F2. táblázat. A három statisztikai módszerekkel elemzett adatsor (GYER és RS1-a vad típus és transzformánsok növekedési adatai, illetve RS1-a vad típusú törzs és transzformánsok mikoparazita képessége) leíró statisztikája, a Levene szóráshomogenitási teszt és a normalitásteszt részletei.

Leíró statisztika - GYER transzformánsok növekedési				Leíró statisztika – RS1-a transzformánsok			
Transzformáns	Átlag	Szórás	Mérések száma	Transzformáns	Átlag	Szórás	Mérések száma
Y6	468,320	45,941	7	A2	282,665	51,767	8
B9	299,831	31,521	8	B3	359,415	75,190	8
L1	435,372	26,719	8	C10	224,156	50,232	8
P1	438,591	42,280	8	E2	297,260	76,026	8
Q7	573,843	34,467	8	F13	225,435	74,868	8
W6	208,580	76,876	8	G4	171,675	32,152	8
GYER vad típus	302,796	24,180	8	J1	228,953	61,183	8
összesen	388,188	123,872	55	RS1-a vad	245,322	73,366	8
				összesen	254,360	80,744	64
Levene-próba szóráshomogenitási teszt				Levene-próba szóráshomogenitási teszt			
F	df1	df2	Szignifikancia	F	df1	df2	Szignifikancia
3,875	6	48	0,003	1,488	7	56	0,190
Normalitásteszt				Normalitásteszt			
Kolmogorov-Smirnov teszt				Kolmogorov-Smirnov teszt			
statisztika	df	Szignifikancia		statisztika	df	Szignifikancia	ferdeség
0,067	55	0,200*		0,110	64	0,051	0,299
				lapultság			
				0,590			

leíró statisztika – RS1-a mikoparazitizmus adatai			
Transzformáns	Átlag	Szórás	mérések
A2	917,108	89,714	9
B3	881,836	155,950	9
C10	890,653	227,190	9
E2	899,473	266,199	9
F13	758,378	143,688	9
G4	864,200	165,740	9
J1	723,105	62,042	9
RS1-a vad	811,290	66,138	9
Total	843,255	168,194	72
Levene-próba szóráshomogenitási teszt			
F	df1	df2	Szignifikancia
4,679	7	64	0,000
Normalitásteszt			
Kolmogorov-Smirnov teszt			
statisztika	df	Szignifikancia	
0,074	72	0,200*	

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Németh Z. Márk**
MTMT-azonosító: 10043624
A doktori értekezés címe és alcíme: Transzformációs és további molekuláris módszerek alkalmazása az *Ampelomyces* hiperparazita gombák biológiájának tanulmányozására
DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2020.044
A doktori iskola neve: ELTE Biológia Doktori Iskola
A doktori iskolán belüli doktori program neve: Kísérletes Növénybiológia Doktori Program
A témavezető neve és tudományos fokozata: Kovács M. Gábor DSc; Kiss Levente DSc
A témavezető munkahelye: (1) ELTE TTK Biológiai Intézet, Növény szervezettani Tanszék és Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézet; (2) Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézet és Centre for Crop Health, University of Southern Queensland, Ausztrália

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2020. március 25.



a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. SZ. MELLÉKLET