

Az NN100415. számú OTKA/NKFIH-projekt ZÁRÓJELENTÉSE

Projekt címe: Gazda-parazita kölcsönhatások egy gyakori tritrofikus rendszerben

Projekt időtartama: 2012. május 1. - 2017. április 30. (4+1 év)

Támogatás összege: 40 MFt

Vezető kutató: Dr. Kiss Levente, az MTA Doktora

Résztvevő kutatók: Hegedűsné Dr. Pintye Alexandra
Kassainé Dr. Jáger Edit
Dr. Kovács M. Gábor
Dr. Molnár Orsolya Eszter
Németh Márk

Megvalósítás helye: MTA Agrártudományi Kutatóközpont
Növényvédelmi Intézet
1022 Budapest, Herman Ottó út 15.

Nemzetközi együttműködő

partner: Dr. Tatiana Giraud
CNRS és Univ. Paris-Sud XI.
Franciaország

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS

- 1.1. *A vizsgált tritrofikus rendszer rövid ismertetése* 3
- 1.2. *A projekt eredeti célkitűzései* 4
- 1.3. *Az OTKA-projekt megvalósításához kapcsolódó egyéb anyagi források* 4

2. FONTOSABB, PUBLIKÁLT EREDMÉNYEK

- 2.1. *Ampelomyces-törzsek genetikai elemzése mikroszatellit-markerekkel, különös tekintettel a gazdaspecializáció kérdéseire* 5
- 2.2. *qPCR-módszer kidolgozása Ampelomyces mikoparaziták kvantitatív kimutatása érdekében* 5
- 2.3. *A búzalisztharmatot okozó Blumeria graminis életsiklusa egyik lépésének feltárása* 6
- 2.4. *Egy módszer kidolgozása a szőlőlisztharmat áttelelő alakja életképességének ellenőrzésére* 6
- 2.5. *Ampelomyces-törzsek szelekciója egy szőlőlisztharmat elleni biofungicid kidolgozása érdekében* 7

3. FONTOSABB, RÖVIDESEN PUBLIKÁLÁSRA KERÜLŐ EREDMÉNYEK

- 3.1. *Ampelomyces-törzsek GFP-transzformálása* 7
- 3.2. *Az intracelluláris piknídium-lokalizáció vizsgálata* 7
- 3.3. *Az Ampelomyces-nemzetség revíziója molekuláris alapokon* 8

4. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI 10

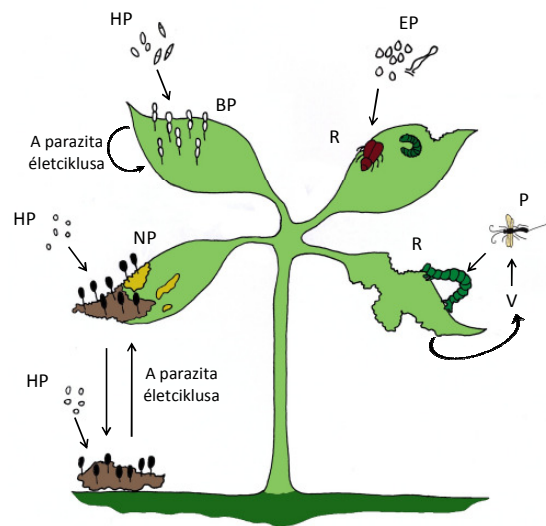
5. A PROJEKT EDDIGI PUBLIKÁCIÓI 10

6. EGYÉB IDÉZETT SZAKIRODALOM 10

1. BEVEZETÉS

1.1. A vizsgált tritrofikus rendszer rövid ismertetése

A növények és növénykórokozók/növényparaziták közötti kapcsolatot hagyományosan két fajból álló rendszernek tekintik, jóllehet mind a gazdafaj, mind pedig annak élősködője valójában leggyakrabban egy komplex, multitrofikus interakciókból álló rendszer része (**1. ábra**), ahol a parazita gyakran áldozatul esik egy következő trofikus szintet képviselő antagonistának (Kiss 2001). Ez utóbbi szervezetet hiperparazitának tekintjük, abba az esetben pedig, amikor a növénykórokozó egy gombafajt képvisel, a hiperparazitákat mikoparazitának is nevezhetjük. A lisztharmatgombák (Erysiphales), mint számos vadon élő és gazdaságilag jelentős termesztett növényfaj obligát biotróf kórokozói, ill. parazitái, a természetben gyakran maguk is paraziták gazdaszervezeteivé válnak. A lisztharmatgombák legismertebb miko- ill. hiperparazitái az *Ampelomyces* nemzetségbe tartozó piknídiumos gombák, amelyek jórészt intracelluláris életmódot folytatnak a lisztharmat-telepeken (Kiss 2008). Egyes *Ampelomyces*-törzsek biofungicid termékek hatóanyagaként már kereskedelmi forgalomba is kerültek az Európai Unióban, az Egyesült Államokban, Dél-Koreában, Indiában, és másutt. A gazdanövények, lisztharmatgombák és *Ampelomyces* mikoparaziták közötti kölcsönhatások a specializálódott tritrofikus kapcsolatrendszerek egyik iskolapéldáját jelentik (Kiss *et al.* 2011).



1. ábra. Tritrofikus kapcsolatrendszerek gazdanövények, biotróf paraziták (BP), nekrotróf paraziták (NP), hiperparaziták (HP), entomopatogén gombák (EP), növénykártevő rovarok (R) és parazitoidok (P) között. Kiss (2001) alapján készítette Hegedűsné Dr. Pintye Alexandra.

1.2. A projekt eredeti célkitűzései

A 2012. május 1-én, az NN-típusú OTKA/NKFIH projektek szabályainak megfelelően nemzetközi (konkrétan francia) együttműködésben megkezdett projekt eredeti, a pályázatban szereplő legfontosabb célkitűzései a következők voltak:

- Nagyszámú *Ampelomyces*-törzs izolálása szőlőlisztharmatból és egyszikűeket fertőző *Blumeria graminis*-telepekből
- A törzsgyűjteményünkben már meglévő *Ampelomyces*-törzsek jellemzése alapján újabb, filogenetikai elemzésekre alkalmas régiók azonosítása
- Gazdanövények fiziológiai állapotának a lisztharmat-mikoparazitizmusra gyakorolt hatását vizsgáló kísérletek beállítása
- A nemzetközi együttműködésben kidolgozott 10 új *Ampelomyces*-specifikus mikroszatellit marker tesztelése
- Az intracelluláris piknídium-lokalizáció vizsgálata különböző *Ampelomyces*-törzsek és különböző lisztharmatgombafajok esetében, a gazdanövények fiziológiai állapotának függvényében
- *Ampelomyces*-törzsek közötti kompetíció vizsgálata különböző gazdanövény- és lisztharmatgombafajok esetében

1.3. Az OTKA/NKFIH-projekt megvalósításához kapcsolódó egyéb anyagi források

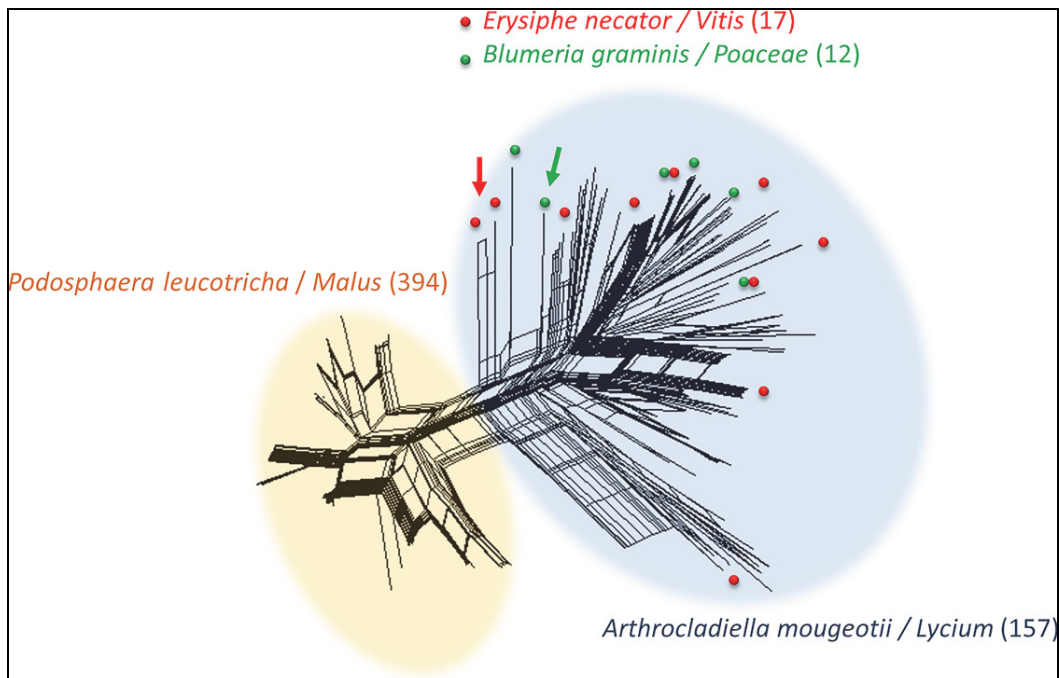
A vezető kutató, Kiss Levente, 2008. július 1. – 2011. március 31. között a „222045-BCA_grape” azonosítójú EU FP7 „Capacities” projekt egyik vezető kutatója volt. Az EU-projekt célját a szőlőlisztharmat elleni biológiai védekezésben felhasználható *Ampelomyces*-törzsek vizsgálata jelentette. Az NN100415 projektben felhasználtuk az EU-program keretében született eredmények egy részét, elsősorban a kifejlesztett mikroszatellit-markereket és a szőlőlisztharmatból általunk izolált *Ampelomyces*-törzseket (Pintye *et al.* 2012).

Emellett a projekt tematikájába tartozó, azokat kiegészítő kutatásokat 2015. május 1. - 2016. április 30. között az Osztrák-Magyar Akció Alapítvány (OMAA, ASO) egy kisösszegű támogatással segítette. A publikációkban, amikor ez indokolt volt, az NKFIH támogatása mellett feltüntettük az EU-projekt támogatását is (Pintye *et al.* 2016). Az OMAA-támogatással megvalósult kutatómunka publikálása folyamatban van (lásd 3.1 pont).

2. FONTOSABB, PUBLIKÁLT EREDMÉNYEK

2.1. *Ampelomyces*-törzsek genetikai elemzése mikroszatellit-markerekkel, különös tekintettel a gazdaspecializáció kérdéseire

A francia partnerekkel együttműködve elemeztük több mint 600, zömmel általunk, különböző lisztharmatgombafajokból és Európa különböző régióiban izolált *Ampelomyces*-törzs mikroszatellit-genotípusait. Az elemzésben szereplő legtöbb törzs az almát, ördögcérnát (*Lycium halimifolium*-ot), szőlőt és vadon élő fűféléket fertőző lisztharmatgombafajokból származott (2. ábra). Az eredmények (Pintye *et al.* 2015) teljes mértékben alátámasztották korábbi, az *Ampelomyces* hiperparaziták időbeli izolációjára vonatkozó elméletünket (Kiss *et al.* 2011).



2. ábra. Összesen 637 *Ampelomyces*-törzs öt mikroszatellit markerrel meghatározott genotípusainak SplitsTree-analízise. A tavasszal, almalisztharmatból (*Podosphaera leucotricha*-ból) izolált törzsek egyértelműen elkülönültek az őszei, számos más lisztharmatgombafajból izolált törzstől. Forrás: Pintye *et al.* (2015).

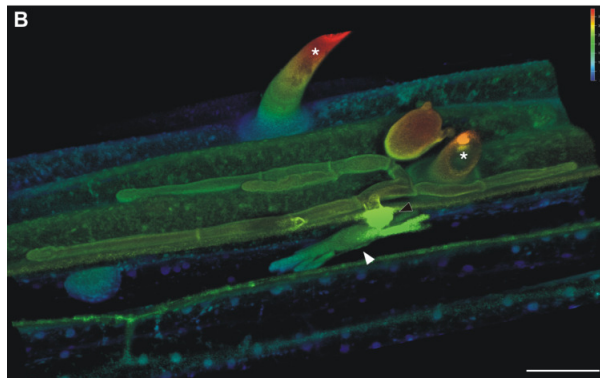
2.2. qPCR-módszer kidolgozása Ampelomyces mikoparaziták kvantitatív kimutatása érdekében

A Helsinki Egyetem Prof. Anna-Liisa Laine által vezetett csoportja több mint egy évtizede folyamatosan kiterjedt genetikai és ökológiai vizsgálatokat végez egy

természetes gazda-parazita (lándzsás útifű - *Podosphaera plantaginis* lisztharmatgomba) kapcsolatrendszerre vonatkozóan, több mint 400 helyszínen Finnországban (pl. Jousimo *et al.* 2014). A csoporttal együttműködve *Ampelomyces*-törzseket izoláltunk néhány mintavételi területen, és kidolgoztunk egy qPCR-módszert, mellyel a több mint 10 éve folyamatosan begyűjtött és tárolt finn mintákban kvantitatív módon kimutattuk a mikoparaziták jelenlétét (Tollenaere *et al.* 2014).

2.3. A búzalisztharmatot okozó *Blumeria graminis* életciklusa egyik lépésének feltárása

A *B. graminis* gazdasági jelentősége folytán egyike a legintenzívebben vizsgált növénykórokozóknak. A projektben elsősorban az *Ampelomyces* mikoparaziták gazdagombájaként vizsgáltuk. Ugyanakkor kiderült, hogy életciklusának egy részlete, az aszkospórás (primer) fertőzések folyamata mindeddig nem kellően feltárt, és strukturális szempontból egyáltalán nem ismert. A folyamat megismerése érdekében laboratóriumi és szabadföldi kísérleteket végeztünk, és fény- valamint konfokális mikroszkóppal (**3. ábra**) dokumentáltuk a *B. graminis* aszkospórás fertőzésének folyamatát több mint 200 csírázott aszkospóra esetében (Jankovics *et al.* 2015).



3. ábra. A *B. graminis* egy aszkospórájának csírázása, és a fertőzés kezdeti lépései búza levelén. Forrás: (Jankovics *et al.* 2015).

2.4. Egy módszer kidolgozása a szőlőlisztharmat áttelelő alakja életképességének ellenőrzésére

A szőlőlisztharmattal kapcsolatos kutatásaink során kidolgoztunk egy komplex, kétféle (korábban már ismert) mikroszkópos festési eljárásra (FDA és EtBr használatára) épülő módszert, amely lehetővé teszi különböző lisztharmatgombák áttelelő képletei életképességének meghatározását (Vági *et al.* 2016).

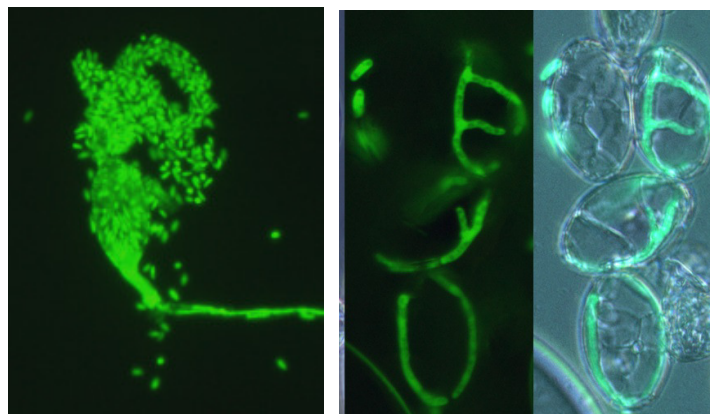
2.5. *Ampelomyces*-törzsek szelekciója egy szőlőlisztharmat elleni biofungicid kidolgozása érdekében

A 2011-ben lezárt EU FP7-es projektben szőlőlisztharmatból (Pintye *et al.* 2012), ill. még korábban izolált törzseket (Kiss *et al.* 2011) a jelen projekt keretében tovább vizsgáltuk, laboratóriumi és szabadföldi körülmények között meghatározott tulajdonságaik komplex elemzése érdekében. Megállapítottuk, hogy a törzs-szelekció legfontosabb kritériumát nem a más kutatócsoportok által feltételezett, ám általunk nem igazolt gazdagomba-specializáció, hanem a tenyésztésben történő sporuláció és a mikoparazitizmus mértéke jelenti (Pintye *et al.* 2016).

3. FONTOSABB, RÖVIDESEN PUBLIKÁLÁSRA KERÜLŐ EREDMÉNYEK

3.1. *Ampelomyces*-törzsek GFP-transzformálása

A projektben vizsgált tritrofikus kapcsolatrendszer jobb megértését teszi lehetővé két, *Ampelomyces*-törzs sikeres GFP (Green Fluorescent Protein, Zöld Fluoreszkáló Fehérje)-transzformációja (**4. ábra**). Nemzetközi szinten ez az első sikeres *Ampelomyces*-transzformáció. A transzformánsok mikoparazita tulajdonságait öt, gazdaságilag jelentős lisztharmatgombafajban ellenőriztük. A transzformációt a bécsi BOKU és az Austrian Institute of Technology (Tulln, Ausztria) munkatársaival együttműködve végeztük, részben az OMAA támogatásával. Az eredményeket tartalmazó publikáció előkészítés alatt áll.

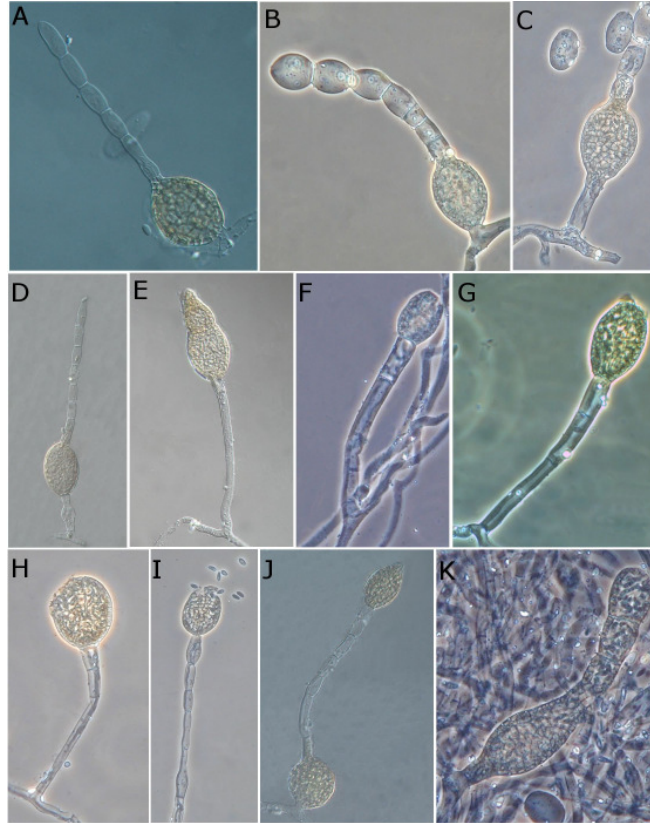


4. ábra. GFP-t kifejező *Ampelomyces*-transzformáns intracelluláris piknídiuma (balra) és hifái (jobbra) lisztharmatgombák struktúráiban.

3.2. Az intracelluláris piknídium-lokalizáció vizsgálata

Összesen 20, különböző lisztharmatgombából izolált, rDNS ITS és aktin gén szekvenciáik alapján különböző *Ampelomyces*-törzs felhasználásával megvizsgáltuk,

vajon a gazdagomba morfológiai tulajdonságai vagy a törzsek sajátosságai magyarázzák-e az eltéréseket az intracelluláris *Ampelomyces*-piknídiumoknak a parazitált lisztharmatgombák konídiumtartóiban megfigyelt lokalizációja (**5. ábra**) terén? Az eredmények összegzése és publikálása folyamatban van.



5. ábra. *Ampelomyces*-piknídiumok különböző lisztharmatgombák konídiumtartóiban.

3.3. Az *Ampelomyces*-nemzetség revíziója molekuláris alapokon

Meghatároztuk összesen 115, különböző földrajzi régiókban, különböző lisztharmatgomba-fajokból izolált *Ampelomyces*-törzs filogenetikai viszonyait négy lókus (ITS, ACT1, RPB1 és EukNR) általunk meghatározott szekvenciáinak elemzése alapján. A munka eredménye hat új *Ampelomyces*-faj elkülönítése. Ezek formális leírása folyamatban van. A **6. ábra** az *Ampelomyces*-nemzetségben teljes egészében általunk feltárt nitrát-reduktáz (*EukNR*) gén szekvenciáira épülő elemzés eredményét mutatja.



6. ábra. Az elemzésbe bevont *Ampelomyces*-törzsek nitrát-reduktáz (*EukNR*) szekvenciák alapján (*maximum likelihood* módszerrel) készített egyszerűsített törzsfája. Az Rs1-a törzs *EukNR* szekvenciájával azonos szekvenciákkal rendelkező törzseket az áttekinthetőség érdekében nem tüntettük fel az ábrán. A törzsfá élein látható számok az adott csoportok megbízhatóságának mértékét („támogatottságot”) jelölik (százalékos értékek). Ezeket 1000 *bootstrap*-ismétlésből számoltuk. A kládok mindegyikénél erős támogatottsági értékeket kaptunk. A mérce 0,5 várható változást jelöl pozícióként és áganként.

4. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI

* Az EU FP7 „222045-BCA_grape” projekt keretében 2008-2011 között, valamint korábban szelektált törzseket a jelen projektben új módszereket is kidolgozva tovább vizsgáltuk. A szelektált törzsek európai KKV-k (Kis és Közepes Vállalkozások) K+F portfólióinak részei.

* Két *Ampelomyces*-törzs sikeres genetikai transzformációja megnyitotta az utat olyan transzformánsok előállítására, amelyek a vad-típusoknál hatékonyabban képesek elpusztítani a lisztharmat-telepeket. Az eredmények iránt egy Egyesült Államokbeli cég mutatott érdeklődést.

5. A PROJEKT EDDIGI PUBLIKÁCIÓI

Tollenaere C, Pernechele B, Mäkinen HS, Parratt SR, Németh MZ, Kovács GM, Kiss L, Tack AJM, A-L Laine (2014) A hyperparasite affects the population dynamics of a wild plant pathogen. *Molecular Ecology* 23: 5877-5887.

Pintye A, Ropars J, Harvey N, Shin H-D, Leyronas C, Nicot PC, Giraud T, Kiss L (2015) Host phenology and geography as drivers of differentiation in generalist fungal mycoparasites. *PLoS ONE* 10(3): e0120703.

Jankovics T, Komáromi J, Fábrián A, Jager K, Vida G, Kiss L (2015) New insights into the life cycle of the wheat powdery mildew: direct observation of ascospore infection in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 105: 797-804.

Vági P, Caffi T, Váczy K, Kiss L (2016) Refining a method for ascospore viability testing in overwintering chasmothecia of *Erysiphe necator*. *European Journal of Plant Pathology* 144: 799-802.

Legler SE, Pintye A, Caffi T, Gulyás S, Bohár G, Rossi V, Kiss L (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.

6. EGYÉB IDÉZETT SZAKIRODALOM

Jousimo J, Tack AJ, Ovaskainen O, Mononen T, Susi H, Tollenaere C, Laine AL. 2014. Ecological and evolutionary effects of fragmentation on infectious disease dynamics. *Science* 344: 1289-1293.

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

Kiss L (2008) Intracellular mycoparasites in action: interactions between powdery mildew fungi and *Ampelomyces*. In: SV Avery, M Stratford, P van West (ed.) *Stress in Yeasts and Filamentous Fungi*. London: Academic Press, pp. 37-52.

Kiss L, Pintye A, Kovács GM, Jankovics T, Fontaine M, Harvey N, Xu X, Nicot PC, Bardin M, Shykoff JA, Giraud T (2011) Temporal isolation explains host-related genetic differentiation in a group of widespread mycoparasitic fungi. *Molecular Ecology* 20: 1492-1507.

Pintye A, Bereczky Z, Kovács GM, Nagy LG, Xu X, Legler SE, Váczy Z, Váczy KZ, Caffi T, Rossi V, Kiss L (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.