

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

HORVÁTH N. ÁRON

GÖDÖLLŐ

2024



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI
EGYETEM

A SZŐLŐ FEKETEROTHADÁSÁT OKOZÓ
PHYLLOSTICTA AMPELICIDA QOI FUNGICIDEKKEL
SZEMBENI ÉRZÉKENYSÉGÉNEK ÉS *CITOKRÓM B*
GÉNJÉNEK JELLEMZÉSE

DOI: 10.54598/005490

HORVÁTH N. ÁRON
BUDAPEST
2024

Doktori iskola megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője:

Zámboriné Dr. Németh Éva

Egyetemi tanár, az MTA doktora

Magyar Agrár- és Élettudományi
Egyetem

Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető:

Dr. Bereczky Zsolt

Kutatási vezető

Saniplant Biotechnológiai Kutató és
Fejlesztő Kft.

Társtémavezető:

Prof. Dr. Palkovics László Amand

Egyetemi tanár

Széchenyi István Egyetem, MÉK,

Növénytudományi Tanszék

.....
Zámboriné Dr. Németh Éva
Iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Bereczky Zsolt
Témavezető jóváhagyása

.....
Prof. Dr. Palkovics László Amand
Társtémavezető jóváhagyása

1 A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A szőlő feketerothadását a *Phyllosticta ampellicida* (Engelm.) Aa (szinonim név: *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala és Ravaz) tömlősgomba okozza. A kórokozó Észak-Amerikában őshonos, azonban 1999-ben hazánkban is kimutatták jelenlétét (Mikulás és Tomcsányi, 1999). A feketerothadás jelentősége világszerte elsősorban a borvidék földrajzi elhelyezkedésétől és az adott év időjárásától/vagy a borvidék éghajlati viszonyaitól függ. Magyarországon a kórokozó az északi borvidékeken (pl. Egri és Tokaj-hegyaljai) tartósan jelen van, és állandó figyelmet igényel. Kedvező (meleg és párás) körülmények között a *P. ampellicida* képes a szőlő minden zöld szervét megfertőzni (Molitor és Berkemann-Loehnertz, 2011). Megfelelő védelem nélkül a fiatal bogyók fertőződése súlyos, 5%-tól akár 100%-ig terjedő termés kiesést okozhat (Loskill *et al.*, 2009).

A kórokozó jelentősége a 21. században mind itthon, mind Európa más részein is növekedett, olyannyira, hogy Magyarországon 2010-ben és 2014-ben, két a szokásosnál csapadékosabb nyári időjárást mutató évben is jelentős járványt okozott (Dula, 2017; Mikulás, 2015). A kórokozó elleni védekezés elsősorban a növényegészségügyi intézkedésekre (pl. a gyümölcsmúmiák eltávolítása a növényről) és növényvédőszer alkalmazására támaszkodik. A feketerothadás elleni védekezésben a fungicidek leghatékonyabb csoportjai közé tartoznak a mitokondriális légzést gátló ún. quinone outside inhibitorok (QoI-k) és demetiláz inhibitorok (DMI-k), valamint a ditiokarbamátok (Hoffman *et al.*, 2002). Egészségügyi és környezetvédelmi aggályok miatt azonban az Európai Unió nemrégiben számos, leginkább a DMI és ditiokarbamát

csoportba tartozó hatóanyag engedélyét visszavonta (EU Pesticides Database (v.2.2) Search Active substances, safeners and synergists, 2022). További, a kórokozó számára feltételezhetően kedvező folyamatok (pl. liztharmat-rezisztenciát hordozó újabb szőlőfajták használata, valamint a klímaváltozás hatására átalakuló időjárási körülmények) összességében kiemelhetik a QoI fungicidek fontosságát a szőlő feketerothadás elleni védekezésben.

Jelen doktori munka céljai a következők voltak:

1. Az első hazai nagyméretű *P. ampellicida* törzsgyűjtemény létrehozásában való részvétel.
2. A *P. ampellicida* törzsgyűjteményen belüli genetikai variabilitás értékelése ISSR genotipizálással.
3. A *P. ampellicida* és rokon *Phyllosticta* fajok közötti filogenetikai kapcsolatok ellenőrzése (különös tekintettel a CBS 237.48 számú törzsére).
4. A QoI fungicidekkel szembeni *in vitro* érzékenység és az alternatív légzési útvonal hatékonyságának felmérése kiválasztott *P. ampellicida* izolátumok micéliumnövekedésének és konídiumcsírázásának értékelésével.
5. A *CYTB* mRNS-ben található fungicidrezisztencia-markerek felmérése és
6. a *cytb* gén exon/intron szerkezetének feltárása kiválasztott *P. ampellicida* és rokon *Phyllosticta* fajok izolátumaiban/törzseiben.
7. Továbbá a *cytb* gén szekvenciájának és exon/intron szerkezetének összehasonlítása a különböző populációkban/borvidékeken/országokban és/vagy különböző évszakokban gyűjtött *P. ampellicida* izolátumok és más *Phyllosticta* fajok törzsei között.

2 ANYAG ÉS MÓDSZER

Együttműködő partnereimmel Magyarországon rendszeresen gyűjtöttünk *P. ampellicida*-val fertőzött szőlőleveleket és bogyókat. A begyűjtött mintákból a kórokozó izolálásával létrehoztak egy *P. ampellicida* törzsgyűjteményt (495 izolátum). Ezt külföldi *P. ampellicida* izolátummal és nemzetközi törzsgyűjteményekből beszerzett *Phyllosticta* törzsszel is kiegészítettünk (összesen 13 izolátum/törzs).

A 499 darab izolátumból álló *P. ampellicida* gyűjteményt a köztes egyszerű szekvenciaismétlődés (ISSR) módszerrel genotipizáltam. Ehhez összesen 89 ISSR primert teszteltem nyolc kiválasztott, Európa különböző részeiről és/vagy hazánkban különböző körülmények között gyűjtött *P. ampellicida* izolátum DNS-kivonatán.

Ennek eredménye és egyéb paraméterek (pl. a gyűjtés helye és éve stb.) alapján 48 *P. ampellicida* izolátumot választottam ki a micélium növekedésgátlási vizsgálatokhoz. A micélium növekedésének QoI fungicidekkel (azoxistrobin és trifloxistrobin) és alternatív oxidáz gátlószerrel (salicylhydroxamic acid (SHAM)) történő *in vitro* gátlását kollégáimmal az ún. gradients lemez módszer ("gradient plate technique") alkalmazásával teszteltük (Hunt és Sandham, 1969).

A 48 kiválasztott izolátum különböző kezelések melletti micéliumnövekedésének méréséhez számítógépes rövid programot (szkriptet) adaptáltunk a MATLAB® R2016b szoftvercsomagban (Fuentes *et al.*, 2010). Majd a rövidprogram által generált eredményekből számoltam ki az 50%-os növekedési ráta (50%-os növekedésgátlás, EC₅₀) értékeit minden egyes gombaizolátum négy kezeléséhez, valamint a micéliumnövekedés-gátlásának százalékos arányát (Ishii *et al.*, 2009).

Az *in vitro* konídiumcsírázási fungicid érzékenységi vizsgálatához két *P. ampellicida* izolátumot („18-3-9” és „19-129” izolátumok) választottam ki a micélium növekedésgátlási rangsor alapján. A csírázó konídiumok számából kiszámítottam a két izolátum eltérő kísérlet-kombinációira vonatkozó százalékos csírázásgátlási értékeiket.

Az ISSR, a micéliumnövekedés-gátlási és a konídiumcsírázás-gátlási kísérletek eredményeit statisztikai elemzésnek vetettük alá az R statisztikai számítási környezetben (RStudio Team: <http://www.rstudio.com/>).

A molekuláris munkához a több, mint 500 *Phyllosticta* spp. izolátumból/törzsből DNS-t vontam ki (Edwards *et al.* 1991 alapján). Ezek az izolátumok közül 17 darabból a teljes RNS kivonását is elvégeztem, majd cDNS-t állítottam elő ezekből a kivonatokból. A tisztított cDNS (fungicidrezisztencia-markerek) és teljes DNS (ISSR, filogenetika és exon/intron szerkezetmeghatározás) szolgált templátként a polimeráz láncreakciós kísérletekhez.

A *P. ampellicida* és rokon fajainak filogenetikai helyzetét az ITS lókuszt Maximum likelihood (ML) filogenetikai elemzésével mértük fel az *in vitro* micéliumnövekedés-gátlási kísérletben vizsgált 48 hazai *P. ampellicida* izolátum, további 3 eltérő földrajzi eredetű *P. ampellicida* izolátum és a két vadszőlőről izolált CBS törzs (CBS111645 és CBS237.48) bevonásával.

A *cytb* gén exon/intron szerkezetének meghatározásához a kiválasztott 13 *Phyllosticta* spp. izolátum DNS kivonatából a gén fragmentumait PCR-rel felszaporítottam és a szekvenciájukat meghatároztam. A *CYTB* mRNS szekvenciájában a fungicidrezisztencia-markerek ellenőrzéséhez a cDNS mintákból a

CYTB mRNS fragmentumok szaporítottam fel a saját tervezésű GuiCobCdsF (GCCF) és GuiCobCdsR (GCCR) primerpárral.

Az összes PCR terméket (az ISSR-termékek kivételével) bakteriális vektorba klónoztam és a szekvenciájukat Sanger féle szekvenálással határoztam meg. Végül a szekvenciákat CodonCode Aligner szoftverrel vágtam le, illesztettem egymáshoz.

3 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

3.1. ISSR genotipizálás

A 499 *P. ampelicia* izolátumot összesen nyolc különböző klaszterbe/genotípusba tudtam besorolni az UPGMA dendrogramon. A törzsek többsége (98,6%) az 1. és a 2. számú klaszterbe tartozott (64,8% és 29,7%). A magyarországi borvidékekről származó izolátumok tekintetében hasonló volt ez az arány, mert a törzsek 61,7%-a tartozott az 1. klaszterbe, míg 30,5% az 2.-ba. A 4-7. klasztereket csak egy vagy két izolátum képviselte az Egri borvidékről, míg a Tokaj-hegyaljai borvidéken csak a két domináns klaszterbe (1. és 2.) tartozó izolátumokat találtam. A horvátországi Moscenicka Draga-ból származó nyolc izolátumból hét tartozott az 1. klaszterbe, míg a nyolcadik a 3. klaszter egyedüli képviselőjének bizonyult. A portugáliai Vinhos Verdesből származó két izolátum közül az egyik a leggyakoribb, legnépesebb 1. klaszter tagja volt, míg a másik a 8. klasztert egyedülként képviseli. Végül az olaszországi Canneto Pavese-ből származó egyetlen izolátum a 2. klaszterbe tartozott.

3.2. Szőlőről és vadszőlőről származó *Phyllosticta* izolátumok/törzsek filogenetikai elemzése

A *Pa. tricuspidata* CBS 237.48 izolátum ITS-szekvenciája nagyfokú BlastN-hasonlóságot mutatott (99,28-100%) a nemrég *P. partricuspidatae* néven leírt izolátumok szekvenciáival (Zhou et al., 2015). Emellett Maximum likelihood (ML) elemzésünk azt is kimutatta, hogy jól alátámasztott kládot alkotott a *Pa. tricuspidata*-ról izolált *P. partricuspidatae* szekvenciáival. Ugyanez a szekvencia csak $\leq 97,59\%$ -os hasonlóságot mutatott a *V. vinifera*-ról létrehozott *P. ampellicida* izolátumok ITS-szekvenciájával. Az ML filogenetikai elemzés eredménye azt mutatta, hogy a *P. ampellicida* nyolc újonnan meghatározott szekvenciája és a GenBankban *P. ampellicida* (vagy *G. bidwellii*) néven tárolt szekvenciák jól alátámasztott (BS = 97%) kládot alkotnak. A teljes mértékben támogatott (BS = 100%) kládot a *Vitaceae* család növényi kórokozóinak szekvenciái (*P. partricuspidatae* és *P. vitis-rotundifoliae*) alkották. A *P. parthenocissi* törzsből (CBS 111645) nyert szekvencia megegyezett a típus törzsből származó szekvenciával (GenBank acc. No.: NR_147322.1).

3.3. Fungicid érzékenységi teszt

A kiválasztott izolátumok egyike sem mutatott magasabb EC₅₀ értéket, mint a gradiens felső határa (0,038 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A mérhetetlenül kis EC₅₀ értékkel rendelkező izolátumok mind nagyon érzékenyek voltak a vizsgált kezelésekre ($<0,01 \mu\text{g ml}^{-1}$ EC₅₀ kategóriájú sávok csoportja).

Mind a 48 *P. ampellicida* izolátum rendkívül érzékeny volt mind az azoxistrobinra, mind a trifloxistrobinra, az átlagos EC₅₀ értékük (átlag

$\pm$ szórás) $0,029 \pm 0,007$, illetve $0,022 \pm 0,008 \mu\text{g ml}^{-1}$ volt. A *P. ampellicida* izolátumok nagy érzékenysége a QoI-kkal szemben a magas növekedésgátlási százalékokból is látható volt, amelyek az azoxistrobin esetében 52,23 és 88,64%, a trifloxistrobin esetében pedig 74,80 és 96,15% közötti értékeket mutattak (8. táblázat). A micéliumnövekedés százalékos gátlása szignifikánsan alacsonyabb volt az azoxistrobin esetében (átlag $\pm$ szórás: $75,37 \pm 7,44\%$), mint a trifloxistrobin esetében ($86,78 \pm 5,07\%$).

A SHAM hozzáadása egyrészt az EC_{50} értékek esetében csökkenést eredményezett azoxistrobin + SHAM és a trifloxistrobin + SHAM esetében: $0,024 \pm 0,007$, illetve $0,017 \pm 0,005 \mu\text{g ml}^{-1}$. Másrészt a micéliumnövekedés-gátlási százalékokat szignifikánsan megnövelte mind az azoxistrobin ($80,04 \pm 6,59\%$) mind pedig a trifloxistrobin ($90,29 \pm 4,52\%$) esetében. A fungicid és a SHAM kezelések közötti kölcsönhatás nem volt szignifikáns ($p = 0,118$).

A konídiumok csírázásának gátlását két kiválasztott *P. ampellicida* izolátummal vizsgáltam. A konídiumok csírázását nagymértékben gátolta az azoxistrobin és a trifloxistrobin jelenléte. Az átlagos százalékos csírázási gátlás a 18-3-9 izolátum esetében (átlag $\pm$ szórás) $92,45 \pm 5,97\%$ illetve $93,40 \pm 4,11\%$ volt az azoxistrobin és a trifloxistrobin jelenlétében. A 19-129 izolátum esetében nagyon hasonlóan alakultak ezek az értékek az azoxistrobin ($90,24 \pm 4,36\%$) illetve a trifloxistrobin ($90,73 \pm 5,83\%$) jelenlétében. Hasonlóképpen, a SHAM hozzáadása csak csekély eltérést eredményezett a két vegyület csírázásra gyakorolt hatásaiban. Ugyanakkor egyik különbség sem volt statisztikailag szignifikáns: sem a fungicid, sem a SHAM, sem pedig az izolátum hatása.

3.4. A citokróom *b* gén/mRNS molekuláris jellemzése *Phyllosticta* izolátumokban/törzsekben

A *CYTB* mRNS (cDNS) 906 bázispár hosszúságú darabját felszaporítottam, klónoztam és meghatároztam a nukleotidsorrendjét különböző *Phyllosticta spp.* izolátumokból/törzsekből.

A 906 bázispáros mRNS szakaszból lefordított ORF 302 aminosavból állt és a *CYTB* fehérje 20. és 320. As pozíciója közötti szakaszát fedte le. Ez a szakasz tartalmazza a QoI-val szembeni rezisztenciát biztosító lehetséges pontmutációk két „hot spot” régióját, amelyek a 120-160. és 250-300. aminosav pozíciók között helyezkednek el. Minden vizsgált mRNS-fragmentum a vad típusú kodont tartalmazta mind a 129. (TTC → fenilalanin épül be), a 137. (GGT vagy GGG (*P. citricarpa*-ban) → glicin épül be) mind pedig a 143. (GGT → glicin épül be) pozíciókban. Fajon belüli különbségeket csak elvétve és csak egy-egy klónban észleltem. Ezeket leszámítva a nyolc *P. ampellicida*, három *P. citricarpa* és három *P. capitalensis* törzsből származó klónszekvenciák és az azokból képezett konszenzus szekvenciák megegyezők voltak a fajokon belül. Azonban a különböző *Phyllosticta* fajokból származó szekvenciák között találtam interspecifikus különbségeket. A *P. ampellicida* izolátumok konszenzus szekvenciájához, mint referenciához képest az SNP-k száma 8 és 46 között változott. A leghasonlóbb szekvenciát a *P. partricuspidatae* esetében találtam, ahol nyolc SNP volt kimutatható a szekvencia mentén. Figyelemre méltóan nagyobb különbséget találtam a *P. parthenocissi*-ben 27 SNP-vel. A *P. capitalensis* törzsek szekvenciái 36 SNP-t, míg a *P. gaultheriae* szekvenciái 37 SNP-t tartalmaztak. A legtöbb SNP-t és így a legnagyobb eltérést a *P.*

ampellicida-tól a *P. citricarpa* törzsek szekvenciáiban találtam (46 SNP).

A *cytb* gén részleges exon/intron szerkezetét a cDNS-szekvenálásra kiválasztott nyolc *P. ampellicida* izolátumban és további öt *Phyllosticta* spp. törzsben vizsgáltam. A *P. ampellicida* esetében a *cytb* gén 8605 bázispár hosszú szakaszát szaporítottam fel nyolc kiválasztott izolátumból. A *cytb* gén exon/intron szerkezete a nyolc vizsgált *P. ampellicida* izolátumban két kisebb eltéréstől eltekintve azonos volt. Egyedül a Portugáliából származó Gb30 és az olaszországi GbC izolátumok szekvenciájában, a negyedik intronban, a 6533. és a 6551. nukleotidpozíciókban találtam eltérést. Az RNAweasel mindezen intronokat I-es típusú önkivágódó intronokként azonosította. Ez a 8605 bázispáros fragmentum messzemenő azonosságot, de csak 57%-os átfedést mutatott a *P. ampellicida cytb* génjének GenBank-ban elérhető szekvenciájával a BlastN illesztés során.

A *Parthenocissus* spp.-ről izolált *P. partricuspidatae* (CBS 237.48) és *P. parthenocissi* (CBS 111645) törzsekben szintén közvetlenül a 143. kodon után mutattam ki egy intront, amely egy 2,1, illetve egy 2,2 kb hosszú PCR-terméket eredményezett. Az RNAweasel mindkét intront I-es típusú önkivágódó intronnak találta.

Az általam tervezett primerek egy 3,2 kb és egy 1,5 kb hosszú terméket szaporítottak fel a *P. citricarpa* (CBS 828.97) és a *P. capitalensis* (CBS 119720) mtDNS templátokból. Mindkét törzs hordozott egy I-es típusú önkivágódó intront vagy a 143. (*P. citricarpa*), vagy a 163. kodon (*P. capitalensis*) után. A *P. citricarpa* 3,2 kb-os fragmentuma nagymértékű azonosságot mutatott a *P. citricarpa*-, és mérsékelt azonosságot a *P. ampellicida* GenBank-i

szekvenciáikkal. Míg a *P. capitalensis* szekvencia nagy hasonlóságot mutatott mind a *P. ampellicida*, mind a *P. citricarpa* GenBank-i szekvenciákkal. A *P. gaultheriae* törzsből származó *cytb* génszakasz szekvenciája volt az egyetlen, amelyben nem találtam intront a 143. kodon közelében. Ehelyett a primerpárok egy 282 bázispár hosszú exont amplifikáltak, amely a 134. és 229. aminosavpozíciók közötti szakaszt kódolja és a BlastN illesztés szerint ez a *P. ampellicida* mRNS-szekvenciájához volt a leghasonlóbb.

4 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A szőlő feketerothadása a 21. század eleje óta egyre növekvő problémát jelent Európa egyes területein. Bár a kórokozó jelentősége a jövőben ezeken a területeken tovább nőhet, a *P. ampellicida* izolátumok QoI-rezisztencia szempontjából átfogó vizsgálatára még nem került sor. Jelen dolgozat 48 magyarországi (ISSR módszerrel kiválasztott) *P. ampellicida* izolátum azoxistrobin és trifloxistrobin QoI hatóanyagokkal szembeni *in vitro* alapérzékenységet, valamint 8 kiválasztott *P. ampellicida* és néhány további, különböző földrajzi eredetű *Phyllosticta* faj izolátuma/törzse *citokróm b* génjének és mRNS-ének jellemzőit mutatja be.

Az azonos földrajzi eredetű *P. ampellicida* izolátumok több esetben is különböző klaszterbe kerültek a genotipizálást követő elemzésben, ezért a földrajzi eredet nem magyarázta meg teljes mértékben az ISSR-mintázatokban látható különbségeket. A hazai nSSR és ISSR klaszterek/genotípusok viszonylag alacsony száma arra utalhat, hogy a kórokozó egyszeri behurcolással került Magyarországra, illetve

itthon alacsony szexuális szaporodási aktivitást mutat. Mikulás és Tomcsányi (1999) már korábban felvetette a *P. ampellicida* egyszeri magyarországi behurcolásának ötletét, amit mind Rinaldi *et al.* (2017), mind pedig jelen eredmények alátámasztani látszanak.

Az ITS lókusszal végzett filogenetikai elemzésünk megerősítette Zhang *et al.* (2013) és Zhou *et al.* (2015) eredményeit, miszerint a különböző gazdanövényekről származó, korábban egységesen *P. ampellicida* fajba sorolt izolátumok valójában jól elkülönülő kládokba, fajokba sorolhatóak. Ez nemcsak a három faj (*P. ampellicida*, *P. partricuspadatae*, *P. parthenocissi*) könnyebb elkülöníthetősége szemponjából fontos, hanem további bizonyítékkal támogatja ezen fajok *citokróm b* szekvenciáiban (mRNS és mtDNS) mutatkozó különbségek megértését.

Vizsgálataimban a *P. ampellicida* izolátumok micéliumnövekedésgátlásában a trifloxistrobin hatékonyabbnak bizonyult az azoxistrobinhoz képest, ami a vegyületek kémiai tulajdonságainak minimális különbségéből adódhat (Bartlett *et al.*, 2002). Mind a 48 *P. ampellicida* izolátum micéliumnövekedése rendkívül érzékeny volt mind az azoxistrobinra, mind a trifloxistrobinra. Ugyanakkor még a micéliumnövekedés átlagos százalékos gátlásánál (76,2 és 87,3% azoxistrobin és trifloxistrobin esetében) is magasabb gátlási százalékot fejtettek ki a *P. ampellicida* konídiumaival szemben. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy ez a két hatóanyag feltehetően továbbra hatékonyan alkalmazható a feketerothadás elleni növényvédelemben.

Egyes növényi gomba eredetű kórokozóknál alternatív oxidáz gátlószer (SHAM) jelenlétében emelkedett micélium növekedési- és konídiumcsírázás-gátlási szintekről számoltak be. Hasonló adatokat kaptunk a *P. ampellicida* izolátumok micéliumnövekedésének és

konídiumcsírázásának gátlása esetében is, ahol a SHAM hozzáadása jelentősen növelte a micélium/csíratömlő növekedésének százalékos gátlását és ennek megfelelően csökkentette az EC₅₀ értékeket. Ezen adatok alapján a *P. ampellicida* esetében lehetséges, hogy az alternatív-oxidáz útvonal nem pótolja megfelelően a mitokondriális légzést a konídiumok csírázása során, ezért gátolják a QoI fungicidek hatékonyan a folyamatot. Ezek az eredmények, valamint egyes növényi antioxidánsok (pl. flavonok; Avila-Adame *et al.*, 2003), amelyek a szabadföldi körülmények között feltételezhetően hasonló szerepet játszanak, mint a SHAM *in vitro*, azt feltételezi, hogy a *P. ampellicida* részlegesen gátolt növekedése és így túlélése az alternatív-oxidáz útvonal segítségével szabadföldi körülmények között valószínűtlennek tűnik.

Az itt vizsgált *P. ampellicida* és más *Phyllosticta* spp. izolátumokban/törzsekben nem voltak jelen a leggyakrabban vizsgált pontmutációk a *CYTB* mRNS-ben, ami egybeesik a korábbi, *P. ampellicida*, *P. citricarpa* és *P. capitalensis* izolátumokból származó szekvenciaeredményekkel (Miessner *et al.*, 2011; Hincapie *et al.*, 2013; Stammler *et al.*, 2013). A *CYTB* mRNS ezen fragmentumában található elszórt (nem minden klónban megtalálható) SNP-k nem voltak összefüggésbe hozhatóak a *P. ampellicida* izolátumok közötti EC₅₀-értékek kis, bár kimutatható eltéréseivel. Ezek az eredmények azonban összhangban vannak várakozásainkkal, mert az EC₅₀ variabilitás ilyen mértékű változékonysága általában még az alapérzékenységet mutató populációkban is kimutatható (Avila-Adame *et al.*, 2003; Di *et al.*, 2016; Hincapie *et al.*, 2013; Hoffman és Wilcox, 2003). Továbbá a *cytb* gén kódoló régióiban található SNP-k következtében bekövetkező aminosavcserék jelentősen megemelkedett EC₅₀ értékekhez vezethetnek, ahogyan azt például a

Botrytis cinerea és az *Alternaria alternata* esetében is kimutatták (Veloukas *et al.*, 2014; Vega és Dewdney, 2014). A kiválasztott nyolc *P. ampellicida* izolátum konszenzusos CYTB cDNS-szekvenciájának megfelelő fragmentumát összehasonlítva a Miessner *et al.* (2011; GenBank azonosító: JF785546) által publikált (*P. ampellicida*-ból és *P. partricuspidatae*-ből meghatározott, megegyező) szekvenciával, nagyfokú hasonlóságot találtam: csupán két SNP-ben különbözött a saját konszenzus szekvenciámtól. Ugyanakkor azonban Miessner *et al.* (2011) szekvenciája megegyezett a *P. partricuspidatae* (CBS 237.48) CYTB cDNS-szekvenciájának megfelelő fragmentumával, amely törzset ők is vizsgálták, így feltehetően ennek a szekvenciáját publikálták a *P. ampellicida* nukleotid sorrendje helyett.

A *cytb* gén szekvenciájának vizsgálata azt eredményezte, hogy a hat vizsgált *Phyllosticta* fajból négyben (*P. ampellicida*, *P. citricarpa*, *P. parthenocissi* és *P. partricuspidatae*) kimutatható volt egy I-es típusú intron közvetlenül a 143. kodon után. Az "intron hipotézis" szerint ez azt jelenti, hogy a G143A aminosavcsere „fennmaradása” ezekben a fajokban valószínűtlen. Kivételes exon/intron szerkezetet csak a *P. gaultheriae* törzsben találtam: a 143. kodon után intron nem volt azonosítható, ami arra utal, hogy a G143A pontmutáció ebben a fajban előfordulhat. Ennek elterjedése azonban nagyon valószínűtlen, hiszen e kórokozó ellen nem végeznek kémiai védekezést, lévén, hogy egy invazív, a helyi növényi diverzitást csökkentő cserje, a *Gaultheria shallon* elleni természetes ellenséggént alkalmazzák (Prescott *et al.*, 1993).

Összességében kijelenthető, hogy a vizsgált *P. ampellicida* izolátumok *in vitro* érzékenyek a QoI fungicidekre, ráadásul az intron elmélet értelmében az I-es típusú önkivágódó intron jelenléte a *cytb* génben a 143. kodont követően a QoI-rezisztencia alacsony

kockázatát jelzi a *P. ampellicida*-ban. Így a *P. ampellicida* elleni védekezésben ez a hatóanyagcsoport még hasznos lehet a jövőben.

5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Több mint 70 izolátummal hozzájárultam a hazánkban elsőként többszáz izolátumból létrehozott *P. ampellicida* törzsgyűjtemény felállításához és fenntartásához.
2. Genotipizáltam 499, főként hazai *P. ampellicida* izolátumot az ISSR módszerrel három primer használatával, amelynek eredményeként az izolátumokat nyolc klaszterbe/genotípusba soroltam. Az izolátumok több mint 98 %-a két genotípushoz tartozott.
3. ITS alapú maximum likelihood elemzéssel ellenőriztük a *P. ampellicida*, *P. partricuspidatae* és *P. parthenocissi* fajok közötti filogenetikai kapcsolatokat, amelynek eredményeként megállapítottuk, hogy a CBS 237.48 számú törzse feltételezhetően nem a *P. ampellicida*, hanem a *P. partricuspidatae* fajba sorolható be.
4. Meghatároztam 48 *P. ampellicida* izolátum *in vitro* alapérzékenységet két QoI fungiciddel, az azoxistrobinnal és a trifloxistrobinnal szemben. Megállapítottam, hogy a trifloxistrobin *in vitro* hatásosabbnak bizonyult az azoxistrobinnál, mivel szignifikánsan alacsonyabb EC_{50} , illetve magasabb gátlási százaléktételeket mutat.
5. Kimutattam, hogy a citokróm-c-oxidáz útvonal gátlása esetén az alternatív-oxidáz útvonal kimutatható, bár nem jelentős szerepet játszik a *P. ampellicida* légzésében.
6. Megállapítottam, hogy a két kiválasztott *P. ampellicida* izolátum konídiumainak csírázását *in vitro* nagyon nagymértékben (90-95 %-ban) gátolja mind az azoxistrobin, mind pedig a trifloxistrobin jelenléte ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Az alternatív légzési útvonalnak nem volt kimutatható hatása a

konídiumok csírázására a vizsgált időszakban/körülmények között.

7. Meghatároztam a *CYTB* mRNS egy 906 bázispáros szakaszának szekvenciáját 8 *P. ampelici* izolátumban és a *P. partricuspidatae*, *P. parthenocissi*, *P. citricarpa*, *P. gaultheriae* és a *P. capitalensis* fajok egy-egy törzsében. Megállapítottam, hogy a három leggyakrabban előforduló fungicidrezisztencia-markerek (F129L, G137R és G143A) kodonjai vad típusú aminosavat kódolnak minden általam vizsgált izolátumban/törzsben.
8. Meghatároztam a *cytb* gén 143. kodont körülvevő szakaszának szekvenciáját 8 *P. ampelici* izolátumban és a *P. partricuspidatae*, *P. parthenocissi*, *P. citricarpa*, *P. gaultheriae* és a *P. capitalensis* fajok egy-egy törzsében (a *P. partricuspidatae*, *P. citricarpa* és a *P. capitalensis* esetében csupán megerősítettem a korábbi szakirodalmi eredményeket). Megállapítottam, hogy a *P. gaultheriae* és a *P. capitalensis* kivételével minden vizsgált faj izolátumaiban/törzseiben megtalálható egy I-es típusú önkivágódó intron közvetlenül a 143. kodont követően. Ez az „intron elmélet” értelmében megakadályozza a G143A pontmutáció elterjedését e fajok populációiban.

6 PUBLIKÁCIÓS LISTA

Alapkövetelmények

Impakt faktoros cikkek:

Áron N. Horváth, Orsolya Molnár, Márk Z. Németh, Alexandra Pintye, Tamás Dankó, Zsolt Spitzmüller, Zsuzsanna Váczy, Kálmán Z. Váczy, Giovanni Onesti, Pedro Reis, Cecilia Rego, Zsolt Bereczky, Levente Kiss and Gábor M. Kovács (2024). Revisiting the intron hypothesis of QoI resistance in *Phyllosticta ampellicida*, the causal agent of grape black rot, and other *Phyllosticta* species. *Plant Pathology* **In Press**

Horváth, Á. N., Németh, L., Vörös, L., Stirk, W. A., van Staden, J., & Ördög, V. (2023). Cataloguing microalgae and Cyanobacteria strains from the Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection with *in vitro* antagonistic activity against phytopathogenic fungi and oomycetes. *Phytoparasitica*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12600-023-01045-2>

Pintye, A, Németh, Z M, Molnár, O, **Horváth, Á N**, Spitzmüller, Zs, Szalóki, N, Pál, K, Váczy, Z K, Kovács, G M (2020). Improved DNA extraction and quantitative real-time PCR method to genotype grapevine powdery mildew and detect the DMI fungicide resistance marker A495T using single ascocarps. *Phytopathologia Mediterranea* 59(1): 97-106. <https://doi.org/10.36253/phyto-11098>

További IF-es cikkek (az alapkövetelményen túl)

Vági, P., Knapp, D. G., Kósa, A., Seress, D., **Horváth, Á. N.**, & Kovács, G. M. (2014). Simultaneous specific *in planta* visualization of root-colonizing fungi using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mycorrhiza*, 24(4): 259-266. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0533-8>

Simon, J, Kósa, A, Bóka, K, Vági, P, Simon-Sarkadi, L, Mednyánszky, Z, **Horváth, Á N**, Nyitrai, P, Böddi, B, and Preininger, É (2017). Self-supporting artificial system of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the ascomycetous fungus *Alternaria infectoria*. *Symbiosis*, 71(3): 199-209. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0430-y>

Nemeth, Z M, Pintye, A, **Horvath, Á N**, Vagi, P, Kovacs, G M, Gorfer, M, Kiss, L (2019). Green Fluorescent Protein transformation sheds more light on a widespread mycoparasitic interaction. *Phytopathology* 109(8): 1404-1416. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-19-0013-R>

Pintye, A., Németh, M. Z., Molnár, O., **Horváth, Á. N.**, Matolcsi, F., Bókony, V., ... & Kovács, G. M. (2023). Comprehensive analyses of the occurrence of a fungicide resistance marker and the genetic structure in *Erysiphe necator* populations. *Scientific Reports*, 13(1): 15172. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41454-1>

Egyéb tudományos cikkek

Molnár, Orsolya; Németh, Z. Márk; **Horváth, N. Áron**; Matolcsi, Fruzsina; Kovács, M. Gábor; Pintye, Alexandra (2019). A növénykórokozó gombák DMI-fungicidekkel szembeni rezisztenciájának molekuláris biológiai háttere. *Növényvédelem* 80 (N.S. 55): 11 pp. 480-492.

Konferencia összefoglalók („abstract”)

Horváth N. Á., Kiss L., Váczy K. Z., Váczy Zs. És Bereczky Zs.: A szőlő feketerothadását okozó *Guignardia bidwellii* (anamorf: *Phyllosticta ampellicida*) és néhány közeli rokon faj strobilurin-rezisztenciája (**Előadás:** 63. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2017.02.21.)

Á. N. Horváth, L. Kiss, K. Z. Váczy, Zs. Váczy, G. Onesti, M. Z. Németh, G. M. Kovács, A. Pintye, Zs. Bereczky: Resistance to QoI fungicides in the grape black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, and related species, in the light of the *CYTB* gene structure: preliminary results (**Előadás**: Molecular Biology of Plant Pathogens, Durham, 2017.03.29.)

Németh Z. M., **Horváth N. Á.**, Knapp G. D., Gorfer M., Kovács M. G.: Fluoreszcensen világító gyökérkolonizáló endofiton gomba létrehozása genetikai transzformációval. VI. Magyar Mikológiai Konferencia, 2017. július 3-5., Szeged

Á. N. Horváth, L. Kiss, K. Z. Váczy, Zs. Váczy, G. Onesti, M. Z. Németh, G. M. Kovács, A. Pintye, Zs. Bereczky: The *cytb* gene structure and resistance to QoI fungicides in the grape black rot pathogen, *Guignardia bidwellii* and related species. Science Protecting Plant Health 2017, 26-28 September 2017, Brisbane, Australia.

Á. N. Horváth, L. Kiss, K. Z. Váczy, Zs. Váczy, G. Onesti, C. Rego, O. Molnár, Zs. Bereczky: Resistance to QoI fungicides in the grape black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, and related species, in the light of the *CYTB* gene structure: preliminary results (**Poszter**: International Mycological Congress , San Juan, 2018.07.19.)

Horváth N. Á., Kiss L., Váczy K. Z., Váczy Zs. És Bereczky Zs.: A szőlő feketerothadását okozó *Guignardia bidwellii* (anamorf: *Phyllosticta ampellicida*) és néhány közeli rokon faj strobilurin-rezisztenciája (**Előadás**: Magyar Mikrobiológiai Társaság Éves Nagygyűlése, Eger, 2018.10.19.)

Horváth N. Á., Kiss L., Váczy K. Z., Váczy Zs., G. Onesti, C. Rego, Molnár O., Németh Z. M., Dankó T., Bereczky Zs.: A szőlő feketerothadását okozó *Guignardia bidwellii* (anamorf: *Phyllosticta ampellicida*) és néhány közeli

rokon faj strobilurin-rezisztenciája. Szőlő-bor Kutatás-fejlesztési Kiválósági Konferencia, 2019. február 13., Eger.

Molnár O., Pintye A., Németh Z. M., **Horváth N. Á.**, Spitzmüller Zs., Váczy K. Z., Kiss L., Kovács M. G.: Új genotípusok és DMI-rezisztencia magyarországi szőlőlisztharmat (*Erysiphe necator*) izolátumokban. Szőlő-bor Kutatás-fejlesztési Kiválósági Konferencia, 2019. február 13., Eger.

Pintye A., Németh Z. M., Molnár O., **Horváth N. Á.**, Spitzmüller Zs., Szalóki N., Pál K., Váczy K. Z., Kiss L., Kovács M. G. A szőlőlisztharmat kórokozójának (*Erysiphe necator*) genotipizálása és az A495T jelű DMI-rezisztencia marker kimutatása hazai mintákban egy új módszerrel. 65. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2019. február 19.-20., Budapest.

Horváth N. Á., Molnár O., Németh Z. M., Spitzmüller Zs., Váczy K Z, Váczy Zs, Molnár E, G Onesti, C Rego, Kiss L és Kovács M. G: A szőlő feketerothadás kórokozójának genetikai változatossága a strobilurin-rezisztenciával összefüggésben. Magyar Tudomány Ünnepe, 2019. november 29., Eger