

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A NAPRAFORGÓT FERTŐZŐ *PLASMOPARA*-FAJOK FENOTÍPUSOS ÉS
MOLEKULÁRIS GENETIKAI JELLEMZÉSE**

Doktori (PhD.) értekezés

KOMJÁTI HEDVIG

GÖDÖLLŐ

2010

A doktori iskola

Megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési- és kertészeti tudományok

Vezetője: Dr. Heszky László egyetemi tanár
Az MTA rendes tagja
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

Témavezető: Dr. Virányi Ferenc egyetemi tanár
Az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1. A napraforgó jelentősége	11
2.2. A napraforgó-peronoszpóra jelentősége	11
2.3. A kórokozó nevezéktana.....	12
2.4. A kórokozó gazdanövényköre	13
2.5. A kórokozó biológiája.....	16
2.6. A betegség tünetei.....	18
2.7. A kórokozó földrajzi elterjedése	19
2.8. A virulencia-fenotípus változékonysága.....	20
2.9. A virulencia-fenotípus meghatározásának módszere.....	23
2.10. A napraforgó-peronoszpóra elleni védekezés	25
2.10.1. A védelem agrotechnikai eszközei.....	25
2.10.2. A védelem genetikai eszközei.....	25
2.10.3. A kórokozó elleni kémiai védelem	26
2.11. A <i>Plasmopara halstedii</i> változékonyságának kimutatására alkalmazott módszerek.....	28
2.11.1. Fenotípusos változékonyság kimutatása	28
2.11.2. Fungicidérzékenység.....	28
2.11.3. Zsírsvamintázatok elemzése	29
2.11.4. Genotípusos változékonyság.....	29
2.11.5. Nukleinsav alapú vizsgálati módszerek	29
2.11.6. Izoenzim alapú vizsgálatok.....	33
3. Anyag és módszer	35
3.1. A vizsgált <i>Plasmopara</i> -izolátumok	35
3.1.1. Az izolátumok eredete, szaporítása és tárolása.....	35
3.1.2. Genetikailag tiszta tenyészetek előállítása.....	37
3.2. Fenotípusos változékonyság vizsgálati módszerei.....	38
3.2.1. Patotípus-meghatározás differenciáló teszttel.....	38
3.2.2. Morfológiai jellemzés	39
3.2.3. Patogenitásvizsgálat.....	40
3.2.4. Fungicidérzékenység vizsgálata.....	41
3.2.5. Zsírsvamintázatok elemzése	41
3.3. Nukleinsav szintű változékonyság vizsgálati módszerei	42
3.3.1. Nukleinsav-kivonás.....	42
3.3.2. RAPD-vizsgálat	42
3.3.3. iSSR-vizsgálat.....	44
3.3.4. A <i>P. halstedii</i> ITS-bázissorrendjének meghatározása.....	45
3.3.5. ITS-szekvenciák összehasonlító vizsgálata	46
3.3.6. A szerbtövisről származó X03 izolátum ITS-bázissorrendjének meghatározása	46
3.3.7. LSU-szekvencia részleges meghatározása.....	47
3.3.8. LTR-retrotranszpozon izolálása.....	47
3.3.9. S-SAP-vizsgálat	51
3.4. Izoenzimintázatok összehasonlító vizsgálata.....	52
3.4.1. Fehérjekivonás	52
3.4.2. Cellulóz-acetát-gélelektroforézis (CAE).....	53
3.4.3. Cellulóz-acetát-gélfestés	53
3.4.4. Izoenzimvizsgálat értékelése.....	54

4. Eredmények	55
4.1. A vizsgált izolátumok fenotípusos változékonysága	55
4.1.1. Szerbtövisről származó <i>Plasmopara</i> sp. morfológiai jellemzése	55
4.1.2. Gazdanövényválasz a szerbtövisről származó <i>Plasmopara</i> sp. fertőzésére	55
4.1.3. Szerbtövisről származó <i>Plasmopara</i> sp. zsírsavmintázata	57
4.1.4. Szerbtövisről származó <i>Plasmopara</i> sp. fungicidérzékenysége	57
4.1.5. Egysporangiumtenyészet-előállítás módszerének értékelése.....	58
4.1.6. <i>Plasmopara</i> egysporangium-vonalak virulencia-fenotípusai	58
4.2. Molekuláris genetikai vizsgálati módszerek	60
4.2.1. RAPD-analízis	60
4.2.2. iSSR-vizsgálat	62
4.2.3. A <i>Plasmopara halstedii</i> ITS-régiójának meghatározása	64
4.2.4. <i>Xanthium</i> ről származó izolátum ITS- és LSU-régiójának jellemzése	65
4.2.5. LTR-retrotranszpozon izolálása <i>P. halstedii</i> ből.....	68
4.2.6. <i>P. halstedii</i> S-SAP-analízise	71
4.2.7. Izoenzimvizsgálat CAE-vel	73
4.3. Új tudományos eredmények.....	78
5. Megvitatás.....	79
5.1. A vizsgált <i>Plasmopara</i> -izolátumok fenotípusos változékonysága	79
5.1.1. Szerbtövisről származó <i>Plasmopara</i> sp. morfológiai jellemzése	79
5.1.2. Szerbtövisről származó <i>Plasmopara</i> sp. gazdanövénykörének vizsgálata	79
5.1.3. Szerbtövisről származó <i>Plasmopara</i> sp. zsírsavmintázata	80
5.1.4. Szerbtövisről származó <i>Plasmopara</i> sp. fungicidérzékenysége	80
5.1.5. Egysporangium-előállítás.....	81
5.1.6. Virulencia-fenotípusok változékonysága.....	82
5.2. Nukleinsav és fehérje alapú vizsgálatok	84
5.2.1. RAPD-analízis	84
5.2.2. iSSR-analízis.....	85
5.2.3. LTR-retrotranszpozon izolálása <i>P. halstedii</i> ből és S-SAP-analízise.....	86
5.2.4. Izoenzimvizsgálat.....	88
5.2.5. A <i>Plasmopara halstedii</i> ITS-régiójának meghatározása	90
5.2.6. <i>Xanthium</i> ről származó izolátum ITS- és LSU-régiójának jellemzése	91
6. Összefoglalás	93
7. Summary	95
8. Melléklet	97
8.1. Irodalomjegyzék.....	97
9. Köszönetnyilvánítás	111

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CAE	<u>c</u> ellulóz- <u>a</u> cetát- <u>e</u> lektroforézis
CLI	<u>c</u> otyledon <u>l</u> imited <u>i</u> nfection, sziklevélre korlátozódó fertőzés
FI	<u>f</u> ield <u>i</u> solate, szántóföldi izolátum
HA	<i>Helianthus annuus</i>
iSSR	<u>i</u> nter <u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>R</u> epeat
ITS	<u>I</u> nternal <u>T</u> ranscribed <u>S</u> pacers
LSU	<u>L</u> arge <u>R</u> ibosomal <u>S</u> ubunit
LTR	<u>L</u> ong <u>T</u> erminal <u>R</u> epeat
MDS	<u>M</u> ulti <u>D</u> imensional <u>S</u> caling
MLP	multilokusz fenotípus
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction, polimeráz-lánreakció
PT	patotípus
rDNS	riboszómális DNS
RAPD	<u>R</u> andomly <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> NA
RT	reverz transzkriptáz
S-SAP	<u>S</u> equence <u>S</u> pecific <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphism
SSL	<u>s</u> ingle <u>s</u> porangia <u>l</u> ine, egysporangium-tenyészet
XS	<i>Xanthium strumarium</i>
WSI	<u>w</u> hole <u>s</u> eedling <u>i</u> mmersion, teljes csíranövény fertőzése

1. BEVEZETÉS

A napraforgó (*Helianthus annuus* L.) a világon az ötödik legnagyobb mennyiségben termesztett olajnövény (FAO, 2009), egyben a magyar mezőgazdaság legfontosabb olajnövénye. Hazánkban az őszi búza és a kukorica mellett a harmadik legnagyobb vetésterületen, mintegy félmillió ha-on termesztik. Termése az élelmiszer-, gyógyszer-, vegyi- és kozmetikai ipar alapanyaga. Virágzásban jó méhlegelő, olaj- és fehérjetartalma miatt állati takarmányként és madáreleségként is hasznosítható. Kedvező élettani hatása van a kaszatban található telítetlen zsírsavaknak, a D, E vitaminoknak és provitaminoknak. A növény szépsége és változatos szíromszíne miatt dísnövényként is egyre népszerűbb. Újabban a biodízelgyártásban is helyet követel magának.

Napjainkra a kiemelkedő termésátlag és a termésbiztonság elsősorban a gyomszabályozás és a betegségekkel szembeni védelem függvénye. Az újabban kifejlesztett herbicidtoleráns hibridek állományban is megoldást kínálnak a kétszikűek gyomszabályozására. A kórokozókkal szembeni hatékony növényvédelem alapja a rezisztens, illetve toleráns fajták nemesítése.

Hazánkban a napraforgón fellépő betegségek közül jelentős termés kiesést idézhet elő a *Plasmopara halstedii*, a napraforgó-peronoszpóra. A kórokozót széles gazdanövénykörű fajkomplexumként jellemzik, ami közel 35 növényfajt fertőz az *Asteraceae* családban, így például a termesztett napraforgó mellett megtámadja a nálunk is gyakori gyomnövényként ismert parlagfűvet (*Ambrosia artemisiifolia* L.), szerbtövist (*Xanthium strumarium* L.) és ívát (*Iva xanthifolia* Nutt.). Ez a talajból fertőző biotróf kórokozó a növény szisztémikus megbetegedését okozza, melynek következtében a növény törpül, virágzata sterillé válik és léha kaszatot fejleszt. A beteg növény nem gyógyítható. A napraforgó-peronoszpóra ellen csávázással és a genetikai rezisztencia együttes alkalmazásával lehet eredményesen védekezni.

A kórokozó az 1940-es évekre tehető európai elterjedését követően hosszú ideig patológiailag egységes volt, azonban a korábban rezisztens fajták megbetegedése új patotípusok kialakulását jelezte. A napraforgó-termesztés növekedésével először Amerikában, a hetvenes években, majd ezt követően egy évtizeddel később Európában is új patotípusokra figyeltek fel. A kezdetben egységes gombapopulációban különböző virulenciafaktorokat tartalmazó változatok jelentek meg. Mára világviszonylatban több mint 30 féle patotípust azonosítottak, hazánkban ezek közül öt jelenléte ismert. A kórokozó nagyfokú változékonysága a termesztésbe került, különböző genetikai rezisztenciafaktorokat tartalmazó fajták okozta szelekciós nyomással hozható összefüggésbe. A napraforgó-peronoszpóra populációiban végbement másik jelentős változás a növényvédőszer-tolerancia, illetve -rezisztencia kialakulása, melyet Franciaországban, Észak-Amerikában, Spanyolországban, Németországban, valamint Olaszországban egyaránt megfigyeltek.

A korszerű növénytermesztéshez hosszú távon elengedhetetlen a kórokozó helyi populációinak ismeretére alapozott fajtaválasztás. A populáció virulenciafenotípus-összetételének nyomon követéséhez a nemzetközi egyezményen alapuló, differenciáló fajtasorra történő fertőzés ad lehetőséget. A virulencia-összetétel meghatározása a differenciáló vonalak fertőzésre adott válaszára alapszik, azonban ez idő-, hely- és munkaigényes. A teszteléshez biztosítani kell a megfelelő rezisztenciagénekkel rendelkező tesztort, labort a mesterséges fertőzéshez, a növényneveléshez pedig szabályozható termesztőberendezést. Mindezek mellett gondoskodni kell a differenciáló vonalak tiszta fenntartásáról is. A virulenciateszt kiértékelését nehezíti, hogy a környezeti körülményektől függően a növény-kórokozó-kapcsolatok jellege nem mindig egyértelmű.

A molekuláris biológia eszköztárának fejlődése lehetővé tette a növényi kórokozók molekuláris szintű tanulmányozását. A fenotípusos jellemzésen túl a genetikai variabilitás vizsgálata is egyre szélesebb körben kivitelezhető. A *Plasmopara halstedii* változékonyságáról molekuláris szinten keveset tudunk. Korábbi RAPD- (Randomly Amplified Polymorphic DNA) és RFLP- (Restriction Fragment Length Polymorphism) vizsgálatok szerint a kórokozó populációira alacsony genetikai változékonyság jellemző, miközben a természetben egyre nagyobb számban jelennek meg változatos virulenciakarakterekkel jellemezhető izolátumok.

Munkám során a hazánkban fellelhető napraforgóperonoszpóra-populáció virulencia-összetételének jellemzésére és a változatok nyomon követésére alkalmas, jól ismételtető, molekuláris vizsgálaton alapuló tesztelési módszereket vizsgáltam. A virulencia-fenotípusok jellemzésére alkalmas molekuláris bélyegeket (markereket) kerestem. Munkám távlati célja a populációs változékonyság, valamint az új virulenciafaktorok megjelenése közötti kapcsolat keresése volt.

A célkitűzések megvalósításához a következő vizsgálatokat végeztem el:

- Hazánkban és külföldön napraforgóról gyűjtött *Plasmopara halstedii* izolátumok virulenciájának meghatározása differenciáló soron, illetve megfelelő fenotípusos változékonyságot képviselő vizsgálati mintasor előállítására a molekuláris vizsgálatokhoz.
- Szerbtövisről gyűjtött *Plasmopara* sp. izolátumok fenotípusos jellemzése: virulencia-fenotípus, morfológiai jellemzők, zsírsav-összetétel és metalaxilérzékenység szempontjából. Az izolátum gazdanövénykörének vizsgálata és fajszerű azonosítása.

- Genetikailag tiszta egysporangium-tenyészetek előállítása, felszaporítása és virulenciakarakterének fenotípusos jellemzése a molekuláris vizsgálatokhoz.
- A populáció polimorfizmusának vizsgálata az egyes rendelkezésre álló virulenciafenotípusok, illetve azok szubpopulációinak körében nukleinsav alapú RAPD- (Randomly Amplified Polymorphic DNA), iSSR- (inter Simple Sequence Repeat) és S-SAP- (Sequence Specific Amplified Polymorphism) módszerek alkalmazásával.
- Az S-SAP-módszer kivitelezéséhez fajspecifikus LTR-retrotranszpozon szekvencia-meghatározása
- Izoenzimanalízis a populációs változékonyság nyomon követésére.
- Fajszerű azonosítás az izolátumok ITS- és LSU-szekvenciájának meghatározása és jellemzése alapján.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A napraforgó jelentősége

A napraforgó géncentruma Észak-Amerika területén található. A növény az 1500-as években került Európába. Először csak dísz- és gyógynövényként használták, olajának ipari felhasználása csak a XVIII. századtól ismert (Frank, 1999). Ekkora tehető a napraforgó oroszországi meghonosítása és kifejezetten az olajért történő termesztése, hiszen ezt a zsiradékot bőjt idején is fogyaszthatták a vallásos ortodoxok. A napraforgó-termesztés fejlődésének az új fajták, majd a modern hibridek megjelenése adott időről időre újabb lendületet. A termés hozam, a termésbiztonság, az olajtartalom növelése, valamint a betegségekkel szembeni ellenállóság fokozása biztosítja a napraforgó-termesztés jövedelmezőségét napjainkban is (Frank, 1999).

A napraforgó hazánk legjelentősebb olajnövénye, évente félmillió hektáron termesztik, és mintegy 1,5 millió tonna termést takarítanak be (KSH, 2008). A napraforgó jól alkalmazkodik a szélsőséges termőhelyi adottságokhoz, a termesztés sikerét azonban alapvetően meghatározza a gyomszabályozás, a kártevők és a kórokozókkal szembeni védelem (Sackston, 1981b). A napraforgó legfontosabb betegségei a hazai, kontinentális éghajlati viszonyok között a peronoszpóra, a szártő- és tányérszklerotinia, valamint a fómás és diaportés megbetegedés (Zimmer és Hoes, 1978).

2.2. A napraforgó-peronoszpóra jelentősége

A *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese et de Toni nevű petespórák szervezet (Oomycota, Oomycetes, Peronosporales) a termesztett napraforgó (*Helianthus annuus* L.) egyik legjelentősebb kórokozója, ami betegségre hajlamosító, csapadékos időjárás esetén a termés 70%-át is megsemmisítheti (Sackston, 1981a). A termésveszteség megállapításakor a szisztemikusan fertőzött növényeket veszik alapul. Az 1970-es években az USA fő napraforgó-termesztő területein, Észak-Dakota és Minnesota államokban egyes táblákon a beteg növények mennyisége elérte a 90%-ot (Sackston, 1981a). Kelet-Európában, 1941-ben szintén 90%-os termésveszteséget okozott a napraforgó-peronoszpóra (Novotelnova, 1966). Hazánkban 1955-ben, Tolna megyében 42%-os kártétel alakult ki (Petróczi, 1956), majd az 1970-es években fogékony fajtákon ismét 30–60%-os kárt tapasztaltak (Horváth et al., 2005).

A peronoszpórák megbetegedés végzetes kimenetelű, ugyanis a beteg növény nem gyógyítható, a szisztemikusan fertőzött növény kevesebb termést hoz, sőt erős fertőzés esetén a

növény akár el is pusztulhat (Sackston, 1981a). A betegség enyhe formájában a kórokozó látens formában van jelen az úgynevezett rezisztens fajták föld alatti részeiben (Virányi, 1978), illetve a fejlődő kaszatokban (Cohen és Sackston, 1974a). A látensen fertőzött növény hipokotiljában és gyökerében megfigyelhető az ivaros úton képződő oospóra (petespóra), ami a kórokozó áttelelését és talajban történő felszaporodását szolgálja, valamint lehetőséget teremt új virulenciakombinációk kialakulására (Heller et al., 1997). A fertőzött kaszatban, a vetőmaggal együtt a kórokozó nagy távolságokra is eljuthat, elősegítve ezzel a kórokozó új genotípusainak elterjedését (Novotelnova, 1966; Goossen és Sackston, 1968; Virányi, 1977, Gulya et al., 1997).

2.3. A kórokozó nevezéktana

A napraforgó peronoszpórási betegségének kórokozója eukariotikus gombaszerű szervezet. Sajátosságai alapján a Protoctista (Chromista) országba sorolják, mert a heterokont algákkal van rokonságban (Dick, 2001). Rendszertani besorolása szerint az Oomycota törzs Peronosporomycetes (Oomycetes) osztályának Peronosporales rendjébe tartozik. A kórokozót Észak-Amerikában először Halsted figyelte meg *Eupatorium purpureum*-on 1876-ban a massachusettsi Bussy Intézet közelében (Nishimura, 1922). Farlow 1882-ben *Peronospora halstedii* Farl. néven írta le, majd 1888-ban Berlese és De Toni, a *Peronospora* nemzetség rendszertanának felülvizsgálata után a *Plasmopara* nemzetségbe sorolta a kórokozót, *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berl. et de Toni néven (Sackston, 1981a).

Novotelnova (1962) morfológiai jellemzők és patogentitás kísérletek alapján a *Helianthus* nemzetséget fertőző *Plasmopara*-fajt *P. helianthi* néven új fajként írta le, különbséget téve az eredetileg *Eupatorium*-on meghatározott *P. halstedii* fajtól. A *P. helianthi* fajon belül további formae specialis-okat hozott létre, megkülönböztetve az egyéves termesztett napraforgót fertőző *P. helianthi* f. sp. *helianthi* és az évelő *Helianthus*-fajokat fertőző f. sp. *perennis* és f. sp. *patens* formáktól. Azonban ez a névhasználat nem vált általánossá. Mind a mai napig a kórokozóval kapcsolatban *Plasmopara halstedii* és *P. helianthi* néven egyaránt jelennek meg publikációk.

2.4. A kórokozó gazdanövényköre

A biotróf kórokozók, mint a *Plasmopara halstedii*, taxonómiai és evolúciós jellemzése korábban a gazdanövény-specifikusságra és néhány morfológiai bélyegre korlátozva történt, hiszen életmódbeli sajátosságai következtében morfológiai, fiziológiai, biokémiai és molekuláris tulajdonságaival kapcsolatos ismereteink egyelőre hiányosak (Hall, 1996).

A napraforgó, valamint az *Asteraceae* család több mint 80 nemzetségét felölelő gazdanövénykör peronoszpórák megbetegedését okozza a *Plasmopara halstedii* fajkomplexum (Leppik, 1966). A kórokozó gazdasági szempontból legfontosabb gazdanövénye a *Helianthus annuus*, a termesztett napraforgó, azonban a napraforgó mellett gazdanövénykörébe tartozik legalább 12 vad *Helianthus*-faj is (Virányi, 1984). Továbbá megtalálhatóak köztük gazdasági szempontból jelentős gyomnövények is, melyek közül fontos kiemelni a napraforgótáblákon gyakori gyomokat: a parlagfüvet (*Ambrosia artemisiifolia* L.) a szerbtövist (*Xanthium strumarium* L.) (Leppik, 1966; Virányi, 1984; Virányi és Walcz; 2000), valamint az ívát, azaz a parlagi rézgyomot (*Iva xanthiifolia* Nutt.) (Gulya, 2002).

A patogenitás igazolására Tuboly (1971) sikeresen fertőzött napraforgó-peronoszpórával mesterséges körülmények között egyéb, szintén az *Asteraceae* családba tartozó növényfajokat (1. táblázat).

1. táblázat. A *Plasmopara halstedii* sporulációja eltérő intenzitású az *Asteraceae* családba tartozó gazdanövényeinek mesterséges fertőzését követően (Tuboly, 1971)

Faj	Sporuláció intenzitása
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	++++
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	++
<i>Bidens cernuus</i> L.	++
<i>Centaurea spinulosa</i> Roch.	+
<i>Centaurea cyanus</i> L.	+
<i>Erigeron canadensis</i> L.	++
<i>Helianthus annuus</i> L.	++++
<i>Veronica arvensis</i> L.	++
<i>Veronica polita</i> Fr.	+++
<i>Xanthium strumarium</i> L.	++

Tuboly (1971) eltérést tapasztalt a fertőzés és a sporuláció mértékében a termesztett napraforgó, valamint a vadon élő gazdanövények között, ahol a fertőzés következtében csak részleges elhalást figyelt meg. Magyarországi vizsgálatok először 1982-ben igazolták a kórokozó természetes előfordulását szerbtövisen (Virányi, 1984), majd később parlagfűvön is (Bohár és Vajna, 1996; Virányi és Walcz, 2000). A kórokozót *Helianthus* × *laetiflorus* fajról izolálta Spring et al. (2003) és keresztfertőzéses kísérletekkel bizonyította a termesztett napraforgó fogékonyságát evvel az izolátummal szemben.

Orellana (1970) herbáriumi anyagokon vizsgálta a *P. halstedii* természetes gazdanövénykörét a *Helianthus*-nemzetségben belül. A termesztett napraforgó mellett két egyéves *Helianthus*-fajon (*H. argophyllus* T. et G. és *H. petiolaris* Nutt.), valamint 18 évelő *Helianthus*-fajon figyelte meg a kórokozó természetes előfordulását: *H. divaricatus* L., *H. decapitalus* L., *H. doronicoides* Lam., *H. giganteus* L., *H. grosseserratus* Martens, *H. hirsutus* Raf., *H. × laetiflorus* Pers., *H. lenticularis* Dougl., *H. longifolius* Pursch., *H. maximiliani* Schrad., *H. nuttallii* T et G., *H. occidentalis* Riddell, *H. rigidus* (Cass.) Deaf, *H. scaberrimus* Ell., *H. subrhomboideus* Rydb., *H. tuberosus* L., *H. strumosus* L., *H. trachelifolius* Mill. Laboratóriumi körülmények között Virányi (1984) mesterséges fertőzéssel igazolta a kórokozó patogenitását a *H. annuus*, *H. argophyllus*, *H. debilis*, *H. petiolaris*, valamint *H. divaricatus* és *H. grosseserratus* fajokon.

A kórokozó világméretű elterjedése, majd az azt követő földrajzi izoláció ugyanakkor kedvezett a gazdanövényhez, valamint az adott környezeti viszonyokhoz történő nagyfokú adaptációnak, ami végül a fajon belüli különböző változatok kialakulásához vezetett (Leppik, 1966). A *P. halstedii* fajkomplexum morfológiai vizsgálata, valamint a kórokozó gazdanövény-specializációja alapján eddig 16 új faj elkülönítésére került sor, melyet Leppik (1966) tanulmánya foglal össze (2. táblázat). A morfológiai bélyegekre alapozott fajleírást nehezítette, hogy a *Plasmopara halstedii* izolátumait nagy morfológiai változékonyság jellemzi (Sackston, 1981a; 3. táblázat), így adott esetben a gyökéren keletkező sporangiumok mérete akár a kétszerese is lehet a levélen képződőknek.

A modern molekuláris biológia lehetőséget teremtett arra, hogy a fajok változékonyságát nukleinsav szinten is összevessük. Choi et al. (2009) a *P. halstedii* fajkomplexumba tartozó, parlagfűről, szerbtövistről és napraforgóról származó *Plasmopara*-minták morfológiai és molekuláris-filogenetikai vizsgálata alapján feltételezte, hogy az egyes gazdanövényeket különböző fajok fertőzik. Ezen vizsgálatok kiterjesztése pedig további fajok elkülönítését tenné lehetővé a *P. halstedii* fajomplexumon belül.

2. táblázat. A *Plasmopara halstedii* fajkomplexumon belül, gazdanövény-specializáció alapján meghatározott új fajok (Leppik, 1966).

Alcsalád	Gazdanövény		Kórokozó	Leíró	
	Nemzetség	Faj			
Asteroideae	Vernonieae	<i>Vernonia chinensis</i>	<i>P. vernoniae-chinensis</i> Sawada	Sawada, 1919	
	Eupatorieae	<i>Eupatorium rugosum</i> Houtt. <i>Ageratum</i> sp. <i>Elephanthopus</i> sp. <i>Eupatorium areolare</i> DC.	<i>P. halstedii</i> (Farl.) Berl. és de Toni <i>P. palmii</i> Campbell	Campbell, 1932	
Astereae	Inulae	<i>Aster alpinus</i> L.	<i>P. asterea</i> f. <i>asterea</i> Novot.	Novotelnova, 1963	
		<i>Callistephus chinensis</i> L.	<i>P. asterea</i> f. <i>callistephi</i> Novot.		
		<i>Galatella</i> sp.	<i>P. asterea</i> f. <i>galatellae</i> Novot.		
		<i>Heteropappus canescens</i> Nees.	<i>P. asterea</i> f. <i>heteropappi</i> Novot.		
		<i>Solidago vir aurea</i> L.	<i>P. solidaginis</i> Novot.		
		<i>Gnaphalium purpureum</i> L.	<i>P. gnaphalii</i> Novot.		
		Heliantheae	<i>Helianthus annuus</i> L.		<i>P. helianthi</i> var. <i>helianthi</i> Novot.
			<i>Silphium integrifolium</i> Michx.		<i>P. affinis</i> Novot.
			<i>S. rebinthaceum</i> Jacq.		
			<i>Xanthium strumarium</i> L.		<i>P. angustiterminalis</i> f. <i>angustiterminalis</i> Novot.
		<i>Bidens frondosa</i> L.	<i>P. angustiterminalis</i> f. <i>bidentis</i> Novot.		
		<i>Bidens vulgata</i> Greene			
		<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	<i>P. angustiterminalis</i> f. <i>ambrosiae</i> Ellis és Novot.		
		<i>Spilanthes americana</i> Hieron	<i>P. spilanthicola</i> Sydow	Sydow, 1939	
		<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	<i>P. galinsogae</i> Campbell	Campbell, 1932	
	Helenieae	<i>Emilia</i> sp.	<i>P. halstedii</i> coll.		
	Anthemidieae	<i>Cantaurea</i> sp.			
	Senecioneae	<i>Cineraria</i> sp.			
	Calendulae	<i>Clibadium</i> sp.			
	Arctoteae	<i>Coreopsis</i> sp.			
	Cardueae	<i>Erigeron</i> sp.			
	Mutisieae	<i>Dimorphotheca</i> sp.			
		<i>Franseria</i> sp.			
		<i>Iva</i> sp.			
		<i>Senecio</i> sp.			
		<i>Verbesina</i> sp.			
		<i>Venidium</i> sp.			
		<i>Ximenesia</i> sp.			
		<i>Zinnia</i> sp.			
		<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>P. chrysanthemi-coronarii</i> Sawada	Sawada, 1939	
		<i>Petasites giganteus</i> F. Schmidt	<i>P. petasitidis</i> S.	Ito és Tokunga, 1935	
	<i>Saussurea alpina</i> DC.	<i>P. saussureae</i> Novot.	Novotelnova, 1963		
Cichorioideae		<i>Scorsonera hispanica</i> L.	<i>P. savulescui</i> Novot.		
		<i>Tragopogon pratense</i> L.	<i>P. sphaerosperma</i> Savul.	Savulescu, 1941	

3. táblázat. Napraforgó levelén, illetve gyökerén képződő sporangiumok méretei μm -ben különböző megfigyelések alapján (Sackston, 1981a).

faj	oospóra	sporangium		szerő
		növényi rész	méret	
<i>P. halstedii</i>	23-30		19–30 × 15–26	Saccardo (1888)
<i>P. halstedii</i>		levél	33–57 × 30–36	Nishimura (1926)
		gyökér	48–60 × 33–56	
<i>P. helianthi</i>				Novotelnova (1961-1965)
f. <i>helianthi</i>	15-32	levél	17–30 × 15–21	
		gyökér	33–66 × 33–56	
f. <i>perennis</i>			15–27 × 12–21	
f. <i>patens</i>			15–24 × 12–21	
<i>P. helianthi</i>		levél	17–50 × 14–31	Delanoe (1972)
		gyökér	25–78 × 24–36	

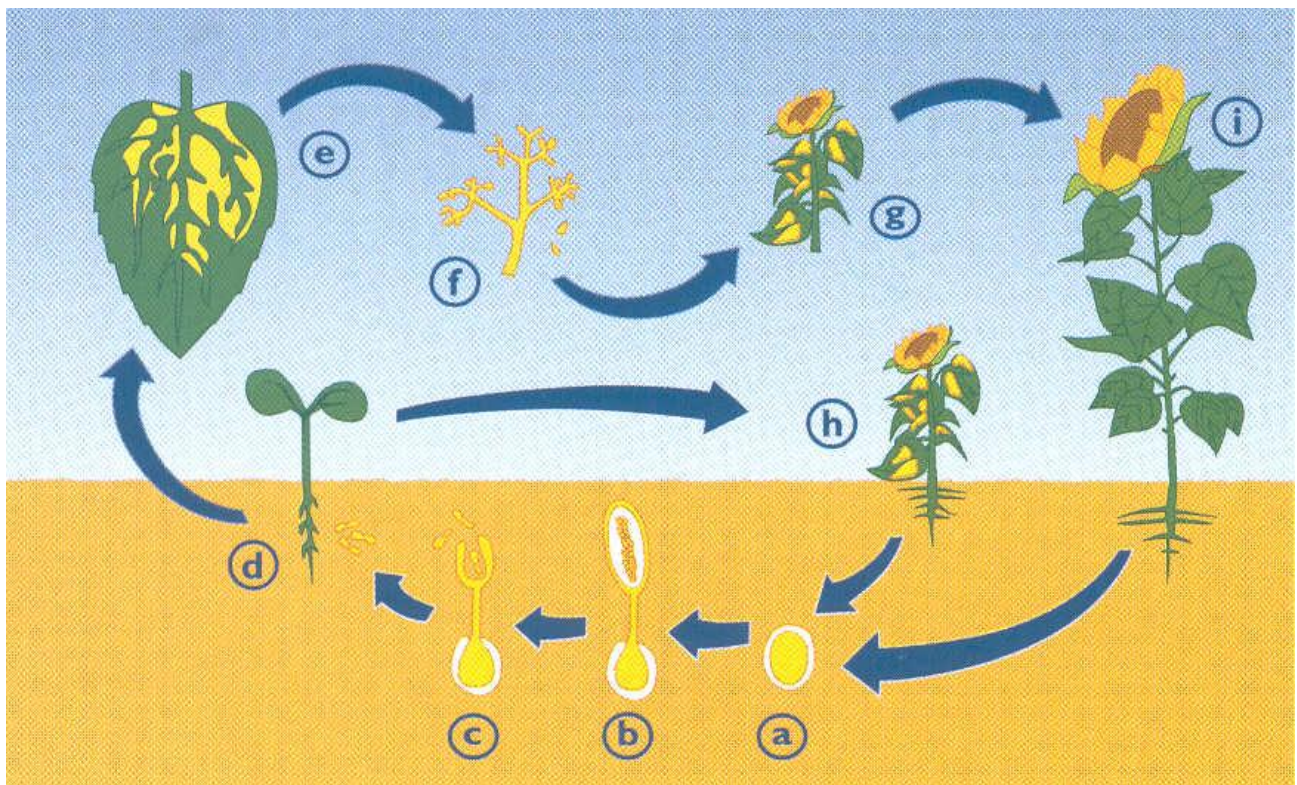
2.5. A kórokozó biológiája

A napraforgó-peronoszpóra életmódjára, biológiájára vonatkozó első összefoglaló vizsgálat Nishimura (1922) nevéhez fűződik. A napraforgó-peronoszpóra tipikus petespórás szervezet, azaz az ivaros szaporodása során oospórákat képez. Vegetatív tenyésztése cönocitikus micélium, vagyis harántfal nélküli hifák szövedéke, harántfalak csak a szaporodás során képződnek. A napraforgó-peronoszpóra esetében a genetikai rekombinációt biztosító ivaros és a kórokozó terjedését szolgáló ivartalan szaporodás évente, rendszeresen megfigyelhető (Virányi, 1992).

Az ivaros szaporodást ivari hormonok szabályozzák, az ivarszervek egyazon telepen képződnek, homotalliás módon. Ivaros szaporodása az oogámia, amelynek során egy nagyobb méretű gömbölyded nőivarú oogóniumba a sejtmag egy kisebb, megnyúlt formájú hímvivarú anteridiumból a megtermékenyítő tömlőn keresztül jut el. Az oospóra nedvesség hatására $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ felett egyetlen makrosporangiumot fejleszt, melyben az ivartalan ciklus során kialakuló sporangiumokhoz hasonlóan rajzospórák (zoospórák) képződnek, és ezek indítják el a fertőzés folyamatát (Virányi, 1988). A *P. halstedii* életciklusát az 1. ábra szemlélteti. A beteg növények gyökér- és szárszövegeiben képződő oospóra a talajba kerülve évekig megőrzi élet- és fertőzőképességét. A kórokozó áttelelését és terjedését biztosítják még a fertőzött növény kaszatjában áttelelő gombaképletek, a micélium és az oospóra. Az ilyen kaszatokból – bár nagyon ritkán – szisztémikusan fertőzött növények fejlődhetnek (Cohen és Sackston, 1974a). Fertőzött talajban az oospóra a napraforgógyökér-exudátumainak hatására makrosporangiumot fejlesztve csírázik, majd az abból kiszabaduló rajzospórák fertőzik a növény föld alatti részeit, a gyökeret és a

hipokotilt (Allard, 1978). A fertőzéshez megfelelő talajnedvesség és a kórokozó számára kedvező 15–20 °C közötti talajhőmérséklet, valamint szabad víz jelenléte szükséges (Cohen és Sackston, 1973). A kórokozó a gazdanövényben intercellulárisan növekszik, és a tápanyagot a gazdasejtekbe bocsájtott hausztóriumon keresztül veszi fel. A napraforgó-peronoszpóra tehát obligát biotróf módon, csak az élő sejtekből képes hozzájutni az életműködéséhez szükséges tápanyagokhoz.

Vegetációs időben a kórokozó terjedését a fertőzött növényen képződő ivartalan sporangiumok biztosítják. A fertőzött növényi részekben, leggyakrabban a levél fonákán, 16–18 °C hőmérsékleten, telített relatív páratartalom mellett alakul ki a jellegzetes, háromszorosan elágazó, terminális növekedésű sporangiumtartó a sporangium. A sporangiumok csírázása vizes közegben 4–24 óra alatt játszódik le, melynek során sporangiumonként akár 30, kétstoros rajzospóra is képződhet (Spring et al., 1998). A vízben mozgó rajzospórák idővel elveszítik ostoraikat és tisztálódnak, vagyis sejtfallal veszik körül magukat. Az így kialakult tisztospóra fertőző hifát, azaz csíratömlőt hajt, és az epidermiszen áthatolva kolonizálja a gazdanövényt.



1. ábra. A *Plasmopara halstedii* életciklusa (Syngenta katalógus, Virányi F. nyomán). A talajban az oospóra (a) makrosporangiumot fejleszt (b), melyből kiszabadulnak a fertőzést indító rajzospórák (c). A primer fertőzést követően (d) a növény törpül (h), kialakul a klorotikus levélfolt (e), a levélfonákon sporangiumtartó képződik, amin ivartalan sporangiumok fejlődnek (f). A sporangium légmozgás útján jut az egészséges növényre és másodlagosan fertőzi a levelet (g), a virágzatot (i) és a kaszatot.

2.6. A betegség tünetei

A kórokozó a növényt minden fenológiai stádiumban képes megfertőzni (Tuboly, 1971). Az okozott kár súlyosságát befolyásolja a növény kora, kondíciója, valamint az időjárás (Spring et al., 1991). Megkülönböztetünk elsődleges szisztemikus, másodlagos lokális (Leppik, 1966; Kurnik et al., 1976) és látens fertőzési formákat (Goossen és Sackston, 1968).

Az elsődleges, vagy primer fertőzés kialakulása a kaszatok csírázásától a növények 4–8 leveles koráig a legvalószínűbb (Sackston, 1981a). A napraforgó ekkor a legfogékonyabb a peronoszpórával szemben. A szisztemikusan fertőzött növény a fejlődésben visszamarad, betakarítható termést nem hoz. Korai, erős fertőzés következtében a fiatal növény elszáradhat, elpusztulhat.

A betegség legjellegzetesebb tünete a leveleken figyelhető meg. A levélnyel felől a levélerek mentén klorotikus folt alakul ki, a levelek fonákán hófehér sporangiumbevonat figyelhető meg. Spring et al. (1991) vizsgálata szerint a fertőzött növény levélfelülete 15%-kal csökkent az egészségeshez viszonyítva, miközben közel 1/3-ával több levél képződött, továbbá a fertőzés következtében csökkent a növény magassága is. A beteg növények törpülése a kórokozó által termelt auxinbontó enzim hatására alakul ki (Cohen és Sackston, 1974b, Benz és Spring, 1995). Az internódiumok rövidülése következtében sűrű levélállás, valamint a felső levelek megvastagodása és torzulása gyakorta megfigyelhető. A fertőzött növény érésben könnyen felismerhető mereven felfelé álló tányérjáról. Sokszor az ilyen növény virágzata steril, a tányérban fejletlen, léha kaszatok képződnek.

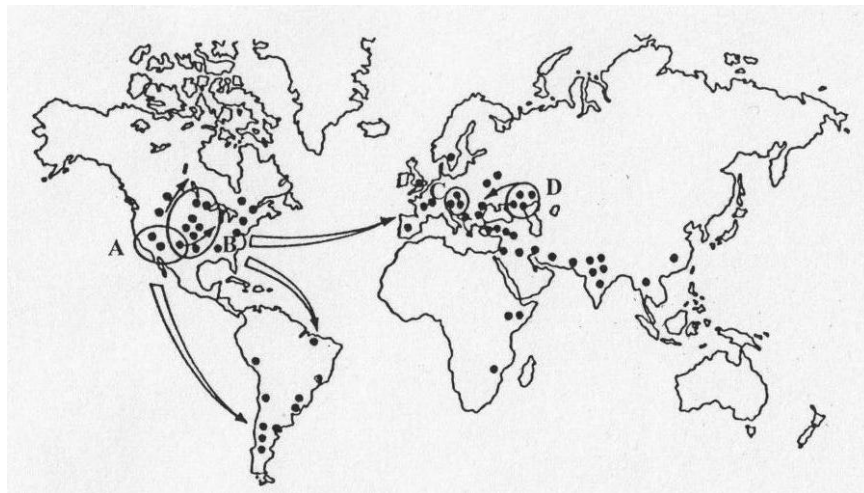
A vegetáció során képződő ivartalan szaporítóképletek, a sporangiumok a fertőzött szövetrészek felületéről légmozgással juthatnak a növényre, ahol másodlagos fertőzést indíthatnak el. Ekkor a levélen szegletes, erek által határolt klorotikus foltok alakulnak ki. Betegségre hajlamosító időjárási viszonyok között az ilyen lokális fertőzés másodlagosan szisztemizálódhat, aminek során a folt az erek mentén terjed. A kórokozó a levélnyelen keresztül eljut a növény szárába, ahol a növény csúcsi része felé haladva a jellegzetes betegségi tünetek kialakulását idézheti elő. Ilyenkor a másodlagos fertőzés felett fejlődő növényi részek törpülése szintén megfigyelhető (Novotelnova, 1966; Goossen és Sackston, 1968; Cohen és Sackston, 1974a; Virányi, 1978; Spring, 2009).

Látens fertőzéskor a jellegzetes, klorotikus betegségi tünet nem alakul ki, azonban a kórokozó jelen van a növényben, és a kaszatokból is kimutatható. A látens fertőzött növény hipokotiljában és gyökerében megfigyelhetők az ivaros úton képződő oospórák, ezek a kórokozó talajban történő fennmaradására, valamint új virulenciakombinációk kialakulására adnak lehetőséget (Virányi, 1978; Heller et al., 1997). A látencia másik típusa, amikor a rezisztensnek vélt napraforgó-genotípus

másodlagos szöveteit a kórokozó nem képes kolonizálni (Virányi és Dobrovolszky, 1980). Ilyenkor a kórokozó növekedése mindössze a föld alatti növényrészekre korlátozódik, ahol megfigyelhetőek a betegségre utaló elváltozások, úgy mint a hipokotillézió, gyökérredukció. A fertőzött szövetekben kimutatható a kórokozó micéliuma, valamint oospórája (Virányi, 1978).

2.7. A kórokozó földrajzi elterjedése

Az Észak-Amerikában őshonos *P. halstedii* feltehetőleg vetőmag kereskedelem következtében rövid idő alatt elterjedt a világ jelentős napraforgó-termesztő körzeteiben (2. ábra). Az Ausztrál kontinens kivételével (Virányi, 2002) a kórokozó Európában, Ázsiában, Észak és Dél-Amerikában, Dél-Afrikában egyaránt megtalálható (Sackston, 1981a). A faj első Szovjetúnióbeli előfordulását 1931-ben közölték, majd a 1940-es évektől Romániában, Bulgáriában, Jugoszláviában, végül 1949-ben hazánkban is megjelent (Podhradszky, 1954). A betegség kialakulásának kedvező 1954-es évtől az egész ország területén megfigyeltek beteg töveket, kezdetben főként a táblaszéleken. A kórokozó jelentősége ettől kezdve folyamatosan nőtt a termesztett napraforgó gazdasági súlyának növekedésével egyetemben.



2. ábra. A napraforgó elsődleges (A) és másodlagos (D) géncentruma, ill. a *Plasmopara halstedii* elsődleges (B), és másodlagos (C) géncentrumai. A pontok a világ fő napraforgó-termesztő körzeteit jelölik, míg a nyilak a terjedés irányát mutatják (Virányi, 2002).

2.8. A virulencia-fenotípus változékonysága

A napraforgó-peronoszpóra korábban patológiailag egységes populációja az elmúlt négy évtized alatt jelentős átalakuláson ment keresztül. A világméretű elterjedés, a földrajzi izoláció, valamint a gazdanövényekhez és a környezethez történő alkalmazkodás kedvezett a fajon belüli változatok, vagyis rasszok (patotípusok) kialakulásának (Virányi, 2002). Ez a változatosság Virányi (2002) szerint két fokozatban jött létre:

1. A faj interkontinentális elterjedése és adaptálódása a természetett napraforgóhoz a természetes koevolúció jegyében, a XVI–XX. században.
2. A nemesítői munka eredményeként megváltozott gazdanövény-genotípusokhoz adaptálódott patológiai változatok elkülönülése az 1960-as évektől kezdődően, az egyes földrajzi régiókban, a mesterséges koevolúció jegyében.

A kórokozó virulenciaszinten történő megváltozását először 1972-ben észlelték az Egyesült Államokban (Zimmer, 1974). Észak-Dakotában, a Red River-völgyben azonosított változatot 2-es, vagy Red River rassznak nevezték el, mely az Európából származó, rezisztensnek vélt növényeket betegítette meg (Zimmer, 1974). A 2-es rassz sokáig csak az Egyesült Államokban volt jelen, bár a Szovjetunióban és Romániában kísérleti területeken szintén jelezték előfordulását (Gulya et al., 1991a). Idővel Braziliában és Indiában is megfigyelték a 2-es rasszt, melyet feltételezések szerint fertőzött vetőmaggal hurcoltak be (Sackston, 1992). 1980-ban Amerikában megjelent és hamarosan uralkodóvá vált a 3-as (Carson, 1981), majd ezt követte a 4-es rassz megjelenése (Gulya és Urs, 1985). Az 5-ös rasszra nagy virulenciájú üvegházi mutánsként figyeltek fel, amit a 6-os rassz megjelenése követett (Gulya et al, 1991a).

Mindeközben az európai populáció hosszabb ideig egységes maradt, csak az 1-es patotípus, az európai rassz volt ismert (Virányi, 1991). Az első új változatokat 1988-ban Franciaországban (Tourvieille et al., 1988), majd egy évvel később Magyarországon is megfigyelték (Virányi és Masirevic, 1990). Bár az új rasszok többségét Amerikában írták le, ezek idővel Európában is megjelentek (Virányi, 1991). Így például hazánkban 1989-ben az első új virulenciatípus a 4-es rassznak bizonyult (Virányi és Masirevic, 1990). A *P. halstedii* rasszok időbeli megjelenését és elterjedését 1972-1990 között a 4. táblázat foglalja össze (Virányi, 1991).

4. táblázat. *Plasmopara halstedii* rasszok megjelenése és elterjedése az 1972 és 1990 közötti időszakban (Virányi, 1991).

Rasz	Első előfordulás	Közlés éve	Leíró	Elterjedés	Hivatkozás
1 „európai”				Európa, Amerika, Afrika, Ázsia,	Sackston, 1981a
2 „Red River”	USA	1972	Zimmer és Kinman	É-Amerika Brazília, India	Zimmer és Kinman, 1972 Gulya et al., 1991b
3	USA	1980	Carson	USA Argentína Magyarország Olaszország	Carson, 1981
4	USA	1985	Gulya és Urs	USA Bulgária Franciaország Magyarország	Gulya et al., 1991b Virányi és Gulya, 1991
5	USA	1988	Ljubich, Gulya és Miller	USA	Ljubich et al., 1988
6	Kanada, Franciaország Argentína	1990	Gulya és Sackston	Kanada Franciaország	Gulya et al., 1991a
7	Argentína	1990	Gulya és Garcia	Argentína	Gulya et al., 1991a
8	USA	1990	Garcia és Gulya	USA	Garcia és Gulya, 1991

A gazdanövény rezisztenciáját hatástalanító új patotípusok (rasszok) virulenciafaktorok szempontjából mára már nagy változatosságot mutatnak. A későbbiekben mind Európában, mind Amerikában, sőt Ausztrália kivételével valamennyi lakott földrészen a kutatók különböző virulenciájú *P. halstedii* patotípusokat írtak le (Garcia és Gulya, 1991; Sackston, 1981a; Virányi és Gulya, 1995; Viljoen et al., 1997; Rozynek és Spring, 2000; Tosi és Zizzerini, 2004; Tourvieille et al., 2000b), ezek száma mára meghaladja a 30-at (Gulya, 2007) (5. táblázat). Hazánkban az eddigi vizsgálatok hat különböző virulenciájú rassz vagy patotípus jelenlétét bizonyították (Virányi és Gulya, 1995), melyek közül öt stabilan megtalálható az országban. A nagyfokú változékonyság és világméretű elterjedés szükségessé tette a patológiai változatok azonosítására alkalmazott módszerek egységesítését.

5. táblázat. A *Plasmopara halstedii* virulencia-fenotípusai és azok elterjedtsége a világon (Gulya, 2007)

Rasz	USA	Kanada	Argentína	Franciaország	Németország	Spanyolország	Olaszország	Magyarország	Bulgária	Szerbia	Oroszország	Románia	Törökország	Marokkó	Dél-Afrikai Közt.	India	Kína	Adott rasz között előfordulása
100	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
300	x	x	x	x	x	x	x		x		x	x	x	x	x	x	x	15
304				x														1
307				x														1
310		x			x	x					x							4
314				x														1
323		x																1
330	x		x		x			x			x	x	x	x	x			8
333		x																1
334				x														1
500															x			1
502		x																1
560		x																1
563		x																1
700	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x		x			12
702		x																1
703	x	x		x	x	x	x			x			x		x			9
704				x			x											2
707				x														1
710	x	x	x	x	x	x		x		x	x		x		x			11
713										x			x					2
714				x														1
717				x														1
720					x													1
722		x																1
723		x													x			2
730	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x			13
731		x																1
732	x	x																2
733	x	x																1
740	x																	1
743		x																1
750										x								1
770	x	x	x		x	x		x					x		x			8
772	x	x																2
rasz/ ország	12	20	5	14	10	8	5	6	4	7	7	3	8	4	10	2	2	

2.9. A virulencia-fenotípus meghatározásának módszere

A virulencia meghatározásának alapja az adott rezisztenciagéneket hordozó tesztnövény sor fertőzésével kapott rezisztens, illetve fogékony kapcsolatok összessége. A virulencia nemzetközi összehasonlíthatósága érdekében az egységesített vizsgálati módszertan kialakítását Sackston et al. (1990) és Gulya et al. (1991a) vetették fel, majd Tourvieille et al. (2000a) a napraforgó-nemesítő intézetek és növénypatológusok nemzetközi összefogásával kialakították a szabadon hozzáférhető, kilenc beltenyesztett vonalból álló differenciálótesztet.

A differenciáló fajtasor elemeit három ún. tripletbe csoportosították. A vonalak sorrendje a teszt értékelésekor kötött. Fogékony kapcsolat esetén a növény differenciáló fajtasoron belüli pozíciójának függvényében 1, 2, vagy 4-es értéket kap, míg a rezisztens kapcsolat 0-t. A tripletenként összegzett értékeket egymás után írva egy háromjegyű számot kapunk, mely az adott izolátum virulenciakódját jelöli (Tourvieille et al., 2000a) (6. táblázat). Így a virulencia-fenotípus megadja az adott izolátum tulajdonságát a különböző rezisztenciagéneket felvonultató növényekkel szemben, továbbá lehetővé válik korábban ismeretlen virulencia-tulajdonságokat mutató izolátumok elnevezése.

A differenciálóteszt alkalmazása világított rá arra, hogy a korábban 7-es és 9-es rasszként azonosított izolátumok virulencia-fenotípusa azonos, mindkettő a 330-as patotípusra jellemző virulencia-faktorokat hordozza (6. táblázat). Az új tesztelési módszer egyértelműen meghatározta a francia kutatók által korábban használt A-D betűkódos rasszok virulencia-összetételét is (Tourvieille et al., 2000a) (6. táblázat). A differenciáló tesztben használt vonalakat, azok helyét a tripletekeben, illetve a korábban használatos rasszmeghatározások konverzióját a tripletkódra az 6. táblázat foglalja össze (Tourvieille et al., 2000a).

A tesztelési módszer egységesítése ellenére is előfordulhatnak eltérések a különböző laboratóriumok eredményei között. A tesztelés során a növény/kórokozó-rendszer sajátosságai következtében kialakuló átmeneti reakciók értelmezése nem megoldott. Bizonyos differenciáló vonal és izolátum kapcsolatában előfordulhat, hogy az eredmények túlságosan szórnak, esetleg a növényi reakció nem egyértelműen fogékony vagy rezisztens, hanem átmeneti jellegű. A tesztelés eredménye kétségessé válhat ha az izolátum nem tiszta, azaz virulencia szempontjából szegregálódik. Adott vonalon az eredmények szórása akkor is kialakulhat, ha maga a differenciáló vonal nem tiszta, fenntartási vagy előállítási hiba következtében. Tapasztalat, hogy a kórokozó fejlődéséhez kedvezőtlen környezeti tényezők (pl. magas hőmérsékelt) befolyásolhatják az üvegházi tesztelés eredményét.

6. táblázat. Nemzetközileg elfogadott, *Plasmopara halstedii* rasszokat differenciáló sor elemei, és rezisztenciareakciói a különböző rasszokkal szemben. Összehasonlító táblázat a korábban használt rassznevezéktanok és az újabban alkalmazott virulencia-fenotípuskód megfeleltetésére (Tourvieille et al., 2000a).

USA kód	Korábban leírt patotípusok virulencia-összetétele											Új nevezéktan	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	X ^a	fogékony kapcsolat értékelése
Francia kód		D	C					A		B			
Differenciáló sor													
1. triplet													
D1: HA-304	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S:1
D2:RHA-265	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S:2
D3:RHA-274	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S:4
2. triplet													
D4:DM-2	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S:1
D5:PM-17	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S:2
D6:803-1	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S:4
3. triplet													
D7:HAR-4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S:1
D8:HAR-5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S:2
D9:HA-335	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S:4
Új virulenciakód	1	3	7	7	7	3	3	7	3	7	7	3	7
	0	0	0	3	7	1	3	1	3	0	1	0	7
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4	7

^a új rassz virulenciakarakterének meghatározása. Az S fogékony, az R rezisztens kapcsolatot jelöl. A differenciálóteszt értékelésekor a rezisztens (R) kapcsolat minden esetben 0, a fogékony (S) kapcsolat a tripleten belül elfoglalt helyének függvényében 1, 2 vagy 4-es értéket kap. A virulencia-fenotípust a tripletenként összegzett, egymás után írt három számjegy adja meg.

2.10. A napraforgó-peronoszpóra elleni védekezés

Mivel a fertőzés kiindulhat talajból, terjedhet maggal és a levegőben, szántóföldi körülmények között nem könnyű a betegség ellen védekezni. Látens módon fertőzött kaszattal a kórokozót nagy távolságokra szállíthatjuk a vetőmag-kereskedelem révén, elősegítve a kórokozó új genotípusainak elterjedését. A kórokozó elleni védekezést bonyolítja az is, hogy a napraforgó-peronoszpóra a rezisztens növényeken is okozhat lokális tüneteket és fertőzést (Delanoe, 1972; Cohen és Sackston et al., 1974a; Allard, 1978). A napraforgó-peronoszpóra elleni védelem alapja a megelőzés, az agrotechnika, a genetika és a kémiai védelem eszközeinek együttes alkalmazásával.

2.10.1. A védelem agrotechnikai eszközei

Agrotechnikai szempontból legfontosabb eszköz a 4–5 éves vetésforgó megtartása és a nem kívánatos gazdanövények (árvakelészű napraforgó, szerbtövis, parlagfű) irtása (Horváth et al., 2005). Fontos továbbá a vetésidő helyes megválasztása. Korai vetés esetén hűvös, nedves időben a növény vontatottan csírázik, így kitolódik a korai fertőzéshez kedvező időszak (Cohen és Sackston, 1973). A korábbi évek tapasztalata alapján szintén elmondható, hogy a május elején kialakuló lehülés csapadékos időjárással párosulva kedvez a kései vetésű, megfelelő rezisztenciagéneket nem tartalmazó napraforgó megbetegedésének, a csávázás és a vetésforgó betartása ellenére is.

2.10.2. A védelem genetikai eszközei

A kórokozó elleni védelem a gyakorlatban a rezisztens fajták alkalmazására épül. Először Sackston és Goossen 1966-ban számolt be egy dominánsan öröklődő rezisztenciagént tartalmazó, peronoszpóra-ellenálló napraforgóvonalról, majd ugyanabból a vonalból néhány évvel később Vranceanu és munkatársai azonosították a dominánsan öröklődő P11-rezisztenciagént (Sackston, 1981a). Az első rezisztens napraforgófajták előállítását követően a korábban egységesnek ismert populáción belül, a nagyobb napraforgó-termesztő vidékeken hamarosan megjelentek a kórokozó új patológiai változatai. Az új patotípusok megjelenése szükségessé tette további rezisztenciaforrások keresését (Vear és Leclercq, 1971; Zimmer és Kinman, 1972; Vear, 1974).

A rasszspecifikus, vagy vertikális rezisztencia, a gén-génnel szembeni rezisztencia speciális kölcsönhatásán alapszik, ami a kórokozó virulenciagénje és a gazdanövény rezisztenciagénje között

alakul ki (Flor, 1971). Eddig mintegy nyolc rezisztenciagént azonosítottak a napraforgó-peronoszpórával szemben, további hetet pedig közvetve bizonyítottak (Miller és Gulya, 1988; Sackston et al., 1990; Gulya et al., 1991a). A jelenleg ismert rezisztenciaforrásokat tartalmazó napraforgóvonalakat és azok feltételezett rezisztenciatulajdonságait a 7. táblázat foglalja össze (Virányi, 1991). A nem rasszspecifikus, Pl génektől független rezisztencia csak részleges védelmet nyújtott a peronoszpórával szemben (Vear et al., 2006). Amíg a kórokozó ellen a vertikális rezisztenciát nem sikerül horizontális, illetve tartós rezisztenciával is kibővíteni, a hatékony védekezés végett feltétlenül szükséges a genetikai védelmet kiegészíteni, illetve megerősíteni a kémiai védelemmel.

7. táblázat. Napraforgó-peronoszpóra ellen hatékony rezisztenciagének forrása és hatékonysága a kórokozó különböző raszaival szemben (Virányi, 1991).

Napraforgóvonal	Azonosított/feltételezett rezisztenciagén(ek)	<i>P. halstedii</i> rassz							
		1	2	3	4	5	6	7	8
HA-300	-	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA-265	Pl ₁	-	+	+	+	+	+	+	+
HA-61	Pl ₂ , Pl ₃ +?	-	-	+	+	+	-	-	+
HIR-34	Pl ₄₊ ?	-	-	+	+	+	-	-	+
DM-2	Pl ₂ , Pl ₅ +?	-	-	-	+	+	+	+	+
RHA-325	Pl ₂ , Pl _b	-	-	+	+	+	+	-	+
RHA-274	Pl ₂ , Pl _a , Pl _b	-	-	+	+	+	-	-	+
DM-4	Pl _{c+} ?	-	-	-	-	+	-	+	-
DM-5	Pl _{d+} ?	-	-	-	-	+	-	-	-
DM-6	Pl _{e+} ?	-	-	-	+	+	-	-	-
HA-335,336	Pl ₆₊ ?	-	-	-	-	-	-	-	-
HA-337	Pl ₇₊ ?	-	-	-	-	-	-	-	-
799-1	?	-	-	-	-	+	-	-	-
803-1	?	-	-	-	-	+	-	-	-
RHA-340	Pl ₈₊ ?	-	-	-	-	-	-	-	-
HA-R4	Pl _{f+} ?	-	-	-	-	-	-	-	-
HA-R5	Pl _{g+} ?	-	-	-	-	-	-	-	-

+: fogékony; -: rezisztens

2.10.3. A kórokozó elleni kémiai védelem

A betegség ellen metalaxil és mefemoxam hatóanyagot tartalmazó vetőmagcsávázással lehet eredményesen védekezni mind a primer fertőzés, mind a korai szisztémikus tünetek kialakulása ellen (Melero-Vara et al., 1982; Virányi és Oros, 1991), ami hatékonyan gátolja a kórokozó

terjedését a növényben (Mouzeyar et al., 1995). A metalaxil rendszeres használata az 1990-es években, Franciaországban jelentősen csökkentette a *P. halstedii* által okozott termésveszteséget annak ellenére, hogy a termesztett fajták többsége ekkor még nem rendelkezett genetikai rezisztenciával a kórokozó új patotípusaival szemben (Penaud, 1994). Genetikai védelem hiányában azonban a kórokozó számára kedvező csapadékos évjáratokban a szer lemosódása következtében a kaszatsávázás ellenére is felléphet a betegség (Covarelli és Tosi, 2006).

A metalaxil hatóanyagú Apron (Ciba Geigy) 1979-ben került először forgalomba Magyarországon. Miután világszerte számos, a *Peronosporales*-rendbe tartozó növénykórokozó esetében is megfigyelték a szer hatékonyságának csökkenését, a rezisztencia problémák kezelése érdekében az Apron hatóanyagát leváltották a metalaxyl-M izomerre, a mefemoxamra (Shetty, 1998). A metalaxil hatóanyaggal szemben először 1995-ben, Franciaországban figyeltek meg toleráns napraforgó-peronoszpóra populációt (Albourie et al., 1998), ahol a szer százszoros dózisban sem gátolta a kórokozó fejlődését. Ezt követően Spanyolországból Molinero-Ruiz et al. (1999, 2003), újabban Németországból Spring et al. (2006b) számolt be hasonló jelenségről. Észak-Amerikában 1998-ban gyűjtött izolátumok 95%-a, az 1999-ben gyűjtött izolátumoknak pedig 85%-a bizonyult toleránsnak a metalaxillal szemben (Gulya, 2000). A Molinero-Ruiz et al. (2005, 2008) által vizsgált metalaxilrezisztens *Plasmopara*-izolátumok mefemoxammal szemben is toleránsnak bizonyultak.

Az petespórás kórokozók ellen használatos hatóanyagok közül a propamokarb, fluazinam, folpet, mankoceb, valamint kombinációkban dimetomorf és mankoceb, cimoxanil és mankoceb, ofurace és folpet készítmények gátolták ugyan a primer fertőzést, a másodlagos fertőzéssel szemben azonban nem adtak védettséget (Albourie et al., 1998). Az azoxistrobin és a dimetomorf/mankoceb-kombináció bár visszafogta a kórokozó fejlődését, a gyökér és hipokotil fertőződését nem gátolta meg (Gulya, 2000). A strobilurinok közé tartozó trifloxistrobint (Bayer) csávázószerként, majd ezt követően állományban alkalmazva, jelentősen csökkentette a betegség fellépését szántóföldi kísérletekben (Sudisha et al., 2010). Növényi aktivátorok (BION 50WP, BABA) az indukált rezisztencia mechanizmusait aktiválva szintén csökkentették a fertőzés mértékét (Virányi és Spring, 2010).

2.11. A *Plasmopara halstedii* változékonyságának kimutatására alkalmazott módszerek

2.11.1. Fenotípusos változékonyság kimutatása

A taxonómiai és evolúciós munkák jelentős része a biotróf kórokozókat gazdanövény-specifikusság és néhány morfológiai bélyegek alapján azonosítja (Hall, 1996). A napraforgó-peronoszpóra populációinak jellemzésére a fenotípusos változékonyság feltárására morfológiai és virulenciabeli változékonyságot, valamint gazdanövénykört és fungicidérzékenységet vizsgáltak. Kizárólag a morfológiai bélyegek vizsgálata nem támasztotta alá a kórokozó faj gazdanövény szerinti specializációját (Spring et al., 2003; Walcz et al., 2000; Bohár és Vajna, 1996). Napraforgóról izolált 94 *Plasmopara halstedii* izolátum sporangiumainak mikroszkópi vizsgálata változatos sporangiumalakról és -méretről tanúskodott (Sakr et al., 2008); a morfológiát főleg a gazdanövény kora és genotípusa befolyásolta, a morfológiai eltérések a virulenciatípussal nem voltak összefüggésbe hozhatóak.

2.11.2. Fungicidérzékenység

A metalaxil csávázáshoz regisztrált aktív hatóanyag mennyisége 2100 mg/kg. A metalaxilra érzékeny izolátumok gátlásához 210 mg/kg, az előírt dózis tizede már teljes hatékonyságot fejtett ki (Albourie et al., 1998). Virányi et al. (1992) 1-2 mg/kg aktív metalaxil hatóanyag mellett eltérő érzékenységet tapasztalt a vizsgált izolátumok között.

A *P. halstedii* fungicidérzékenységének üvegházban vagy szabadföldön történő vizsgálata idő- és munkaigényes (Virányi és Oros, 1991; Gulya, 2000). A napraforgó-peronoszpóra fenilamidokkal szembeni érzékenységének gyors és megbízható, laboratóriumi körülmények között elvégezhető sziklevélteszteléses vizsgálati módszerét Rozynek és Spring (2001) dolgozta ki, melynek nagy előnye a kis helyigény és az egyszerű kivitelezhetőség.

2.11.3. Zsírsvamintázatok elemzése

Spring és Thines (2004) szerint a biotróf peronoszpórafélékhez tartozó fajok taxonómiai azonosításához a klasszikus morfológiai vizsgálatok és a DNS-alapú vizsgálatok mellett egyéb módszereket is ajánlatos alkalmazni, mivel a megfigyelhető tulajdonságok száma véges. A javasolt új markerek között szerepel a zsírsvamintázatának vizsgálata. Így például a *P. halstedii* zsírsvamösszetételét specifikus mintázat jellemzi, elkülönítve azt az egyéb *Plasmopara* (*P. pusilla*, *P. viticola*)-fajoktól (Spring és Haas, 2002).

2.11.4. Genotípusos változékonyság

A populációk genotípusos változékonyságának két fő összetevője a fellelhető genotípusok száma, illetve a genotípusok populáción belüli eloszlása. A genotípusok vizsgálata segítséget adhat a fertőzést indító primer inokulumforrás meghatározásához (Zwankhuizen et al., 1998). A kórokozók változékonysága és a genotípusok térbeli eloszlása utal azok klonális vagy ivaros szaporodási jellegére (Hovmoller et al., 2002). A szexuális rekombináció során nő a populáció genetikai változékonysága (Brown, 1999), továbbá az ivaros és ivartalan módon képződő szaporítóképletek megjelenése és terjedése eltérő tulajdonságot mutathat a vegetáció során. A genetikai markerek alkalmazása rávilágíthat a patogénitásteszt segítségével nem kimutatható gazdanövény-specializáció jelenségére (Peever et al., 2000) és becsülhetővé válik a széles gazdanövénykörrel rendelkező kórokozók esetében a termőterületet övező gyomgazdák potenciális hatása a kórokozó variabilitására.

2.11.5. Nukleinsav alapú vizsgálati módszerek

A molekuláris módszerek elterjedése egyre szélesebb körben tette lehetővé a kórokozók genetikai szintű vizsgálatát. A fajspecifikus markerek alkalmazása diagnosztikai szerepet tölt be (McCartney et al., 2003; Lievens et al., 2006). A molekuláris módszerek alkalmazása a fajon belüli változékonyság vizsgálatához is nélkülözhetetlenné vált. A számos molekuláris szintű variabilitás kimutatását célzó módszer eltérő felbontási szinten, avagy érzékenységgel tud információt adni a

vizsgált szervezetről. Az alkalmazott módszer behatárolja a mintában azonosítható genotípusok maximális számát (Grünwald et al., 2003).

Cooke és Lees (2004) az ideális populációvizsgálati módszer tulajdonságait az alábbiakban foglalta össze:

- i. Nagy mintamennyiség feldolgozását tegye lehetővé, elérhető, pl. PCR-alapú módszerrel.
- ii. Legyen a módszer laboratóriumok között könnyen ismételhető, kiértékelése egyértelmű.
- iii. Legyen flexibilis, akár fertőzött növényi anyagból is kimutatható a vizsgált tulajdonság.
- iv. Genetikai analízisre is alkalmas eredményt adjon nem kapcsolt tulajdonságok kodomináns kimutatásával.
- v. A módszer legyen széleskörűen elfogadott.
- vi. A vizsgálat ne járjon egészségügyi kockázattal.

A populációbiológiai elemzések általában 5–15 nem kapcsolt, egyszerű öröklődésű, kodomináns tulajdonság vizsgálatán alapulnak (Delmotte et al., 1999; Enjalbert et al., 2002). A kórokozó populációban bekövetkező változások és a változatok forrásának megismeréséhez, megfelelő számú és összehasonlítható módszerekkel jellemzett mintából nemzetközi adatbázis létrehozása szükséges (Cooke és Lees, 2004).

A molekuláris variabilitás vizsgálatára kidolgozott módszerek közül a fajon belüli variabilitás kimutatására számos eljárás ismert. A *P. halstedii* populációk molekuláris vizsgálatának sorát az RFLP- (Restriction Fragment Length Polymorphism) módszer alkalmazásával Borovkov és McClean (1993) kezdte, azonban patotípusok elkülönítésére megfelelő változékonyság ezzel a módszerrel nem volt kimutatható. A változékonyságért felelős gének ismeretének hiányában a PCR-technika elterjedése tette lehetővé a véletlenszerűen felszaporított nukleinsavszakasz polimorfizmusának vizsgálatát. A napraforgóperonoszpóra-populációjának vizsgálata RAPD- (Randomly Amplified Polymorphic DNA) módszerrel nem eredményezett kellő polimorfizmust a virulenciatulajdonságok jellemzésére (Borovkova et al., 1992; Roedel-Drevet et al., 2003).

A RAPD- és az RFLP-módszerek előnyeit ötvözi az AFLP- (Amplified Fragment Length Polymorphism) módszer, melynek lényege, hogy a teljes genomi emésztést követően szelektíven szaporít fel ujjlenyomat vizsgálatra alkalmas DNS-szakaszokat PCR-technikával (Vos et al., 1995). Az AFLP-módszer sikeresen alkalmazható faj alatti variabilitás, például, fajtak azonosítására (Manubens et al., 1999; Scherer és Gisi, 2006) olyan esetben is, amikor például ITS-polimorfizmus nem figyelhető meg (Abelin et al., 2002). Bár a módszer kétségtelenül ígéretesnek tűnik alacsony

szintű polimorfizmust mutató fajok populációvizsgálatára, a napraforgó-peronoszpóra esetében ilyen jellegű átfogó tanulmány még nem készült.

A rövid ismétlődő DNS-elemek, mint például a mikroszatellitek, illetve miniszatellitek, valamint a mozgó genetikai szakaszok (például a retrotranszpozonok), illetve ezek különböző változatai a gombák genetikai állományában is nagy számban megtalálhatóak (Wöstemeyer és Kreibich, 2002). A rövid ismétlődő szakaszok közé tartozó mikro- és miniszatellitek közötti régió polimorfizmusának vizsgálatán alapszik az iSSR- (inter Simple Sequence Repeat) módszer (Zietkiewicz et al., 1994). A szatellitregiók taxonspecifikus gyakoriságát figyelte meg Tóth et al. (2000). Intelmann és Spring (2002) a napraforgó-peronoszpóra németországi populációjának iSSR-vizsgálatával nem kapott patotípus elkülönítésére alkalmas markert, néhány szántóföldi izolátum egyedi azonosítására alkalmas mintázat azonban felvetette a módszer alkalmasságát a kórokozó terjedésének monitorozására.

Cooke és Lees (2004) szerint az allélgyakoriság és -elterjedés monitorozására térben és időben egyidejűleg ad lehetőséget az SSR- (Simple Sequence Repeat) markerek alkalmazása, azonban ilyen marker a napraforgó-peronoszpóra esetében jelenleg még nem áll rendelkezésünkre.

Az ismétlődő genetikai elemek közül filogenetikai vizsgálatokra és faj alatti egységek elkülönítésére alkalmazott módszer a riboszómális (r)DNS úgynevezett ITS (Internal Transcribed Spacer) és IGS (InterGenic Spacer) ismétlődő szakaszainak vizsgálata (White et al., 1990). Tizenöt *P. halstedii* izolátum részleges ITS-szakaszának vizsgálatával sikerült elkülöníteni – alacsony szintű variabilitás mellett – a 100, 330, 310 számú patotípusokat a külön csoportot alkotó 700-as, 701-es, 703-as, 710-es és 730-as patotípusoktól, mely utóbbiakat a vizsgált ITS-régióban teljesen azonos nukleotidszekvencia jellemezett; ez egyben utalhat e patotípusok új keletű kialakulására (Spring et al., 2006a).

Az petespórás szervezetek genommérete rendszerint meghaladja a valódi gombákhoz tartozó fajokra jellemző méretet, így a nagy genomméretű *Phytophthora*-fajok esetében akár a genom 50%-át is repetitív szakaszok alkothatják (Mao és Tyler, 1991; Judelson és Randall, 1998). Bennetzen (2000) szerint a transzpozícióra képes ismétlődő elemeknek van a legnagyobb szerepe a spontán variációk és mutációk kialakulásában az eukarióta élőlények körében, mert ezek illegitim homológ szakaszokat alakítanak ki a rekombinációhoz, ami akár kromoszóma-átrendeződéshez is vezethet. A transzpozícióra képes elemek leggyakrabban a retrotranszpozonok közé tartoznak, felépítésükben és működésükben hasonlatosak a retrovírusokhoz, azaz a transzpozonról képződő RNS-intermedierről a reverz transzkriptáz DNS-másolatot készít (Boeke és Corces, 1989).

A retrotranszpozonokra általában jellemző a nagy kópiaszám, ezek fajon belül és a fajok között egyaránt jelentős szekvenciaheterogenitást és inszerciós polimorfizmust mutatnak (Waugh et

al., 1997). Gyakran megfigyeltek retrotranszpozonokat ismert, működő gének közelében, aminek szerepe lehet a gén szerkezetének alakításában, valamint hatással lehet a génkifejeződésre is (White et al., 1994). A retrotranszpozonokat egy ún. LTR- (Long Terminal Repeat) régió megléte vagy hiánya alapján két csoportba sorolják (Boeke és Corces, 1989). Az LTR-régiót tartalmazó retrotranszpozonok között a reverz transzkripcióban résztvevő gének sorrendje alapján megkülönböztetnek *Ty1-copia* és *Ty3-gypsy* típusokat (Flavell et al., 1992; Suoniemi et al., 1998).

A *Ty1-copia* típusú retrotranszpozon egy, az élesztőben jellemzett retrotranszpozonról kapta a nevét (Flavell et al., 1992). Felépítése jellegzetes motívumokat tartalmaz, a két végét fajspecifikus LTR-régió határolja, ez a *gag* és a *pol* géneket fogja közre. A *gag* gén a vírus összeépüléséhez szükséges fehérjéket kódolja, míg a *pol* az áthelyeződéshez szükséges proteáz, integráz, reverz transzkriptáz, RNázH géneket kódolja (Waugh et al., 1997; Kumar és Bennetzen, 1999).

A *Phytophthora* nemzetség fajainak vizsgálata során Judelson (2002) 10 és 10 000 közötti számban azonosított *Ty3-gypsy* -típusú retroelemeket, ami hozzásegíthet a fajok közötti rokonsági fok és a faj alatti variabilitás kérdéseinek megválaszolásához is. Ezt a változékonyságot igyekeznek kihasználni a retrotranszpozon alapú molekuláris markerek alkalmazásával, amelyhez azonban elengedhetetlen a fajspecifikus terminális LTR-régiók ismerete (Waugh et al., 1997).

Az ismétlődő genetikai elemekhez (mikroszatellitek, retrotranszpozonok) kapcsolódó speciális indítószekvenciák felhasználásával számos módszert dolgoztak ki a változékonyság kimutatására. Többek között ide tartozik a random markereket adó, a genetikai variabilitás, géntérképezés, génizolálás és génműködés elemzésére is alkalmas, marker alapú szelekcióhoz használt REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) (Kalendar et al., 1999), melyet a *Magnaporthe grisea* populáció genetikai vizsgálatára használt Chadha és Gopalakrishna (2005), továbbá az IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) (Kalendar és Schulman, 2006), és az S-SAP (Sequences Specific Amplified Polymorphism) (Waugh et al., 1997) módszerek. A napraforgó-peronoszpóra esetében retrotranszpozon alapú molekuláris markerek alkalmazása még nem ismert a faj alatti variabilitás vizsgálatára.

2.11.6. Izoenzim alapú vizsgálatok

Az izoenzimintázat vizsgálata mikológiai és növénykórtani vizsgálatokban egyaránt alkalmas módszernek bizonyult taxonómiai problémák megoldására, ismeretlen eredetű izolátumok azonosítására, kórokozó populációk genetikai variabilitásának meghatározására, izolátumok földrajzi eredetének meghatározására, valamint diagnosztikai célokra egyaránt (Brasier, 1987; Andrews et al., 1988; Bonde et al., 1991; Oudemans és Coffey, 1991; Chen et al., 1992; Micales et al., 1992; Forbes et al., 1998; Ládai et al., 2000; Man in't Veld et al., 2002).

Az izoenzimanalízis módszere elég érzékenynek bizonyult genotípusok azonosítására és a populáción belüli változékonyság kimutatására (Mosa et al., 1993). A cellulóz-acetát-gélelektroforézis (CAE) módszer lehetővé tette mindössze 10–25 mg-nyi minta elemzését (Hebert és Beaton, 1993). A CAE-módszer alkalmazásával például lehetővé vált a burgonyavészt okozó *Phytophthora infestans* populáció változékonyságának meghatározására (Goodwin et al., 1995; Bakonyi et al., 2002). Továbbá e módszer a *P. infestans* genetikai vizsgálatára is alkalmasnak bizonyult (Cooke és Lees, 2004). A napraforgó-peronoszpóra esetében izoenzimvizsgálati módszer alkalmazása még nem ismert.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgált *Plasmopara*-izolátumok

A magyarországi szántóföldi izolátumok a Szent István Egyetem Növényvédelemtani Tanszék gyűjteményéből származtak, napraforgóról és szerbtövisről, a külföldi izolátumok pedig a Hohenheim Egyetem Botanikai Intézetének gyűjteményéből származtak napraforgóról és *Helianthus × laetiflorus*-ról (8. táblázat).

3.1.1. Az izolátumok eredete, szaporítása és tárolása

Az izolátumokat az általánosan fogékony, rezisztenciagént nem tartalmazó GK-70 szabad elvirágzású napraforgófajtán szaporítottam az úgynevezett teljes csíranövény úsztatásos, azaz whole seedling inoculation (WSI) módszerrel (Cohen és Sackston, 1973). A szerbtövisről gyűjtött izolátum felszaporítására a differenciáló fajtasor HA-335 vonalát használtam.

Fertőzés előtt a kaszatokat 5 percig 15%-os kereskedelmi hipóoldatban fertőtlenítettem, majd folyó csapvízben lemostam, és nedves szűrőpapír között, szobahőmérsékleten csíráztattam. A két-három napos csíranövényeket fertőzés előtt csapvízzel ismét lemostam, és bidesztillált vízzel 50 ezer sporangium/ml-es sűrűségűre beállított szuszpenzióban úsztattam petricsészében, sötétben, 16 °C-on, a rajzospórák megjelenéséig, illetve az ezt követő tisztálódás és csíratömlő kialakulásáig. A folyamatot mikroszkópos megfigyeléssel követtem nyomon. A fertőzés az inokulum korának függvényében 6–12 óra alatt játszódott le. A fertőzött csírákat virágföldbe ültettem 7 cm mély növénynevelő tálcákat használva és üvegházban neveltem. A sporulációt 8–10 nap elteltével, a kifejlett szikleveles állapotú növényeken idéztem elő, amelyeket egy éjszakán át páratelt térben tartottam. A sporangiumtömeeggel borított szikleveleket levágtam, szikkasztottam és -70 °C-on tároltam. Molekuláris vizsgálatokhoz a sporangiumokat a levegőn szikkasztott, száraz sziklevelekről házi készítésű, csapra szerelhető, víz/lég-vákumszipkával gyűjtöttem 1,5 ml-es Eppendorf-csövekbe, és felhasználásig -20 °C-on tároltam.

8. táblázat. A vizsgáltba vont *Plasmopara*-izolátumokra jellemző adatok

Laborkód	Izolátum-típus ^a	Gazda-növény ^b	Izolálás helye	Izolálás éve ^c	Gyűjtemény ^d	Virulencia-fenotípus ^e	Metalaxil-érzékenység ^f
911	FI	HA	Szerbia, Bácska	1995	1	100	nt
Bi02	FI	HA	Bicsérd	2000	1	100	+
98	FI	HA	Mezőtúr	1991	1	700	nt
130	FI	HA	Sajóhídvég	1993	1	700	+
29-13	FI	HA	Bácsalmás	1998	1	700	nt
145	FI	HA	Tenk	1994	1	710	+
129	FI	HA	Sajóhídvég	1993	1	730	nt
101	FI	HA	Kisunyom	1991	1	730	nt
114	FI	HA	Kiszombor	1992	1	330	nt
61	FI	HA	Kunszentmárton	1989	1	330	nt
01/A2	FI	HA	Gödöllő	2001	1	710	nt
X02	FI	XS	Bicsérd	2002	1	710	nt
X03	FI	XS	Bicsérd	2003	1	(717) CLI	+
X/21	SSL	XS	Bicsérd	2003	1	(717) CLI	+
X04	FI	XS	Bicsérd	2004	1	710	+
IN/A7	SSL	HA	Franciaország	-	2	nt	+
IN/B5	SSL	HA	Franciaország	-	2	nt	+
IN/ E22	SSL	HA	Franciaország	-	2	703	+
16/A14	SSL	HA	Franciaország	-	2	710	-
18	FI	HA	Franciaország	-	2	710	-
23/A23	SSL	HA	Franciaország	-	2	730	-
24	FI	HA	Franciaország	-	2	710	+
27	FI	HA	Franciaország	-	2	730	+
BL/A16	SSL	HA	Franciaország	-	2	730	-
LE/A1	SSL	HA	Németország	-	2	310	+
SCH/A6	SSL	HA	Németország	-	2	300	+
SCH/A22	SSL	HA	Németország	-	2	300	+
SCH/B10	SSL	HA	Németország	-	2	300	+
SCH/B18	SSL	HA	Németország	-	2	300	+
SCH/C4	SSL	HA	Németország	-	2	300	+
GG/A20	SSL	HA	Németország	-	2	310	+
GG/B8	SSL	HA	Németország	-	2	300	+
UN/B4	SSL	HA	Németország	-	2	nt	+
UN/B9	SSL	HA	Németország	-	2	730	+
KE/B11	SSL	HA	Németország	-	2	nt	+
KE/B13	SSL	HA	Németország	-	2	nt	+
HOLZ	FI	HA	Németország	-	2	730	+
GE/B12	SSL	HA	Németország	-	2	710	+
LAE	FI	HxL	Németország	-	2	nd	+
FAR/A23	SSL	HA	USA	-	2	710	+
FAR/A25	SSL	HA	USA	-	2	730	+

^a FI: szántóföldi izolátum, SSL: egysporangium-tenyészet

^b HA: termesztett napraforgó, XS: szerbtövis, HxL: *Helianthus × laetiflorus*

^c 1: Szent István Egyetem Növényvédelemtani Tanszék gyűjteménye, 2: Hohenheim Egyetem Botanikai Intézetének gyűjteménye

^d -: nem ismert

^e: nt: nem tesztelt, nd: nem egyértelmű reakció

^f: nt: nem tesztelt, +: érzékeny, -: nem érzékeny

3.1.2. Genetikailag tiszta tenyészetek előállítása

Genetikailag tiszta tenyészeteket egysporangium-izolálással hoztam létre Spring et al. (1998) módosított módszere alapján. Frissen sporuláltatott izolátumokból 50 sporangium/ml sűrűségű szuszpenziót készítettem bidesztillált vízben. Tárgylemezre helyezett 20 µl-es cseppeket egyenként ellenőriztem, hogy valóban csak egyetlen sporangiumot tartalmazzon, majd a kiválasztott cseppeket 5×5 mm-s napraforgó-sziklevéldarabokra helyeztem. Az egyes sziklevéldarabokat egy speciális 25 mikrokamrára osztott petricsészében 1,5 ml desztillált vízben úsztattam és növénynevelő kamrában, 16 °C-on, 14 óra megvilágítás mellett inkubáltam. Fénymikroszkóp alatt már 5–10 nap elteltével a sziklevél felületén, illetve a sziklevélszegmens oldalán megfigyelhetővé vált a sporuláció. Az így kapott egysporangium-izolátumok felszaporítására öt darab, 0,5–1 cm hosszúságú gyököcskével bíró GK-70 csíranövényt helyeztem a sporuláló szikleveleket tartalmazó mikrokamrába (3. ábra). A csírákat 16 órán át, 16 °C-on, sötétben inkubáltam a sporuláló sziklevél mellett. Az így fertőzött csírákat cserépbe ültetve további 10 napig neveltem üvegházban. A fertőzött növények az ezt követő sporuláltatáskor általában megfelelő mennyiségű inokulummal szolgáltak a további vizsgálatokhoz.



3. ábra. *P. halstedii* egysporangium-tenészeinek felszaporítása WSI-módszerrel. Rekeszenként öt teljes csíranövényt inkubáltam a sporuláló napraforgó-sziklevéldarabokkal együtt a 25 rekeszes petricsészében.

3.2. Fenotípusos változékonyság vizsgálati módszerei

3.2.1. Patotípus-meghatározás differenciáló teszttel

A patotípus meghatározásához a nemzetközileg elfogadott differenciáló fajtasor elemeit (9. táblázat) WSI-módszerrel fertőztem (Gulya et al. 1991, Tourvieille et al., 2000a). A gazdanövény/kórokozó-kapcsolatot két fenofázisban értékeltem. Először szikleveles korban, majd két héttel később, a valódi lomblevelek kifejlődése után. Első alkalommal a szikleveleken megjelenő sporulációt (4. ábra), a második értékelésnél a valódi leveleken megfigyelhető klorotikus tüneteket értékeltem. Klorózis és sporuláció esetén a kapcsolat fogékony (S), míg tünetmentes növény esetében rezisztens (R).

9. táblázat. A *P. halstedii* virulencia-fenotípus meghatározására használt, nemzetközileg elfogadott differenciáló fajtasor elemei és azok eredete (Gulya et al., 1998).

Vonal kódja	Vonal neve	Nemesítő, intézet
D-1	HA-304*	J. Miller, USDA, Fargo
D-2	RHA-265	J. Miller, USDA, Fargo
D-3	RHA-274	J. Miller, USDA, Fargo
D-4	PMI3*	F. Vear, INRA, Clermont-Ferrand
D-5	PM-17	J. Miller, USDA, Fargo
D-6	803-1	D. Skoric, IFVC, Novi Sad
D-7	HAR-4	J. Miller, USDA, Fargo
D-8	QHP1*	F. Vear, INRA, Clermont-Ferrand
D-9	HA-335	J. Miller, USDA, Fargo

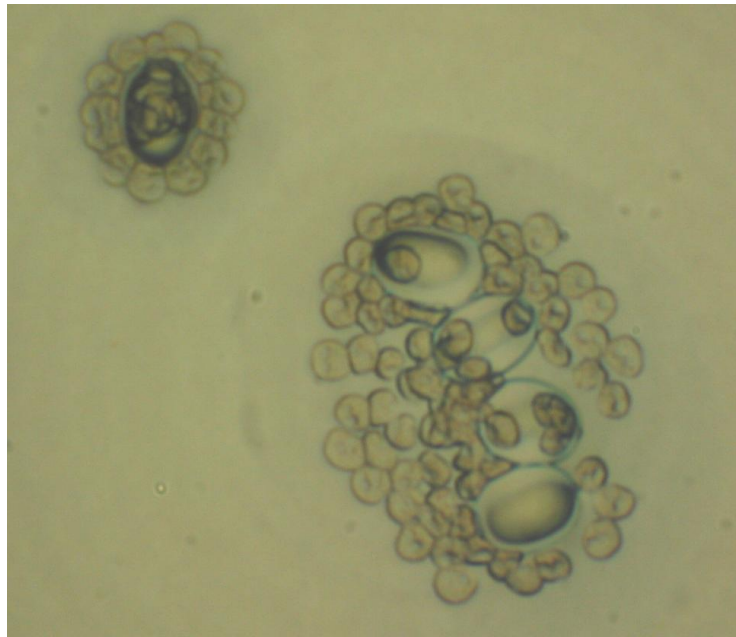
*: A HA-304 helyettesíthető a HA-89, HA821, HA-300 vagy más, Pl gént nem tartalmazó vonallal. Hasonlóképpen a PMI3 helyettesíthető a DM-2, a QHP1 pedig a HAR-5 vonallal.



4. ábra. A: peronoszpóra differenciálótesztje üvegházban, B: fehér sporangiumgyep a sziklevelelen

3.2.2. Morfológiai jellemzés

Frissen sporuláltatott izolátumok sporangiumait 1%-os vizesagar felületére szórtam (Spring et al., 1998). A vizesagar készítéséhez egy gramm agart (Difco) 100 ml desztillált vízben oldottam fel, a baktériumok szaporodásának gátlására 10 µg/ml rifampicint (Sigma) kevertem az agaroldatba. A petricsészékben a sporangiumok egyenletes szétterülését inverz mikroszkóp (Nikon) alatt ellenőriztem. A petricsészéket 16 °C-on, sötétben inkubáltam a rajzospórák megjelenéséig. Mintánként száz sporangium hosszúság/szélesség-méreteit határoztam meg 400× nagyítás alatt. A sporangiumból kiürülő rajzospórák folyó víz hiányában a sporangium körül tömörültek, így mikroszkóp alatt könnyen számlálhatóak voltak (5. ábra). Az eredményeket a témakörben megjelent adatokkal vettem össze (Sackston, 1981a).



5. ábra: *Plasmopara halstedii* sporangiumok vizesagar felületen. Két órán keresztül, sötétben, 16 °C-on tartott sporangiumokból kifejlődő rajzospórák a kiüresedő sporangiumok körül csoportosulnak.

3.2.3. Patogenitásvizsgálat

Szerbtövisről származó izolátumok visszafertőzési kísérletéhez a kórokozó izolálásának helyén gyűjtött *X. strumarium* terméseket használtam. A termés dormanciáját egy héten keresztül 4 °C-os hűtőben történt hidegkezeléssel oldottam fel. Ezt a kezelést többször is meg kellett ismételni, a tárolás időtartamától függően, az egyenletes csírázás biztosításához. A fertőzést WSI-módszerrel végeztem (Cohen és Sackston, 1973) és a növényeket klímakamrában neveltem 16 °C-on, 80%-os relatív páratartalom és 14 óra megvilágítás mellett. A kéthetes szerbtövisnövények csúcsi fertőzését 5000 sporangium/ml sűrűségű szuszpenzióval végeztem, és 24 órán keresztül 100%-os páratartalmat biztosítottam a fertőzés elősegítésére úgy, hogy a növényeket bezacskóztam. Újabb két hét elteltével a sporuláltatáshoz egy napra 16 °C-os 100%-os relatív páratartalmú környezetbe helyeztem a növényeket; spriccflakonból 20 alkalommal desztillált vizet permeteztem az ismételten zacskóba helyezett növényekre, majd a pára megőrzését a zacskó lezárásával biztosítottam.

3.2.4. Fungicidérzékenység vizsgálata

A metalaxil-érzékenységi vizsgálatot sziklevel-fertőzéses és teljesnövény-fertőzéses módszerekkel vizsgáltam. A sziklevel-fertőzéses módszert Rozynek és Spring (2001) alapján végeztem a napraforgóról származó izolátumok esetében. Kifejlett, 8–10 napos napraforgó-sziklevelekből 5 mm-es sziklevelkorongot vágtam, folyóvízben lemostam és felhasználásig vízben úsztattam, az egysporangium-tenyészet előállításához alkalmazott módszerhez hasonlóan. A sziklevelkorongot 800 µl DS- (dilute salt) oldatba helyeztem (Spring et al., 1998), ami a következő vegyületeket tartalmazta: 0,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM K_2HPO_4 , 0,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 0,5 mM CaCl_2 és 0,5 mM MgCl_2 . A sziklevelek mellé mintánként 100 µl desztillált vízben szuszpendált, frissen sporuláltatott növényről gyűjtött 5000 db sporangiumot és 100 µl 1 ppm-es metalaxiloldatot (Ciba-Geigy, Svájc) adtam. A kontrollminta nem tartalmazott metalaxilt. A vizsgálatot kezeléenként 5 ismétlésben végeztem. A mintákat 25 osztatú mikrotálcákban 16 °C-os növénynevelő kamrában, 14 órás megvilágítás mellett neveltem a sporuláció megjelenéséig.

A szerbtövisről származó izolátum metalaxilérzékenységét teljesnövény-fertőzéses módszerrel vizsgáltam. Tizenöt HA-335 kaszatot két napig 1 ppm metalaxillal (Ciba-Geigy, Svájc) átitatott szűrőpapír között csíráztattam, 20 °C-on. A csíranövényeket 5000 sporangium/csíra mennyiségű inokulummal fertőztem az ültetést követően, és egyszer 50 ml 1 ppm-es metalaxilos oldattal beöntöztem a kb. fél liter térfogatú cserepeket. A kontrollnövényeket metalaxilos kezelés nélkül, hasonló módon fertőztem. A növényeket 16 °C-os növénynevelő kamrában, 14 órás megvilágítás mellett neveltem. Két hét elteltével, a sporuláció indukálását követően a sporuláció megjelenése alapján értékeltem a kísérletet.

3.2.5. Zsírsavmintázatok elemzése

Az izolátumokban lévő zsírsav kivonását és az azt követő gázkromatográfiás vizsgálatot Spring és Haas (2002) módszere alapján a hohenheimi egyetemen végezték el, frissen gyűjtött sporangiumból. A vizsgálathoz az X03-as izolátumot RHA-274 és HA-335 növényeken szaporítottam, majd a frissen sporuláltatott sziklevelekről 2 mg sporangiumot és sporangiumtartót gyűjtöttem. A zsírsavösszetétel-vizsgálat eredményét a Spring és Haas (2002) által publikált, különböző földrajzi eredetű, napraforgón szaporított *P. halstedii* minták átlagához viszonyítottam.

3.3. Nukleinsav szintű változékonyság vizsgálati módszerei

3.3.1. Nukleinsav-kivonás

DNS-kivonáshoz mintánként 25-30 mg sporangiumot használtam fel. A sporangiumok roncsolását IKA ultra turrax készülék segítségével végeztem 2 ml-es Eppendorf-csővekben. A mintákat jégen 500 µl feltáró puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA; 0,15 M NaCl, 3% w/v Sarcosyl) hozzáadását követően maximális fordulatszámon 2 percen keresztül roncsoltam. A feltárás hatékonyságát mikroszkóp segítségével követtem nyomon. A szuszpenziót kétszer, azonos térfogatú fenol-kloroform-izoamilalkohollal (25:24:1) tisztítottam, majd a felső vizes fázist dupla térfogatú abszolút etanolban csaptam ki -20 °C-on, egy órán keresztül. Ezt követően a DNS-t 4 °C-on, 12 000 g-vel, 15 perces centrifugálással üleptettem. A DNS-tartalmú üledékről leöntöttem a folyadékot, és kétszer 70%-os etanollal mostam 4 °C-on, 12 000 g-vel, 15 perces centrifugálással. A folyadékot mindkét alkalommal óvatosan leöntöttem az üledékről, majd a maradék alkohol elpárolgásáig a mintát szobahőmérsékleten szárítottam. A mintákat ezt követően 20 µg/ml RN-áz (Fermentas) tartalmú MQ vízben oldottam fel. Munkámhoz a későbbiekben a Fermentas teljes nukleinsavkivonó kitjét használtam (Genomic DNA Purification Kit: K0512, Fermentas) a gyártó által megadott leírás szerint. Az így kinyert nukleinsavat szintén 20 µg/ml RN-áz tartalmú MQ vízben oldottam fel. A DNS-t spektrofotometriás méréssel 50 ng/µl-re hígítottam a PCR-vizsgálatokhoz.

3.3.2. RAPD-vizsgálat

A RAPD- (Randomly Amplified Polymorphic DNA) vizsgálatához összesen tíz (130/B15, 98/A22, 29-13/G23, 145/C9, 101/C1, 129, 911/C11, Bi02/B6, 61/D7 és 114), a hazai öt patotípust képviselő izolátumot választottam ki. A University of British Columbia (Kanada) 100-as és 700-as primersorozatából 66-féle, tíz nukleotid hosszúságú indítószekvenciát (primert) választottam (10. táblázat). A PCR-hez a Fermentas cég termékeit használtam. A PCR-terméket Biometra Thermocycler 3 készüléken szaporítottam fel a következő program szerint: 94 °C 5 min kezdeti denaturáció; 39 cikluson keresztül ismétlődő 94 °C, 15 s denaturáció; 37 °C, 60 s primerkötés és 72 °C, 120 s lánchosszabbítás; végül egy 72 °C, 5 min végső lánchosszabbítás. A terméket 0,5%-os TBE-oldatban készített, etidium-bromiddal festett, 1,5%-os agarózgélben futtattam referencia molekulatömeg-marker mellett. A termékeket UV-átvilágító készüléken szemrevételeztem, és

digitális kamerával dokumentáltam. Statisztikai számításhoz bináris kóddal értékeltem a termék meglétét vagy hiányát. Az izolátumokat MDS- (MultiDimensional Scaling Analysis) módszerrel értékeltem az SPSS 8.0 szoftver segítségével.

PCR-reakcióelegy:

100 ng DNS
 2,5 µl 10x puffer
 2 mM MgCl₂
 100 µM dNTP
 10 pmol primer
 1 U Taq polimeráz
 _____ MQ víz

Végtérfogat: 25 µl

10. táblázat. RAPD-vizsgálathoz használt UBC- (University of British Columbia, Kanada) indítószekvenciák (primerek) bázisösszetétele. A sorszám az adott RAPD-indítószekvencia UBC azonosító kódja.

Primer/bázisösszetétel	Primer/bázisösszetétel	Primer/bázisösszetétel
101. GCG GCT GGA G	701. CCC ACA ACC C	723. CCC TCT CCT C
102. GGT GGG GAC T	702. GGG AGA AGG G	724. CTC CCT CCT C
103. GTG ACG CCG C	703. CCA ACC ACC C	725. GGG TTG GGT G
104. GGG CAA TGA T	704. GGA AGG AGG G	726. GGT GTG GGT G
105. CTC GGG TGG G	705. GGA GGA AGG G	727. GGG TGT GGT G
106. CGT CTG CCC G	706. GGT GGT TGG G	728. GTG GGT GGT G
107. CTG TCC CTT T	707. CCC AAC ACC C	729. CCC AAC CCA C
108. GTA TTG CCC T	708. GGG TTG TGG G	730. CCA CAC CCA C
109. TGT ACG TGA C	709. CCT CCT CCC T	731. CCC ACA CCA C
110. TAG CCC GCT T	710. GGT GGT GGG T	732. CAC CCA CCA C
111. AGT AGA CGG G	711. CCC TCT CCC T	733. GGG AAG GGA G
112. GCT TGT GAA C	712. GGG TGT GGG T	734. GGA GAG GGA G
113. ATC CCA AGA G	713. CCC TCC CTC T	735. GGG AGA GGA G
114. TGA CCG AGA C	714. GGG TGG GTG T	736. GAG GGA GGA G
115. TTC CGC GGG C	715. CCA CCA CCC A	737. GGT GGG TGT G
116. TAC GAT GAC G	716. GGA GGA GGG A	738. GGT GGG TGG T
117. TTA GCG GTC T	717. CCC ACA CCC A	739. GGA GGG AGA G
118. CCC GTT TTG T	718. GGG AGA GGG A	740. GGA GGG AGG A
119. ATT GGG CGA T	719. CCC ACC CAC A	741. CCT CCC TCT C
120. GAA TTT CCC C	720. GGG AGG GAG A	742. CCT CCC TCC T
121. ATA CAG GGA G	721. CCC TTC CCT C	743. CCA CCC ACA C
122. GTA GAC GAG C	722. CCT CTC CCT C	744. CCA CCC ACC A

3.3.3. iSSR-vizsgálat

Az iSSR- (inter Simple Sequence Repeat) vizsgálatot magyarországi, német, francia és egy amerikai termőhelyről származó szántóföldi izolátumon, illetve azok egysporangium-tenyészetein végeztem el. Az izolátumok háromféle gazdanövényről származtak: napraforgóról, *Helianthus × laetiflorus*ról (évelő napraforgó) és szerbtövisről. A vizsgálatot hét mikroszatellit primerrel: (CAC)₄RC, (GTG)₅, (GATA)₄, (GT)₇YG, (GAG)₄RC, (GTC)₅, (CT)₈T (Intelmann és Spring, 2002), valamint kétféle miniszatellit primerrel: az M13 (Heath et al., 1993) és a T3B (McClelland et al., 1992) primerekkel végeztem. A primereket önállóan, nem kombinációkban alkalmaztam. A PCR-t Eppendorf Mastercycler, Gradient (Eppendorf, Németország) készülékkel végeztem. A PCR körülményei az alábbiak voltak: 2 min 94 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 35 ciklusban 30 s 92 °C-os denaturáció, 30 s 50 °C-os primerkötés, 1 min 30 s 72 °C-os lánchosszabbítás követte, melyet egy végső 10 min 72 °C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le. A T3B primer esetében, a többtől eltérően, a primerkötési hőmérséklet 56,5 °C volt. A PCR-terméket 1,5%-os agarózgélen etídium-bromidos festést követően, UV átvilágítón szemrevételeztem és dokumentáltam. A kísérletet két ismétlésben végeztem, bináris kóddal értékeltem a PCR-termék meglétét vagy hiányát. Az izolátumok genetikai távolságát Treecon programcsomag (Van de Peer és De Wachter, 1994) segítségével állapítottam meg, neighbour-joining (Saitou és Nei, 1987) módszerrel, valamint UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) analízist (Sokal és Michener, 1958) alkalmazva. A dendrogram elágazásainak megbízhatóságát 100 ismétlésben számított bootstrap (Felsenstein, 1985) érték mutatja. A dendrogram megrajzolásához a TreeViewX 0.5.0. (Page, 1996) programot használtam.

iSSR PCR-reakcióelegy:

50 ng DNS
2,5 µl 10x puffer
2 mM MgCl₂
100 µM dNTP
1 µM primer
1 U Taq polimeráz
MQ víz

Végtérfogat: 25 µl

3.3.4. A *P. halstedii* ITS-bázissorrendjének meghatározása

A napraforgóról származó BI/16 izolátum teljes ITS- (Internal Transcribed Region) szekvencia meghatározását M. Thines-szel (Hohenheim Egyetem, Németország) közösen végeztem. Az ITS-szekvencia felszaporításához Oomycetes-specifikus indítószekvenciákat használtunk Bachofer (2004) munkája alapján, az ITS1-O: 5' CGGAAGGATCATTACCAC, valamint az LR-0: 5' GCTTAAGTTCAGCGGGT primereket. A régió felszaporítását Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Németország) készüléken végeztük az alábbi program szerint: a kezdeti denaturáció 94 °C-on 2 perc; 30 cikluson keresztül 94 °C-on 42 mp denaturáció, 56 °C-on 42 mp primerkötés és 72 °C-on 1 perc 42 mp lánchosszabbítás; és egy végső 4 perc 20 mp lánchosszabbítás 72 °C-on. A PCR-terméket négyféle restriktív enzimmel (*HindIII*, *HpaII*, *AvaIII* és *EcoRI*) emésztettük a gyártó (Fermentas) utasítása szerint. Az enzimreakciót 15 µl végtérfigatban végeztük 7 µl PCR-termék, 0,2 µl enzim, az adott enzimnek megfelelő 1,5 µl puffer összemérésével, amit MQ víz hozzáadásával egészítettünk ki 15 µl teljes végtérfigatra, majd egy éjszakán át szobahőmérsékleten hagytuk a mintákat az enzimatis emésztéshez. Az *EcoRI* enzimmel hasított darabokhoz *EcoRI* adaptert ragasztottunk T4-ligáz (ABgene, Franciaország) felhasználásával a gyártó útmutatása szerint: 5 µl végtérfigatban, 5 µM *EcoRI* adapter, 1 U T4-ligáz, 1× puffer, 10 µM ATP és MQ víz összemérésével, 37 °C-on, egy éjszakán át (Vos et al., 1995). A hasított fragmentumok szelektív felszaporítását a megfelelő adapter és ITS-primer kombinációja tette lehetővé. Az ligátum szelektív felszaporítását az ITS-szekvencia szaporításához használt PCR-programmal végeztük. A szekvencia bázissorrendjét közvetlenül a szelektív primerekkel felszaporított PCR-termékből határoztuk meg. A szekvenálás kezdeti bázisolvadási pontatlansága miatt az *EcoRI*-régióban a két szakasz összekötésére, a hiányzó bázisok meghatározásához új, specifikus primert kellett tervezni, nevezetesen az ITS-FFL-t (5' ACTTG TAGCCAGACGGCGAC), mely az ismétlődő szakaszok előtt található a 712-731 bp között. A szekvenciák analízisét a DNASTar programcsomag (Lasergene, Wisconsin, USA) segítségével végeztük. A szekvenciát rokon Oomycetes szervezetek: *Phytophthora infestans* (AF228084), *Phytophthora megasperma* (AF266794) és *Peronospora rumicis* (AF465758) GenBank adatbázisban található ITS-szekvencia adataival vetettük össze.

3.3.5. ITS-szekvenciák összehasonlító vizsgálata

Szerbtövisről és napraforgóról származó izolátumok ITS-szakaszainak restrikciós mintázatát ITS-RFLP- (ITS-Restriction Fragment Length Polymorphism) módszerrel hasonlítottam össze. Az ITS-régió felszaporítását az ITS1-O és LR-0 primerpárral végeztem az alábbi program szerint: kezdeti denaturáció 94 °C-on 2 perc, ezt követte 30 cikluson keresztül 94 °C-on 42 mp denaturáció, 56 °C-on 42 mp primerkötés és 72°C-on 1 perc 42 mp lánchosszabbítás, melyet egy végső 4 perc 20 mp lánchosszabbítás zárt le. A kapott PCR-termékeket 11-féle enzimmel hasítottam: *EcoRI* *HindIII*, *BamHI*, *AvaIII*, *HinfI*, *Hin6I*, *EcoR5*, *MbiI*, *PstI*, *SmaI*, és *CfrI3I* (Fermentas) a gyártó útmutatása szerint. A restrikciós mintázatot agarózgél-elektroforézist követően hasonlítottam össze, a hasítás során kapott különböző hosszúságú termékek számát értékeltem.

3.3.6. A szerbtövisről származó X03 izolátum ITS-bázissorrendjének meghatározása

A szerbtövisről származó X03 izolátum ITS-régiójának felszaporítását a napraforgóról származó izolátum vizsgálatához használt PCR-programmal végeztem, bázissorrendjét klónozott PCR-terméken határoztam meg. A PCR-terméket TA Cloning Kit (Invitrogen, UK) vektorba ligáltam a forgalmazó útmutatása szerint: 10 µl végtérfogatban 2 µl vektor, 1x puffer, 3 µl PCR-termék, 1 µl T4 ligáz és MQ összemérésével 14 °C-on, 4 órán át, majd kompetens One Shot TOP10 *E. coli* baktériumba transzformáltam hősokk módszerrel. Ligálásonként egy-egy cső kompetens sejtet tartalmazó fiolát jégen felolvasztottam, hozzáadtam 2 µl ligátumot, a pipetta csúcsával megkevertem és fél órán át jégen tartottam. Ezt követően 30 mp-ig 42 °C-on tartottam, majd jégre tettem és 250 µl szobahőmérsékletű SOC (Invitrogen) oldatot mértem a csövekhez, és egy órán át 37 °C-on rázattam. Ampicilint (Sigma) (100 µl/ml) tartalmazó LB agart (Difco) steril körülmények között 40 µl 4%-os X-gal és 40 µl 0,1M IPTG-vel bedörzsöltem a kék-fehér szelekcióhoz és fél órán át 37 °C-on inkubáltam. Petri-csészénként 20–100 µl transzformánst szélesztettem és 37 °C-on inkubáltam egy éjszakán át. A pozitív, klónt tartalmazó telepeket specifikus primerek alkalmazásával PCR-rel ellenőriztem. A baktériumtenyészetet folyékony LB-ben szaporítottam fel és QIAprep Spin minipreppel (Qiagen) tisztítottam belőle plazmidot. A tisztított plazmidra illeszkedő indítószekvenciákkal kezdtem a bázissorrend megismerését (Biomi KFT). A megismert szakaszokra illeszkedő három belső szekvenáló primer segítségével határoztam meg a teljes szakasz bázissorrendjét: XIF1 (5' ATCGTAACATGACTTCCGGTG), XIF2 (5' ATTGGTGAACCGTAGTTATAG) és XIR1 (5' GAAGAAAATGTATGATATGTCG). A szekvenciákat kézzel illesztettem össze a DNASTar

Program csomag MegAlign programjával (Lasergene). A kapott ITS szekvenciát GenBankból származó rokon fajok *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berl. et De Toni DQ665670, *P. geranii* (Peck) Berl. et De Toni DQ131916, *P. obducens* J. Schroet. DQ665671, *P. viticola* (Berk. et Curtis) Berl. és De Toni DQ665668, *Plasmoverna pygmaea* (Unger) Constant., Voglmayr, Fatehi és Thines DQ665671 és *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (AF228084) megfelelő szakaszával vettem össze a MAFFT 5.8 (Kato et al., 2002) program FFT-NSi beállítását választva. A rokonsági fokot vizsgáló dendrogramnál 610 bázis hosszúságú szakaszt vettem figyelembe. A *Plasmopara*-fajokra jellemző konzervatív régió vizsgálatát Jukes-Cantor szubsztitúciós modell (Jukes és Cantor, 1969) alapján számított neighbour-joining módszerrel (Saitou és Nei, 1987) készítettem. A dendrogram elágazásainak megbízhatóságát 1000 ismétlésben számított bootstrap (Felsenstein, 1985) érték mutatja. A dendrogramot TreeViewX 0.5.0. (Page, 1996) programmal jelenítettem meg.

3.3.7. LSU-szekvencia részleges meghatározása

Az LSU (Large Ribosomal Subunit), azaz a nagy riboszómális alegység D1/D2/D3 variábilis domén régióját Riethmüller et al. (2002) szerint szaporítottam fel, majd meghatároztam a kapott szakasz bázisösszetételét. A vizsgálatban a szerbtövisről származó X03 izolátum szerepelt. A genomi DNS-ből Oomycetes-specifikus primerekkel LR0R (5' GTACCCGCTGAACGGAAGC) és LR6-O (5' CGCCAGACGAGCTTACC) szaporítottam fel a terméket az ITS-hez használt PCR-programot alkalmazva. A szekvenálást univerzális LSU-primerekkel: NL1 (5' GCATATCAATAAGCG GAGGAAAAG) és NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG) végeztem (O' Donnell, 1993). A kapott termék szekvenciáját GenBankban található *P. angustiterminalis* (AY178535) LSU-szekvenciához hasonlítottam SeqMan programmal (DNASStar, Lasergene).

3.3.8. LTR-retrotranszpozon izolálása

A retrotranszpozon LTR-régiójára illeszkedő próba létrehozásához az LTR-retrotranszpozont a Bi02/B6-os mintából izoláltam. Kiindulásként a reverz transzkriptáz gén konzervatív régiójára tervezett általános indítószekvenciákkal végeztem PCR-t az RT1 5' és RT2 5' primerekkel, Flavell et al. (1992) alapján, ahol az alkalmazott primerek 5' irányban 10 bp hosszan ún. farokszekvenciát kaptak (melyet a 11. táblázatban aláhúzással jelöltem) a primersúly növelésére és primerdimer kialakulásának megelőzésére. A többi, az izolálási folyamat során felhasznált, általam tervezett

primer szekvenciáját szintén a 11. táblázat tartalmazza. A felszaporítást a következő PCR-program szerint végeztem: 94 °C 3 perc kezdeti denaturáció; 30 cikluson keresztül 94 °C, 1 perc; 45 °C, 1 perc; 72 °C, 1 perc és végül 72 °C, 7 perc. A PCR-elegy összetétele: 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1×PCR puffer, 0,5 μM mindkét primerből, 1 U Taq polimeráz (Roche). A terméket agarózgélben futtattam és a várt tartományba eső terméket kivágtam a gélből. A gélből kivágott PCR-terméket QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) alkalmazásával izoláltam a gyártó útmutatása szerint. A tisztított terméket TE kloning kit (Invitrogen) felhasználásával klónoztam szintén a gyártó útmutatása szerint. A pozitív telepeket kolónia-PCR-rel ellenőrizem univerzális M13F 5' GTAAAACGACGGCCAG és M13R 5' CAGGAAACAGCTATGAC plazmidprimerek felhasználásával. A pozitív kolóniákat felszaporítottam és QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) alkalmazásával a gyártó útmutatása szerint tisztítottam belőlük plazmidot a szekvenáláshoz. A szekvencia meghatározását ABI BigDye terminátor módszerrel ABI PRISM 3100 Genetic Analyser gépen végeztem a gyártó útmutatása szerint. A szekvenciákat a DNASTar programcsomag segítségével elemeztem. A kapott szekvenciák feltételezett funkcióját a GenBank fehérje alapú Blast kereső program segítségével határoztam meg. A kapott szekvenciák közül a reverz transzkriptáz génnel rokonságot mutató szakaszra 3' és 5' irányokba, kifelé, az LTR-régió irányába mutatóan nested primereket terveztem, a feltételezett retrotranszpozon hiányzó részeinek és az LTR-régió megismerése végett.

Teljes genomi DNS emésztését *EcoRI*, illetve *MseI* (New England Biolabs) enzimmel végeztem 40 μl végtérfogóban a következők szerint: 500 ng DNS, 5U enzim, 1× restrikció-ligáció (RL) puffer (10 mM Tris-acetát pH 7,5, 10 mM Mg-acetát, 50 mM K-acetát, 5 mM DTT, 5ng/μl BSA) összemérésével 37 °C-on 1 órán keresztül (Vos et al., 1995).

5 μM-os *EcoRI* adaptert készítettem EAD-A 5' CTCGTAGACTGCGTACC és EAD-B 5' TGGTACGCAGTCTAC primerszekvenciákból. Mindkét 100 μM-os primerből 5 μl-t mértem 100 μl végtérfogóba, az elegyet 30 másodpercen keresztül 80 °C-os PCR-készülékbe tettem, majd hagytam lassan (kb. 1 órán keresztül) kihűlni, hogy a két szekvencia összekapcsolódhasson primerdimert kialakítva. Hasonló módszerrel állítottam elő az *MseI* adaptert, ahol az adapterprimerek szekvenciái a következők voltak: MAD-A 5' GACGATGAGTCCTGAG és MAD-B 5' TACTCAGGACTCAT. Az emésztett genomi DNS-t megfelelő *EcoRI*, illetve *MseI* adapterrel ligáltam, azaz összeragasztottam, 10 μl ligációs oldat, 1 μl 10× RL puffer, 1U T4 ligáz (New England Biolabs) és 5 pmol *EcoRI* vagy *MseI* adapter, 0,5 mM ATP összemérésével egy éjszakán át, 37 °C-on.

A reverz transzkriptáz régióból 5' és 3' irányba tervezett nested primerekkel kromosomasétálás-módszerrel haladtam az LTR-régió felé. A retrotranszpozonokkal homológiát jelző szekvenciákhoz további primereket terveztem az újabb szakaszok megismeréséhez. Az

általam tervezett primereket a Sigma Genosys szintetizálta. A PCR-hez felváltva alkalmaztam az EcoRI, illetve az MseI adapterrel ligált genomi DNS-t templátként (11. táblázat). A retrotranszpozonszerű szekvenciákat a DNASTar programcsomag (Lasergene) SeqMan programjával illesztettem össze, a szakaszokat kézzel szerkesztettem.

Az első *P. halstedii*-specifikus, reverz transzkriptáz génre illeszkedő, az ismert szakaszból kifelé mutató primert, az RT31-t EcoRI adapterrel ligált DNS-en, EAD-A primerrel kombinációban, hot start PCR-rel használtam, azaz 1 U Taq-polimerázt az első denaturációs lépést követően, 92 °C-on mértem a reakcióhoz. A reakció összetétele az alábbi volt: 5µl DNS-adapter-ligátum, 1× puffer, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM mindkét primerből, 1,5mM MgCl₂, 1U Taq-polimeráz. A felszaporítást a következő PCR-program szerint végeztem: 92 °C, 4 perc kezdeti denaturáció; 35 ciklus 92 °C, 30 mp; 50 °C, 30 mp; 72 °C, 2 perc 30 mp és végül 72 °C, 5 perc. Az RT31-primerrel kapott PCR-terméket agarózgélben szemléltem, és 1:10 arányban hígítva használtam templátként az RT32 primerrel végzett nested PCR-hez azonos reakciókörülmények között.

A PCR-terméket kivágtam a gélből, klónoztam, a pozitív telepeket kolónia-PCR-rel ellenőriztem, felszaporítottam és plazmidtisztítást követően szekvenáltam a fent ismertetett módon. A kapott szekvenciához az NCBI GenBank adatbázisban fehérje alapú Blastx programmal kerestem hasonló szekvenciákat.

Az általam kapott, retrotranszpozonhoz hasonló szekvenciákra ismét kifelé mutató nested primerpárt terveztem 3' irányban, majd az MseI-adapterrel ligált genomi DNS-en végeztem el a PCR-t a fent ismertetett módon, az RT33 és RT34 primerekkel. A *Ty-copia* szekvenciával homológiát mutató szekvenciák alapján új nested primerpárt terveztem 3' irányba, az RT35 és az RT36-t, amivel eljutottam az LTR-régióig.

A fent ismertetett módszert alkalmazva haladtam a retrotranszpozon 5' régió irányába is, ahol az első PCR-hez használt RT51, illetve az újratervezett RT51új primert EAD-A primerrel kombinációban hot start PCR-rel alkalmaztam az EcoRI adapterrel ligált DNS-en, majd a kapott PCR-terméken nested PCR-t végeztem az RT52-primerrel. A *Ty-copia* szekvenciával homológiát mutató szekvenciára újból 5' irányban kifelé mutató nested primerpárt terveztem. Az RT53 és a RT54 primereket MseI-enzimmel emésztett genomi DNS-en használtam a megfelelő adapterprimerrel kombinálva. Ezt követően az RT55, és az RT56 primerekkel már EcoRI-enzimmel emésztett templáttal kapott szekvencia alapján terveztem az 5' irányba kifelé mutató RT57 és RT58 nested primerpárt. Az addigra megismert 3' LTR-szekvencia alapján tervezett LTR-specifikus forward primerrel, az LTR 5rc-vel genomi DNS-en végzett PCR-rel kaptam meg az 5'LTR-régió hiányzó szakaszát.

11. táblázat. *P. halstedii* Bi02/B6 izolátumának LTR típusú retrotranszpozon izolálásához használt primerek listája és szekvenciája, valamint a PCR-hez használt templát DNS-típusa.

Primer neve	Indítószekvencia	Templát-DNS ^a
RT1	AAACTCGAGNACNGCNTTYTNCAYGG	Genomi
RT2	AAACTCGAGNARCATRTRTCNACRTA	Genomi
RT51	GGTCTGCTTGAGCCC	EcoRI-AD
RT51új	GGTCTGCTTGAGCCCC	EcoRI-AD
RT52	CAGTCGTAATTGCGGTC	EcoRI-AD
RT53	TTCGACAACCTTCATATCC	MseI-AD
RT54	AGCCTTAGGATCCCATTTC	MseI-AD
RT55	CATATGGGACTGTTGCTTGCTGCT	EcoRI-AD
RT56	AACTCACGAGCTCCATCATGACG	EcoRI-AD
RT57	CGAAGTCAGTACAGTCCAT	Genomi
RT58	ATCCGCTGTCGCCACCACTT	Genomi
RT31	CCCGTGTCTTTACATCAA	EcoRI-AD
RT32	GTGCTTCTACTCGTGTACGT	EcoRI-AD
RT33	AGCTATTGGTGCTCTTATGCACT	MseI-AD
RT34	CTTATGCACTTGATGACCGCGA	MseI-AD
RT35	GAAATTTGTTTCAAGCCTGGCAATG	EcoRI-AD
RT36	TATTTTCATGGGGGCTCCTGTGAGTT	EcoRI-AD
LTR 5rc	AAGATCGCCAGTATGTCCAATACGA	Genomi

^a EcoRI-AD: EcoRI adapterrel ellátott, *EcoRI* enzimmel emésztett genomi DNS,
MseI-AD: MseI adapterrel ellátott, *MseI* enzimmel emésztett genomi DNS

3.3.9. S-SAP-vizsgálat

Az S-SAP-vizsgálatot Waugh et al. (1997) alapján, 30 egysporangium-vonalon végeztem, amelyből 27 minta napraforgóról, kettő szerbtövisről és egy *H. × laetiflorus*ról származott. Az izolátumok között 14 magyar, 1 szerb, 9 francia, 15 német és 2 amerikai minta szerepelt.

Az S-SAP-technika rövid ismertetése:

1. Genomi DNS tisztítása
2. DNS emésztése (MseI és EcoRI enzimekkel) és megfelelő adapterek ligálása
3. Preszelektív amplifikáció (adapter primerekkel)
4. Szelektív amplifikáció (MAD-A+0 és 5'LTR-specifikus primer)
5. PCR-termék elválasztása poliakrilamidgélen

A genomi DNS tisztítását a korábban ismertetett módszer szerint végeztem. A 10 µl (500 ng) genomi DNS emésztését 5U MseI és 5U EcoRI enzim és 1× RL (restrikció-ligáció) puffer (10mM Tris-acetát pH 7,5, 10 mM Mg-acetát, 50 mM K-acetát, 5 mM DTT, 5 ng/µl BSA; Vos et al., 1995 alapján) hozzáadásával végeztem 20 µl végtérfogatban, 1 órán át, 37 °C-on. Az EcoRI- és MseI-adaptereket az LTR-retrotranszpozon izolálásakor ismertetett módszerrel készítettem. Az emésztett genomi DNS-hez adaptereket ligáltam 5 µl végtérfogatban: 1 µl 25 µM-os MseI-adapter, 1 µl 2,5 µM-os EcoRI-adapter, 0,5 µl 10× RL-puffer, 0,5 U T4 ligáz és 0,1 µl 100 mM ATP összemérésével. A ligálást 37 °C-on, egész éjszaka végeztem. A reakciót agarózgélen ellenőriztem. A preszelektív amplifikációt Vos et al. (1995) szerint végeztem 1 µl hígítás nélküli ligátumon, 25 µl végtérfogatban: 1× puffer, 1U Taq polimeráz (Fermentas), 1 µl RL-termék, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 30 ng MAD-A és EAD-A primerek összemérésével. A preszelektív PCR-program a következő volt: 25 ciklusban 94 °C, 30 mp; 56 °C, 30 mp; 72 °C, 1 perc. A reakcióterméket ismét agarózgélen ellenőriztem. A preszelektív PCR-terméket 1:2 arányban 0,1 TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) puffer hozzáadásával hígítottam a szelektív amplifikációhoz. A szelektív felszaporításhoz Cy5 vízoldható fluorescens festékkel jelölt LTR-specifikus LTR_5PLH (Cy5 TCGTATTGGACATACTGGCGATCTT), illetve LTR_3PLH (Cy5 CTTAGAGGTAGCAACTAGA TTGTGAA) primereket használtam MAD-A primerrel kombinációban. A szelektív amplifikációhoz a PCR-t 25 µl végtérfogatban 1× puffer, 1U Taq polimeráz (Fermentas), 5 µl hígított preszelektív termék, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 5 µM LTR_5PLH, vagy 5 µM LTR_3PLH primer és 5 µM MAD-A primer összemérésével készítettem. A szelektív amplifikációt

Vos et al. (1995) alapján végeztem, denaturáció 94 °C, 30 mp, majd 65 °C-ról induló 30 mp primerkötési hőmérséklet, mely 12 cikluson keresztül 0,7 °C-al folyamatosan csökkent, a lánchosszabbítás 72 °C-on, 1 percig tartott, ezt követően 23 cikluson keresztül az alábbi programszakasz következett: 94 °C, 30 mp; 56 °C, 30 mp; 72 °C, 60 mp. A PCR-terméket ALFexpressII (Amersham Biosciences) automata szekvenáló gépen, 8%-os denaturáló poliakrilamidgél (ReproGel) választottam szét. A PCR-termékhez azonos térfogatú futtató festéket kevertem, majd 2 percig tartó 92 °C-os denaturációt követően jégen tartottam a mintákat a futtatásig. A kapott termék megléte vagy hiánya alapján bináris kóddal értékeltem a mintázatot. Az izolátumok genetikai távolságát Treecon programcsomag (Van de Peer és De Wachter, 1994) segítségével határoztam meg, neighbour-joining (Saitou és Nei 1987) módszerrel és UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) analízist (Sokal és Michener, 1958) alkalmazva. A dendrogram elágazásainak megbízhatóságát 100 ismétlésben számított bootstrap (Felsenstein, 1985) érték mutatja. A dendrogram megrajzolásához a TreeViewX 0.5.0. (Page, 1996) programot használtam.

3.4. Izoenzimmintázatok összehasonlító vizsgálata

Harmincöt egysporangium-vonalat és 10 szántóföldi izolátumot vizsgáltam, amelyből 41 minta napraforgóról, 3 szerbtövisről és 1 *H. × laetiflorus*-ról származott. A vizsgált minták között 17 magyar, 2 szerb, 9 francia, 15 német és 2 amerikai izolátum volt.

3.4.1. Fehérjekivonás

Az enzimkivonatok előállításához 25 mg sporangiumot roncsoltam, azonos térfogatú 0,45–0,50 µm átmérőjű üveggyöngy (Braun) jelenlétében, 200 µl feltáró pufferben (100 mM TrisHCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM KCl; 6,5 mM DTT; 1,4% PVP 40 000), Láday et al. (2000) szerint. A feltárást jégen, műanyag kézi dörzsölővel 1,5 ml-es Eppendorf-csőben 2–3 percen keresztül végeztem. A mintákat egy órán át jégen tartottam és azt követően két alkalommal 10–10 percig centrifugáltam 4 °C-on, 12 000 g-vel. Az ülepített törmelékről óvatosan eltávolítottam a felülülő réteget minden egyes alkalommal ügyelve, hogy ne kerüljön szennyeződés a mintákba. Az enzimkivonatot 50 µl térfogatú mintákra szétosztva -20 °C-on tároltam felhasználásig.

3.4.2. Cellulóz-acetát-gélelektroforézis (CAE)

Az elektroforézist Hebert és Beaton (1993) leírása szerint végeztem. A vizsgált enzimek nevét, enzimkódexbeli számát és futtató pufferét a 12. táblázatban foglaltam össze. A futtatáshoz használt Trisz-glicin pH 8,5 (TG) és CAAMP pH 7,0 pufferek összetétele megfelelt Hebert és Beaton (1993) leírásának, míg a LiOH-puffer pedig 0,06 M LiOH-ot és 0,3 M bórsavat tartalmazott (pH 8,1). A puffereket többször is felhasználtam, két futtatás között hűtőben tartottam a degradációt megelőzendő. A vizsgálatot a Helena Laboratories (Beaumont, Texas) Super Z-12 applikátor egységcsomag eszközeivel végeztem. A reagenseket a Sigma-Aldrich Kft-től szereztem be, a Titan III cellulóz-acetát-géleket (Helena Laboratories) készen vásároltam. A géleket a vizsgált enzimnek megfelelő pufferben áztattam felhasználás előtt. A jégen kiolvasztott mintákat applikátorral vittem fel a gélre. Az egyes izozimek elválasztásához 180 V-ot használtam, egyedül az LAP-enzim kimutatása történt, 130 V-os feszültségnél. Enzimenként meghatároztam az elválasztáshoz szükséges futásidőt.

3.4.3. Cellulóz-acetát-gélfestés

Összesen 16 különböző enzimreakciót vizsgáltam az agartartalmú festőelegy felülrétegzés módszerével. A különböző enzimreakciók kimutatásához szükséges festőelegyet a Helena Laboratories által kiadott kézikönyv alapján készítettem (Hebert és Beaton, 1993). A reakcióelegyet 60 °C-os vízfürdőben mértem össze, az enzimeket és a festéket (PMS, MTT) csak közvetlenül a festés megkezdése előtt adtam az oldathoz. A géleket szobahőmérsékleten inkubáltam az enzimreakció megjelenéséig. A gél felületéről a reakcióelegyet tartalmazó agarréteget csapvízzel mostam le. A géleket digitális fényképen dokumentáltam. A gél száradás után évekig tárolható.

12. táblázat. A vizsgált enzimrendszerek enzimkódexbeli (EC) száma és a CAE-módszerhez választott futtató puffer.

Izoenzim	Rövidítés	EC szám	Puffer ^a
Savas foszfatáz	APH	3.1.3.2	TG
Alkohol-dehidrogenáz	ADH	1.1.1.1	TG
Alkalikus foszfatáz	ALP	3.1.3.1	CAAMP
Glükózfoszfát-izomeráz	GPI	5.3.1.9	TG
Glutamát-dehidrogenáz (NAD-függő)	GDH (NAD)	1.4.1.2	TG
Glutamát-dehidrogenáz (NADP-függő)	GDH (NADP)	1.4.1.4	TG
Glükóz-6-foszfat-dehidrogenáz	G6PDH	1.1.1.49	TG
Hexokináz	HEX	2.7.1.1	TG
Izocitromsav-dehidrogenáz	IDH	1.1.1.42	CAAMP
Tejsav-dehidrogenáz	LDH	1.1.1.27	LiOH
Leucin-aminopeptidáz	LAP	3.4.11.1	CAAMP
Almasav-dehidrogenáz	MDH	1.1.1.37	CAAMP
Maleinsav	ME	1.1.1.40	TG
Peptidáz A (Gly-Leu)	PEP A	3.4.13	TG
Peptidáz C (Lys-Leu)	PEP C	3.4.13	TG
Foszfoglükomutáz	PGM	5.4.2.2	TG

^aElektroforézis-pufferek: TG (0,025 M tris, 0,19 M glicin) pH 8,5; CAAMP (0,65 M morfolin-0,22 M citromsav), pH 7,0 (Hebert és Beaton, 1993); LiOH (0,06 M lítium-hidroxid, 0,3 M bórsav, pH 8,1).

3.4.4. Izoenzimvizsgálat értékelése

Az egyes reakciókat négy csoportba soroltam a festődés jellege alapján: (E) jól értékelhetően festődik, (Gy) halványan festődik, (NF) nem festődik, (NR) a reakció nem reprodukálható. A polimorfizmust mutató enzimek egyes alléljait a felvitel helyétől számított, %-ban kifejezett relatív futási távolságuk (RM) alapján neveztem el úgy, hogy a leggyakoribb allél kapta a 100-as értéket. Az enzimek degradációjából eredő esetleges hibák kiküszöbölésére a kísérleteket két ismétlésben végeztem. A mintákat végül az egyes enzimekkel kapott RM-értékek alapján multilokusz-fenotípus (MLP) csoportokba soroltam.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A vizsgált izolátumok fenotípusos változékonysága

4.1.1. Szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. morfológiai jellemzése

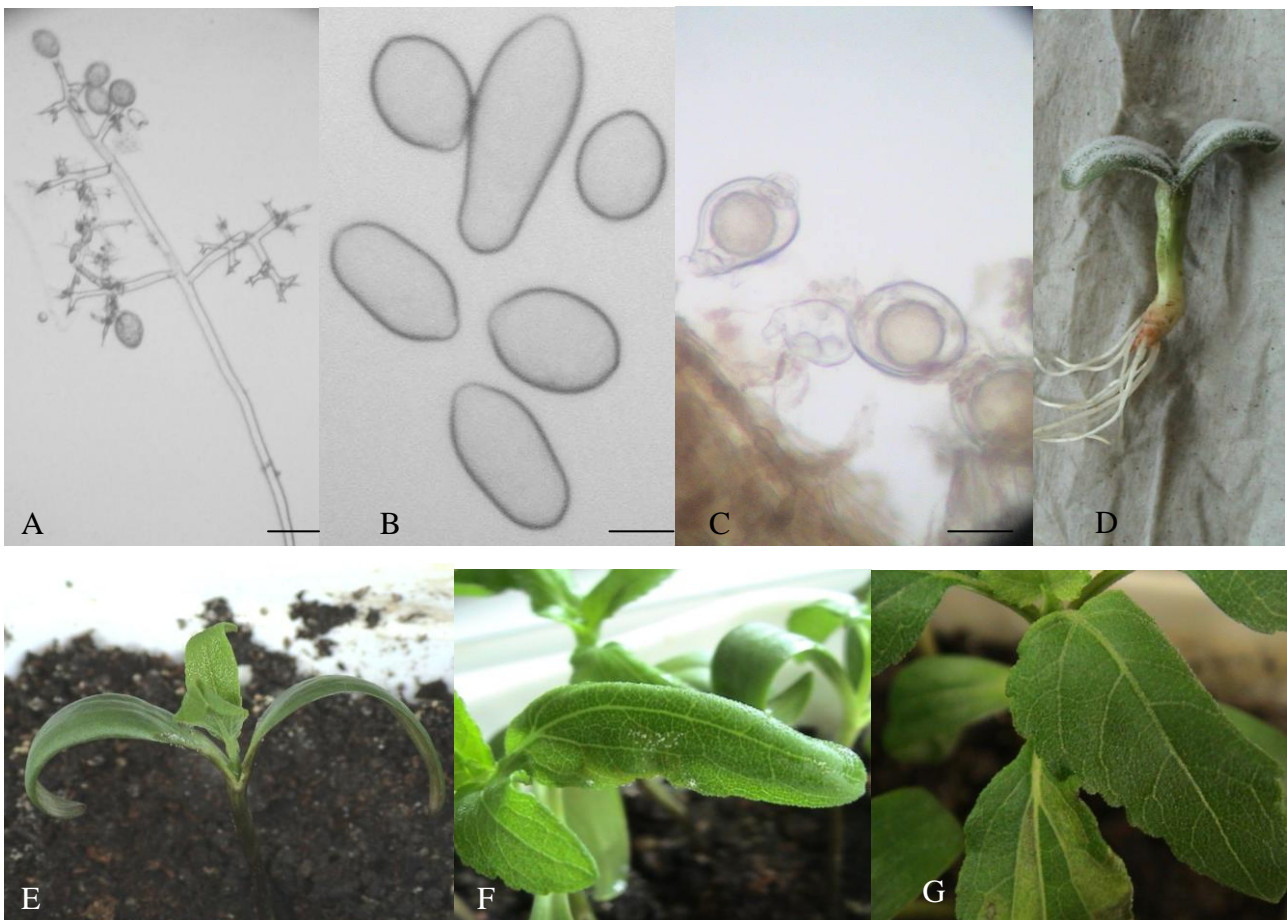
A szerbtövisről gyűjtött, a vizsgálathoz kiválasztott X03 *Plasmopara* sp. izolátum sporangiumtartói monopodiális elágazást mutattak (6/a ábra). A változatos alakú sporangiumok között egyaránt megfigyelhető volt a kerekdedtől az oválison át a földimogyoróhoz hasonlatos, középen befűződő forma is. Méretük $25\text{--}50 \times 20\text{--}30$ (átlagosan $41,1 \pm 7,8 \times 27,0 \pm 4,6$) μm között változott (6/b ábra). A zoosporogenezisig eltelt inkubációs idő 30–45 perc volt. A sporangiumonként fejlődő rajzospórák száma 4 és 13 között változott, leggyakrabban hat darab képződött, ami átlagosan $6,29 \pm 2,0$ rajzospórát jelentett. Az ezzel az izolátummal fertőzött HA-335 napraforgóvonal hipokotil-keresztmetszetében sejtnekrózis alakult ki, a kórokozó hifái és hausztóriumai a bél- és kéreg szövetekben egyaránt megfigyelhetők voltak. A tizenkét hetes fertőzött napraforgónövény gyökérszövetében a kórokozó ivaros szaporítóképletei, oospórák képződtek (6/c ábra).

4.1.2. Gazdanövényválasz a szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. fertőzésére

Szerbtövisről gyűjtött izolátum (X03) sporangiumaival mesterségesen fertőzött GK-70-es napraforgó sziklevelén két hét inkubációt követően sporulált a kórokozó. A sporuláció a szikleveleken kívül a hipokotilon és a gyökéren is megfigyelhető volt. A fertőzött növények erősen törpültek, a hipokotilon barnás elszíneződés, nekrózis alakult ki, a növények egy részén gyökér- és csíranövény-elhalás, az ún. damping-off tünetei jelentkeztek. A fertőzés azonban a sziklevéltre korlátozódó (CLI, azaz cotyledon limited infection) maradt, a kórokozó nem kolonizálta a sziklevel fölött található valódi szöveteket, és így a tipikus tünet, a lomblevél klorózisa nem alakult ki (6/d ábra). Gyenge fertőzés esetén, mint például egysporangium-tenyészet előállításakor, a növények hetekig életben maradtak.

Az X03 izolátum HA-335-ös napraforgóvonalon képződött sporangiumaival visszafertőzött *Xanthium strumarium* növényen kialakultak a peronoszpórás fertőzésre utaló tünetek, azaz

sporuláció és klorózis is megfigyelhető volt a sziklevek tövéénél (6/e ábra). A klorotikus folt azonban idővel megbarnult, nekrotizálódott. Laboratóriumi körülmények között a fertőzés szisztemizálódása nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor a levelek és a tenyészőcsúcs mesterséges fertőzése lokális tünetek kialakulását eredményezte, mely idővel szintén a fertőzött régió nekrotizálódásához vezetett (6/f ábra). Egyetlen olyan eset fordult elő, amikor a kórokozó szisztemizálódott a fertőzött levélszegmensben (6/g ábra), de a fertőzés a növény felsőbb régiójára már nem terjedt tovább.



6. ábra. A szerbtövisről származó X03 izolátum morfológiai jellemzői és patogenitási sajátosságai. A, szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. sporangiumtartója (méretezés: 35 μ m); B, a sporangiumok alakjának és méretének változatossága (méretezés: 25 μ m); C, napraforgó gyökerében képződő oospórák (méretezés: 40 μ m); D, X03-al fertőzött HA-335 vonal tünetei fiatal napraforgón: törpülés, hipokotilvastagodás és -nekrozis, fagyökérelhalás és másodlagos gyökér fejlődése, sziklevelen sporuláció; E, WSI módszerrel fertőzött *Xanthium strumarium* csíranövény sziklevelének tövében enyhe sporuláció; F, *X. strumarium* növényen másodlagos, lokális fertőzés eredményeként megfigyelhető klorózis, nekrozis és levéldeformáció; G, az X03 izolátum szisztemikus terjedése *X. strumarium* levélben, levélklorózis.

4.1.3. Szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. zsírsavmintázata

RHA-274-en és HA-335 vonalon felszaporított X03 izolátum zsírsavmintázata (13. táblázat) statisztikailag eltért a napraforgót fertőző *P. halstedii* fajra jellemző zsírsavmintázattól. Az X03 izolátum C18:0 tartalma magasabb, míg a C18:1, C20:1 és a C22:1 relatív értéke alacsonyabbnak bizonyult a *P. halstedii*re jellemző adatoknál. Mind a két növényről származó *Plasmopara*-mintára jellemző volt a magas C20:5, az eikozapentaenoin-sav aránya. A szerbtövisről és a napraforgóról származó izolátumok között azonban különbség mutatkozott a stearinsav (C18:0) és olajsav (C18:1) arányban.

13. táblázat. Az X03 izolátum gázkromatográfiás (GC) analízise. A X03 izolátum RHA-274 és HA-335 napraforgóvonalon felszaporított sporangiumain és sporangiumtartóin végzett zsírsavösszetétel összes zsírsavra vonatkoztatott arányának összevetése a *P. halstedii*re jellemző adatokkal (Spring és Haas, 2002). Az azonos betűvel jelölt értékek statisztikailag nem különböznek $p=0,05$ -nél.

Izolátum/ gazdanövény	Zsírsav								
	C14:0 ^a	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:1	C20:5	C22:0	C22:1
X03- RHA274	0,9 b	13,9 b	9,8 c	1,6 b	11,0 b	tr ^b c	20,3 b	-	1,6 b
X03- HA-335	2,0 a	19,9 b	3,5 b	2,2 b	23,2 a	0,8 b	34,5 a	1,2 b	2,2 c
<i>P. halstedii</i> átlag (szórás) ^c	1,9 a (0,6)	17,4 a (2,3)	0,9 a (0,5)	11,0 a (3,2)	22,0 a (2,3)	1,9 a (0,4)	30,9 a (3,9)	0,8 a (0,1)	3,9 a (0,8)

^a szénatomszám: kettőskötések száma

^b tr= nyomokban kimutatható ($p<0.1\%$)

^c adatok Spring és Haas (2002) alapján

4.1.4. Szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. fungicidérzékenysége

A metalaxilos kezelés nélkül mesterségesen fertőzött HA-335 növényeken az X03 izolátum sűrű sporangiumgyepet fejlesztve sporulált. A metalaxillal kezelt HA-335 növényeken sporulációt nem lehetett megfigyelni és ezeknek a növények a hipokotilmetszeteiben mikroszkópos vizsgálat során sem volt megfigyelhető a kórokozó, tehát az X03 izolátum érzékenynek bizonyult metalaxillal szemben.

4.1.5. Egysporangiumtenyészet-előállítás módszerének értékelése

Napraforgóról származó *P. halstedii* izolátumok esetében az egysporangium-tenyészet előállításának sikere a sziklevelszegmens-fertőzéses módszerrel átlagosan 6–8%-os volt; az eredményesség izolátumtól függően 0 és 10% között változott. Az egysporangium-tenyészet izolálásának hatékonysága kizárólag friss inokulum használata esetében volt megfelelő.

A szerbtövisről származó X03 izolátum nem fertőzte meg a GK-70 napraforgófajtának sem a sziklevét sem a valódi lomblevelét. Amikor azonban a GK-70 csíranövény fél cm hosszú gyököcskét fertőztem egysporangiummal, a fertőzést követő két hét elteltével a növények 8%-án észleltem gyenge sporulációt. Az így nyert tiszta tenyészet a későbbiekben WSI-fertőzéssel felszaporíthatóvá vált.

4.1.6. *Plasmopara* egysporangium-vonalak virulencia-fenotípusai

A szerbtövisről származó X03 izolátum és ennek X/21 jelű egysporangium-tenyészete a szokásos differenciáló tesztben egyaránt sziklevelre korlátozódó (CLI-típusú) 717 virulencia-karaktert mutatott (14. táblázat). A fertőzés a sziklevel fölötti valódi szövetekre nem terjedt tovább egyik differenciáló vonal esetében sem, továbbá szisztemikus tünetre utaló lomblevélklorózis sem volt megfigyelhető. Heveny, sziklevelen kialakuló sporulációt követően a csíranövények gyakorta elhaltak.

14. táblázat. *Xanthium strumarium*-ról származó X03 izolátum és X/21 klónjának virulenciakaraktere differenciáló napraforgóvonal sziklevelein megfigyelhető CLI %-os fertőzöttsége.

izolátum	Differenciáló vonal								
	HA-304	RHA-265	RHA-274	DM-2	PM17	803-1	HAR-4	HAR-5	HA-335
X03	80	80	100	100	0	10	90	100	80
X/21	100	66	100	100	30 ^a	62 ^a	100	100	100

^a: gyenge sporuláció

15. táblázat. Napraforgóról származó izolatumok egysporangium-vonalainak virulenciakaraktere differenciáló soron.

Izolátum	Differenciáló vonal									pt ^d
	GK-70 ^a	RHA265	RHA274	DM-2	PMI7 ^b	803-1 ^c	HAR-4	HAR-5	HA-335	
Bi02/A4	10/15	0/15	0/15	0/15	0/15	na	0/10	0/10	0/10	100
Bi02/B2	15/15	0/15	0/15	0/15	0/15	na	0/15	0/10	0/15	100
Bi02/B6	15/15	0/15	0/15	0/10	0/10	0/3	0/10	0/10	0/10	100
Bi02/C2	15/15	1/15	0/15	0/15	0/10	na	0/10	0/10	0/10	100
Bi07/C7	15/15	3/15	0/15	0/15	0/10	na	0/10	0/10	0/10	300
911/C11	15/15	3/15	0/15	0/15	0/10	na	0/13	0/10	0/10	300
911/C12	12/15	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	0/10	0/10	100
911/D9	8/25	15/20	22/22	23/23	1/23	0/15	0/25	0/25	0/25	710
911/D12	15/15	7/10	0/10	13/15	4/15 (CLI)	na	0/10	0/10	0/10	310
98/A22	7/14	11/11	15/15	0/15	0/13	0/14	0/15	0/15	0/15	700
130/B1	8/25	2/2	10/10	16/16	9/11 (CLI)	0/10	0/15	0/15	0/15	710
130/B15	7/15	13/13	16/16	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	700
130/B3	14/16	15/15	10/10	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	700
130/A21	15/16	15/15	15/17	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	700
130/B20	21/25	23/23	23/23	4/24	0/4	3/19	0/22	0/25	0/18	700
130/F15	15/15	13/13	16/16	0/15	0/15	0/15	0/13	0/12	0/15	700
101/C1	25/25	25/25	25/25	25/25	25/25	0/25	0/25	1/25	0/25	730
101/C13	41/50	39/40	15/15	10/10	10/10 (CLI)	10/15 (CLI)	na	na	na	710
101/B23	21/22	15/15	15/15	1/16	0/3	0/8	0/16	0/15	0/16	700
129	10/20	6/6	8/8	17/17	7/12	8/10 (CLI)	0/15	0/15	0/15	730
145/B7	10/0	3/7	8/16	0/16	0/10	0/8	0/16	0/8	0/6	700
145/C9	18/18	17/17	15/15	16/16	2/4	0/8	0/18	0/18	0/20	710
145/C15	20/20	2/2	3/3	13/15	5/10 (CLI)	0/12	0/12	0/15	0/15	710
145/C19	5/9	10/14	5/13	1/16	0/12	0/8	0/16	0/8	0/7	700
145/C20	9/10	13/13	17/17	7/14	1/8	0/8	0/12	0/12	0/7	710
29-13/G3	4/8	4/10	4/12	0/16	0/10	0/9	0/13	0/12	0/7	700
29-13/G23	6/6	9/9	12/12	10/15	4/6	0/8	0/15	0/15	0/15	730
29-13/G24	8/8	12/16	16/16	0/16	0/12	0/6	0/10	0/9	0/8	700
29-13/F2	7/7	8/8	10/10	0/12	0/15	0/8	0/5	0/10	0/5	700
29-13/F3	2/24	15/26	25/25	3/25	0/16	2/17 (CLI)	0/24	0/26	1/19 (CLI)	700
29-13/F15	6/8	6/8	8/8	1/13	0/10	0/9	0/10	0/13	0/8	700
29-13/F16	7/20	9/20	25/25	3/24	2/24	0/16	0/25	0/25	0/13	700
29-13/F20	3/8	5/10	6/8	0/15	0/15	0/6	10/0	0/15	0/8	700
29-13/F23	16/40	9/25	22/25	9/25	0/24	0/22	0/25	0/26	0/17	710
61/B6	10/10	15/15	0/12	12/12	6/6	0/7	0/6	0/9	0/10	330
61/B11	7/13	14/16	0/16	12/13	8/8	0/8	0/8	0/9	0/11	330
61/C4	9/9	17/17	0/11	12/12	7/7	0/8	0/8	0/9	0/11	330
61/C9	13/13	13/13	0/12	13/13	4/4	0/8	0/8	0/7	0/12	330
61/C10	6/11	14/14	12/12	10/11	5/6	0/8	0/8	0/10	0/9	730
61/D7	50/50	27/30	0/30	10/10	16/16	0/15	0/17	0/18	0/20	330
61/D10	15/15	13/13	14/14	12/12	4/5	0/9	0/7	0/9	0/11	730
114/A10	9/9	13/16	0/14	10/10	4/5	0/8	0/8	0/8	0/10	330
114/C8	11/11	11/12	0/11	14/15	2/4	0/5	0/7	0/7	0/10	330
I/6a	12/13	14/14	16/16	0/16	0/11	0/17	0/15	0/13	0/16	700
II/3a	14/15	11/11	18/18	18/19	3/16	0/19	0/15	0/15	0/18	710
01/A2	12/15	15/17	17/17	0/17	0/18	0/16	0/15	0/15	0/18	700

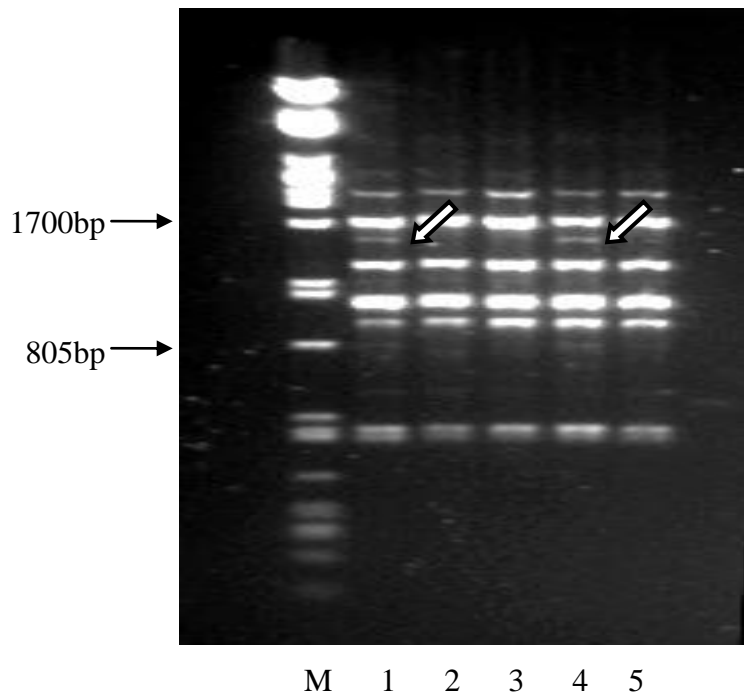
^a: fertőzött/összes növény, ^b: CLI, sziklevélre korlátozódó fertőzés, ^c: nem tesztelt, ^d: patotípus

A napraforgóról származó, hazai gyűjtésű 100, 330, 700, 710 és 730-as virulencia-fenotípusba tartozó tíz izolátum egysporangium-vonalai között a szülői, azaz a kiindulási virulenciakarakter mellett eltérő típusok is megjelentek (15. táblázat), azaz a szántóföldi minták virulencia-összetétel szempontjából szegregálódtak. Sőt kimutatható volt közöttük hazai szántóföldi minták elemzésekor eddig még nem izolált virulencia-fenotípusok, mint például a 300-as és a 310-es típus.

4.2. Molekuláris genetikai vizsgálati módszerek

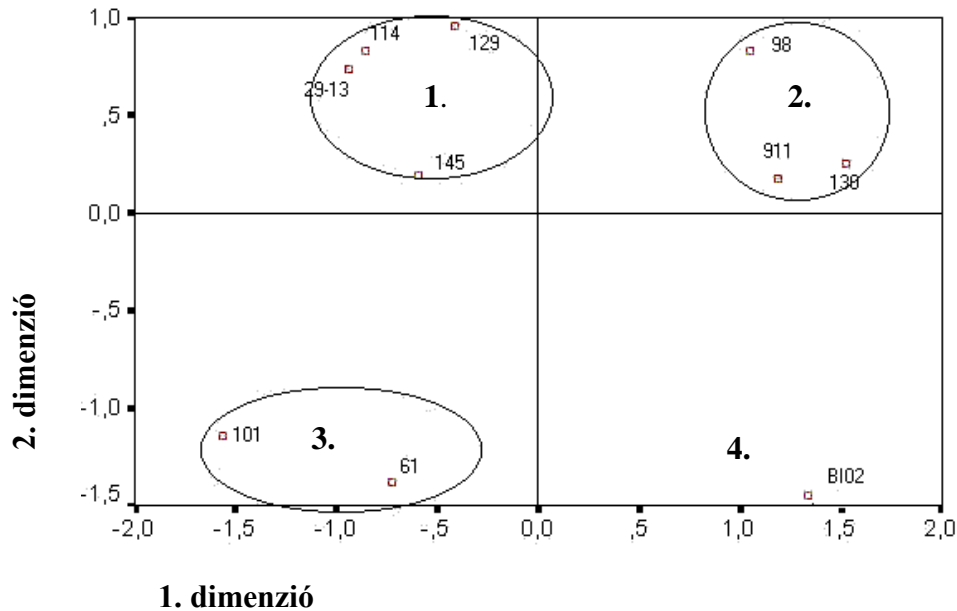
4.2.1. RAPD-analízis

A vizsgálat során használt 66 primer közül 43-mal kaptam terméket. Ezek közül 16 primer (UBC 103, 105, 701, 702, 703, 706, 711, 712, 715, 719, 722, 723, 726, 729, 730, 732) adott polimorf mintázatot a kiválasztott hazai öt patotípust képviselő *P. halstedii* izolátummal (7. ábra). A statisztikai értékelést 55 termék alapján végeztem. A hazai 10, patotípusonként 2-2 izolátum RAPD-eredményeinek multidimenziós értékelése négy csoport elkülönítésére adott lehetőséget. Az első csoportba tartozó izolátumok között megtalálható volt a 100-as, eredeti európai patotípus kivételével mindegyik hazánkban előforduló virulenciatípust képviselő izolátum, nevezetesen a 330, 700, 710 és 730. A második csoportba tartozó izolátumok a 100-as és a 700-as patotípust képviselték, míg a harmadik csoport a 330-as és 730-as izolátumot tartalmazta. Egy negyedik, különálló csoportot alkotott a 100-as patotípust képviselő, 2001-ben izolált minta (8. ábra).



7. ábra. *P. halstedii* izolátumok UBC 706 primerrel kapott RAPD-mintázata. M: molekulatömegmarker λ -pst, mintasorrend 1-5-ig: Bi02, 130, 145, 101, 61; a nyilak specifikus termékekre mutatnak.

Egyedi különbségek



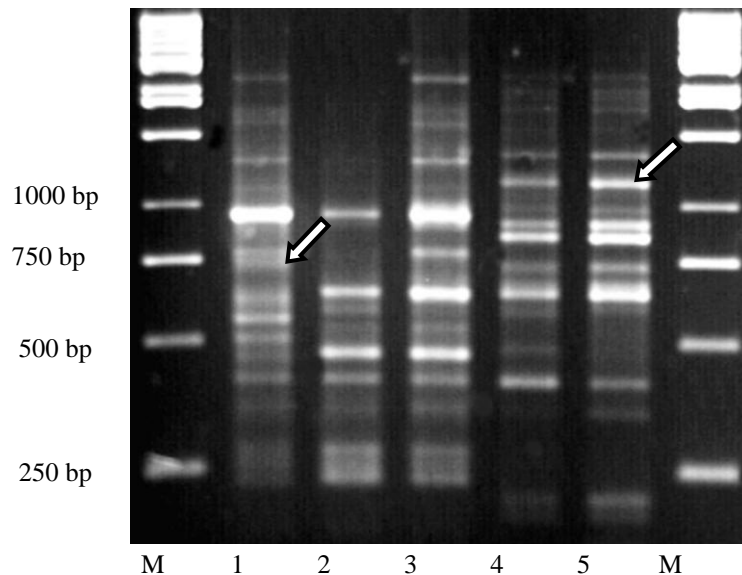
8. ábra. Az öt patotípust reprezentáló tíz hazai *P. halstedii* izolátum RAPD-mintázatának Multidimensional MDS (MultiDimensional Scaling) analízise SPSS (Statistical Package for Social Sciences) statisztikai programmal.

4.2.2. iSSR-vizsgálat

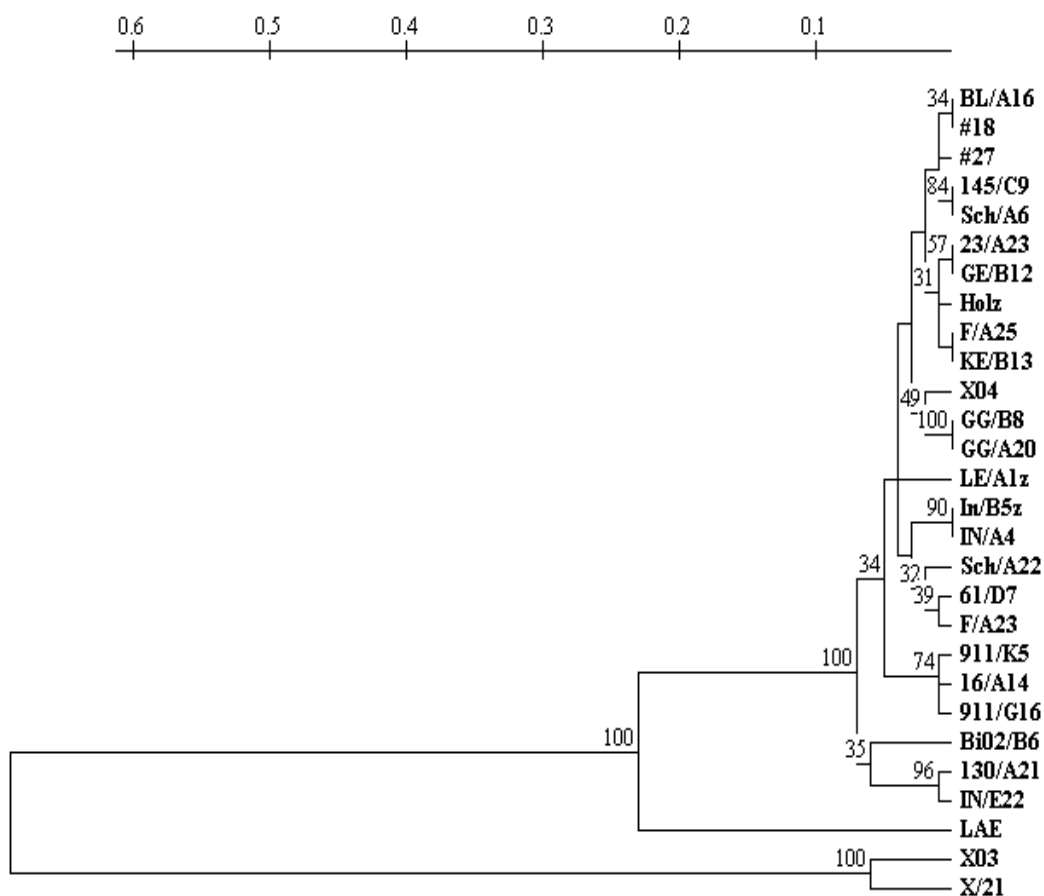
Az iSSR-módszerrel mindhárom gazdanövényről, napraforgóról, szerbtövisről illetve *H. × laetiflorus*ról származó izolátumok esetében is jól reprodukálható mintázatot kaptam (9. ábra). Az általam tesztelt kilenc indítószekvencia közül ötöt használtam fel a vizsgálatokhoz: (CAC)₄RC, T3B, (GAG)₄RC, (GT)₇YG és (GTG)₅, mivel az M13 és a (GTC)₅ primerek rosszul értékelhető, elmosódó terméket adtak. A (GATA)₄ és (CT)₈T primerekkel pedig egyáltalán nem kaptam terméket. Az izolátumok közötti genetikai távolság értékelését összességében 116 PCR-termék megléte vagy hiánya alapján végeztem. A mintázat értékelésekor figyelembe vett termékek közül mindössze tizenegyet lehetett mindegyik mintában azonosítani.

Nagyfokú, 0,6 feletti genetikai távolságot tapasztaltam a napraforgó, illetve a szerbtövis gazdanövényről származó izolátumok között (10. ábra). A szerbtövisről izolált X03 és annak egysporangium-klónja, az X/21 teljesen elkülönült a többi vizsgált izolátumtól magas megbízhatósági szinten, 100-as bootstrap érték mellett. Viszont a szerbtövisről izolált X04-es minta iSSR-mintázata a napraforgóról származó izolátumokhoz hasonlított. A *Helianthus × laetiflorus*ról származó izolátum mintázata bár közelebb állt a napraforgóról származó izolátumokhoz, mint a szerbtövisről származó X03 minta, mégis maximális bootstrap érték mellett, nagy megbízhatósággal elkülönült a termesztett napraforgóról gyűjtött izolátumok által alkotott csoporttól.

A napraforgóról származó izolátumok között maximális bootstrap értékekkel két csoport különült el 0,25 genetikai távolságot mutatva. Az egyik csoport mindössze három mintát tartalmazott, a Bi02/B6, a 130/A21 és az IN/E22 izolátumokat. A csoportot alkotó két magyarországi és egy francia izolátum mindegyike eltérő virulencia-fenotípust képviselt: 100, 700 és 703. A három izolátumot alkotó csoport elkülönülését a T3B primerrel kimutatható specifikus mintázat okozta, míg a többi indító szekvencia esetében a két csoport közötti különbség nem mutatkozott ennyire látványosan. A vizsgálatban szereplő többi 22 minta egy (az X04-es minta) kivételével szintén mind napraforgóról származott. A 22 minta között 0–5%-os genetikai távolság volt kimutatható gyenge, 50 alatti bootstrap érték mellett. A legtöbb izolátumot tartalmazó, alacsony variabilitást mutató csoport különböző földrajzi eredetű, valamint patotípusú, metalaxilérzékeny és -toleráns mintákat egyaránt tartalmazott. Bár a napraforgóról származó izolátumok között azonosítható volt egy-egy izolátumra jellemző egyedi mintázat, a módszerrel kapott változékonyságot mégsem lehetett patotípussal összefüggésbe hozni. A vizsgált tíz patotípus esetében virulencia-fenotípusra utaló marker nem volt kimutatható.



9. ábra. iSSR módszerrel, (GTG)₅ primer alkalmazásával kapott PCR-termékek agarózgél-elektrofozísise. M: molekulatömeg-marker, minták sorrendje 1-5 -ig: LAE (*H. × laetiflorus*ról); IN/E22, BL/A16 (*H. annuus*ról); X03, X/21 (*X. strumarium*ról); a nyilak specifikus termékekre mutatnak.

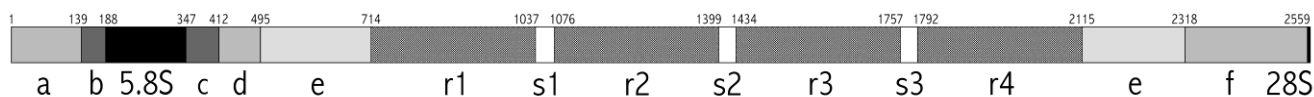


10. ábra. Dendrogram eltérő gazdanövényről származó *Plasmopara*-izolátumok iSSR-mintázata alapján, neighbour-joining módszerrel képzett, UPGMA analízissel kalkulált genetikai távolsága. A dendrogram elágazásának megbízhatóságát 100 ismétlésben kalkulált bootstrap érték mutatja.

4.2.3. A *Plasmopara halstedii* ITS-régiójának meghatározása

Az ITS-régióra tervezett PCR egy kb. 2600 bp hosszúságú szekvenciát eredményezett, amit két kisebb méretű, a gélen halványan kivehető melléktermék kísért. A kérdéses fragmentum bázissorrendjének meghatározásához a tesztelt négy restriktív enzim közül az *EcoRI* enzim két közel azonos, 1,4 kilobázis, valamint 1,2 kilobázis méretű darabra hasította az ITS-régiót, melyek így már megfelelő méretűnek tűntek a szekvencia kiolvasására. A két fragmentum PCR-rel történő szelektív felszaporítása megmutatta, hogy a rövidebb, 1,2 kilobázis hosszú szakasz tartalmazta az ITS1-régiót, a hosszabb, 1,4 kilobázis hosszúságú pedig az ITS2-régiót. A bázissorrend megismerése ismétlődő régiók jelenlétére világított rá az ITS2-régióban (11. ábra). A két fragmentum szekvenciájának megismerését követően, az ismétlődést nem tartalmazó régióba tervezett áthidaló ITS-FFL primer segítségével össze lehetett illeszteni a teljes ITS-szekvenciát. A *Plasmopara halstedii* teljes ITS-régiója 2587 bp hosszúságúnak bizonyult. A szekvencia NCBI GenBank adatbázis kódja: AY773346.

A *Plasmopara halstedii* ITS-ét megfelelő rokon Oomycetes fajok ITS-régiójával összevetve megállapítható, hogy a napraforgó-peronoszpóra ITS1-régiója 217 bp hosszú, ezt követi a 158 bp hosszú konzervatív 5,8 rDNS régió, majd ezt követően egy 2212 bp hosszúságú ITS2-régió található a nagy riboszómális alegység (LSU) előtt (2559-2594 bp). A kapott szakaszok eltérő szintű homológiát mutattak a rokon szervezetek megfelelő szakaszaival összehasonlítva (11. ábra).



11. ábra. *Plasmopara halstedii* ITS-régiójának térképe.

a, ITS1 variábilis része; b, ITS1 konzervatív része; 5.8S, 5.8S riboszómális alegységet kódoló régió; c, ITS-2 konzervatív része; d, ITS-2; e, ITS-2 azon része, amely nem található meg *Phytophthora*- és más ismert *Peronospora*-fajokban; r1 - r4 ismétlődő szakaszok; s1- s3 az ismétléseket elválasztó elemek; f, ITS-2 variábilis része; 28S, a nagy riboszómális alegység (LSU) kezdeti régiója. A számok a régiókat határoló bázisokat jelölik (Thines et al., 2005).

A *P. halstedii* ITS-szekvenciájára jellemző, hogy az a konzervatív szakaszok közelében (b, c, f) magasabb szintű homológiát mutat a rokon szervezetek homológ régióival, míg ezektől a szakaszoktól távolodva (a, e) a változékonyság nő. Az ITS2-régió tartalmaz egy olyan 1822 bp hosszúságú inszerciót, ami az adatbázisban megtalálható ITS-szekvenciákkal nem mutat hasonlóságot. Ez az 1822 bp-os régió tartalmaz négy, egyenként 322 bp hosszúságú (r1-r4) ismétlődő szakaszt, melyet három 34-38 bp hosszúságú (s1-s3) szakasz köt össze. Az ismétlődések 87%–91%-ban hasonlítanak egymásra. Az ismétlések közötti hasonlóság azonban nem függ össze azok fizikai helyével, hiszen a legnagyobb hasonlóság az első és a harmadik szakasz között található, míg a legkisebb hasonlóság az egymás mellett elhelyezkedő harmadik és negyedik, valamint az egymástól legnagyobb fizikai távolságra levő első és negyedik ismétlődés között van (16. táblázat). A szekvenciaazonosítás során felhasznált *EcoRI* hasítóhely a második ismétlődő szakaszban volt megtalálható.

16. táblázat. A *P. halstedii* ITS2-régiójában található négy ismétlődő szakasz közötti hasonlóság százalékos mértéke.

		Repetitív elemek %-os hasonlósága			
		r1	r2	r3	r4
Repetitív elemek	r1	-			
	r2	90.2	-		
	r3	91.3	89.4	-	
	r4	88.3	87.4	88.3	-

4.2.4. *Xanthium*ról származó izolátum ITS- és LSU-régiójának jellemzése

ITS-RFLP-analízis

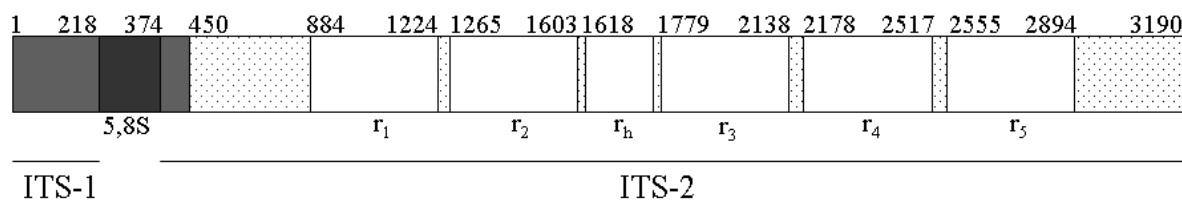
A szebtövisről származó X03 izolátum ITS-régiójának PCR-terméke 3000 bp-nál nagyobbak mutatkozott. A két ITS-szekvencia restrikciós enzimekkel történt összehasonlításakor eltérést tapasztaltam az *EcoRI*, *HindIII*, *AvaIII*, *HinfI* és *Hin6I* enzimekkel kapott termékek számában és restrikciós mintázatban, melyet a 17. táblázat foglal össze.

17. táblázat. *Plasmopara* sp. (X03) és *P. halstedii* (IN/E22) ITS-régió restriktív szakaszainak RFLP-vizsgálata tizenegyféle restriktív enzimmel. A restriktív szakaszokat méret alapján agaróz-gélelektroforézissel választottam szét.

Izolátum	restriktív szakaszok száma										
	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvaIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>Hin6I</i>	<i>EcoRV</i>	<i>MbiI</i>	<i>PstI</i>	<i>SmaI</i>	<i>Cfr13I</i>
X03	0	0	6	5	6	4	0	0	0	0	0
IN/E22	1	0	1	0	5	1	0	0	0	0	0

ITS szekvencia-meghatározása és jellemzése

Az X03 izolátum esetében az ITS felszaporítása 3225 bázis hosszúságú terméket eredményezett, amit DQ993167 kód alatt elhelyeztem az NCBI GenBank adatbázisban. A szekvenciaanalízis megmutatta, hogy az ITS1-régió (1-218 bázis) 92,7%-ban hasonló a *P. halstedii* napraforgóról származó izolátumaihoz. A konzervatív 5,8S régió (219–374 bázis) 100%-ban megegyezett a két mintában. Az ITS2-régió kezdeti 76 bázisa (375–450 bázis) 92,1%-os hasonlóságot mutatott a két minta között. Maga az ITS2-régió 2815 bázis hosszúságú volt. Az ITS2 extrém hosszúságát a 375 és 3190 bázis között elhelyezkedő mintegy 2010 bázis hosszúságú inszerció okozta (12. ábra). Az ITS2-régió öt teljes, kb. 350 bázis hosszúságú és egy fél repetitív elemet tartalmaz, melyek egymáshoz 76,2–98,9%-ban hasonlítanak (18. táblázat). Az X03 izolátum esetében azonosított inszerció eltért a *Plasmopara halstedii*-nél azonosított ismétlődésektől. A kétféle gazdanövényről származó minta különbözött egymástól a repetitív elemek szekvenciája és struktúrája alapján egyaránt.

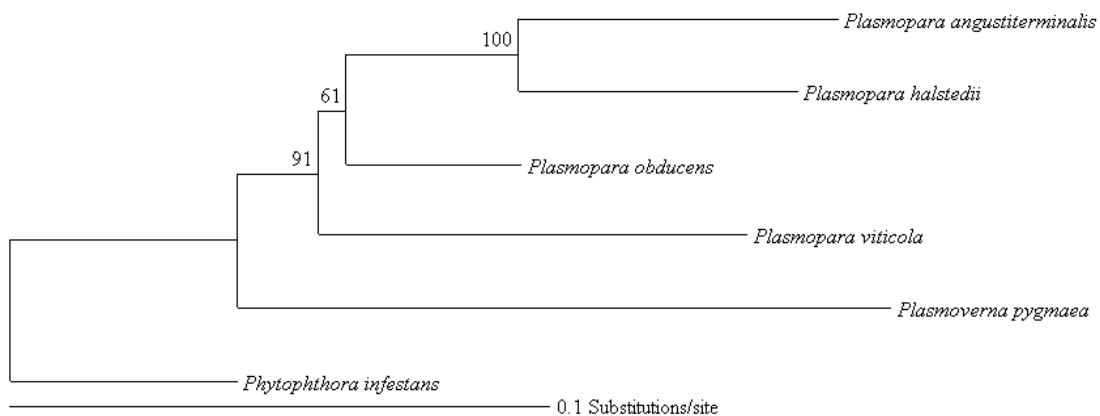


12. ábra. *Plasmopara* sp. (X03 izolátum) ITS1-5,8S-ITS2 régiója. A színkódolás a *P. halstedii*-hez viszonyított hasonlóságra utal: fekete: 100%-os hasonlóság, sötét: 92% feletti hasonlóság, pontozás: 80%-alatti hasonlóság. A fehér régió a repetitív szakaszokat jelöli (r1-5 és rh), a számok a régióhatárokat jelölik.

18. táblázat. Az X03 izolátum ITS2-szakaszán található ismétlődő szakaszok egymáshoz viszonyított százalékos hasonlósága.

		Repetitív elemek %-os hasonlósága				
		r1	r2	r3	r4	r5
Repetitív elemek	r1	-				
	r2	86,2	-			
	r3	85,0	76,2	-		
	r4	97,6	84,4	83,8	-	
	r5	98,2	85,0	83,8	98,8	-

Rokon fajokkal összehasonlítva az ITS-régió 610 bázis hosszúságú konzervatív szakaszát, a Jukes-Cantor módszerrel készített Minimum Evolution (Rzhetsky és Nei, 1993) filogenetikai vizsgálat alapján az X03 izolátum a *P. halstedii* fajjal monofiletikus leszármazásúnak mutatkozott (13. ábra).



13. ábra. *Plasmopara* fajok ITS1–5,8S–ITS2 régiója 610 bp hosszú konzervatív régiójának filogenetikai analízise Jukes-Cantor távolságra készített Minimum Evolution modellel. A 100 ismétlés alapján meghatározott bootstrap értékek az elágazásoknál láthatóak.

LSU-szekvencia meghatározása

Az X03 izolátum genomi nagy riboszómális alegységének D1/D2/D3 régiója az Oomycetes-specifikus szervezetre specifikus indítószekvenciákkal felszaporítható volt, és a várt 700 bp hosszúságú terméket adta. A PCR-terméket a gélből visszaizolálva direkt módon fel lehetett használni a bázissorrend meghatározására az univerzális NL1 és NL4 primerekkel. A termék szekvenciája DQ457006 kód alatt lett elhelyezve a GenBank adatbázisban.

4.2.5. LTR-retrotranszpozon izolálása *P. halstedii*ből

A reverz transzkriptázból származtatott degenerált primerpárral kapott PCR-termékek közül hat szekvencia bázissorrendjét határoztam meg (19. táblázat). Ezek közül kettő, az RT_6 és RT_9-es klón hasonlított egymáshoz, valamint fehérjeszinten hasonlóságot mutatott a GenBank adatbázisban található *Phytophthora infestans* reverz transzkriptáz génjének szekvenciájával. Az RT_3 és RT_5 klón bár egymáshoz nem hasonlított, mégis mindkettő homológiát mutatott az adatbázisban fellelhető *P. infestans* és *Phytophthora parasitica* megfelelő szakaszaival, az RT_2 és RT_4 klón viszont nem mutatott számottevő homológiát egyik GenBank adatbázisban található szekvenciával sem.

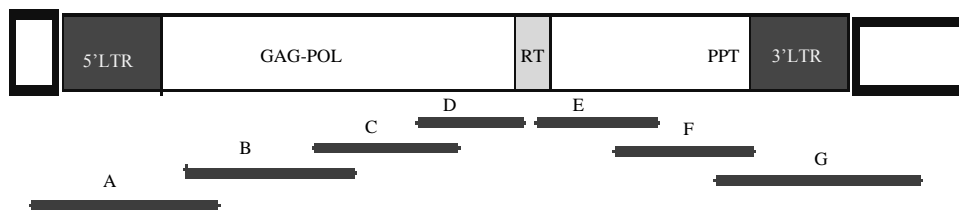
19. táblázat. Reverz traszkriptáz (RT) génre tervezett degenerált primerpárral (Flavell et al., 1992) a *P. halstedii*, Bi02/B6 izolátumával kapott PCR-termékek jellemzése.

RT klón	hossza	RT 5' vég	RT 3' vég	Blastx homológia ^a
RT_9	260bp	actgcgttcttacacgg	agcatgtcgtcaacgta	RT; <i>P. infestans</i>
RT_6	260bp	acggctttctccacgg	aacatcatccacgta	RT; <i>P. infestans</i>
RT_2	209bp	acggcgttctccatgg	aacatgtcatctacata	nincs
RT_3	237bp	acggctttctgcatgg	aacatgtcgtcaacata	RT; <i>P. parasitica</i>
RT_4	322bp	acggctttctgcacgg	aatgtatctctgctata	nincs
RT_5	239bp	accgctttctccacgg	aacatgtcatcgacata	RT; <i>P. infestans</i>

^aA klónok szekvenciahomológiáját fehérjeszintű Blastx kereséssel határoztam meg a GenBank adatbázisban található adatok alapján.

A retrotranszpozon LTR-régiójának 3' irányba történő megismerésére használt EcoRI-adapter és a kifelé mutató primerpár terméke két, közel azonos terméket eredményezett, a 32_a (397 bp) és 32_b (435 bp) szakaszokat (14. ábra, E). A kapott terméken kifelé mutató nested (RT33 és RT34) és MseI-primerrel három szekvenciát kaptam (14. ábra, F). Ezek közül kettő hasonló méretű volt (518, ill. 557 bázis), míg a harmadik szekvencia rövidebb, csak 330 bázis hosszúságú volt, bár a közös szakaszon belül nagy hasonlóságot mutatott mindhárom szekvencia egymással. Az újabb (RT35 és RT36) nested primerpárral kapott 717 bázis hosszúságú szekvencia (14. ábra, G) 400 bázis után nem mutatott homológiát rokon szakaszokkal, így feltehetőleg a szakasz további, nem homológ része a 3' LTR-régióba esett. Az LTR-régió előtt 9 bázis hosszúságú (5' GAGGGGAAG), ún. polipurin track régió volt azonosítható, amit egy TAT-szekvencia követett. Az LTR-régió első két bázisa más ismert LTR-szakaszokhoz hasonlóan a TG-motívumot tartalmazta, míg a 708-as bázisnál az LTR-régió végét jelző CA-szekvenciát lehetett azonosítani. A feltételezett LTR-régió 298 bázis hosszúságúnak bizonyult.

Az 5' régió irányába tervezett RT51 és EcoRI adapterprimerrel kapott kb. 500 bázis hosszúságú PCR-terméket nem tudtam a nested RT52 primerrel felszaporítani, bár az RT51-gyel kapott termék blastx-keresés alapján szintén *Ty*-copia típusú gag-pol poliprotein szekvenciával mutatott hasonlóságot, azonban az általam izolált RT-szekvenciákkal mégsem lehetett összeilleszteni. Ezért egy plusz bázissal hosszabb, új primert terveztem (RT51új). Az így kapott terméket már fel tudtam szaporítani az RT52 primerrel nested módon. A kapott termék (kb 1000 bázis) szekvenciája illeszkedett a primer tervezéshez használt RT9-es fragmentumhoz és a blastx homológiakeresés hasonlóságot mutatott ki *TyI*-copia típusú gag-pol poliproteinszekvenciával (14. ábra, D). Az 5' LTR-régió megismeréséhez RT53 és RT54 primerekkel és MseI adapterrel ellátott templáttal kapott 409, illetve 381 bp hosszúságú szekvencia (14. ábra, C) alkalmas volt az RT55 és RT56 primerek tervezésére. Az így kapott 513 bp hosszúságú szekvencia (14. ábra, B) alapján tervezett RT57 és RT58 primerpárral a 3' LTR-régióba tervezett primerrel kombinálva, genomi DNS-t használva megkaptam a hiányzó részt az 5' LTR-régióig (14. ábra, A). A retrotranszpozon 5' és 3' végein található LTR-régiók nagyfokú hasonlóságot mutattak egymással. A szekvenálással meghatározott szakaszok bázissorrendjét a GenBank adatbázisban helyeztem el, melynek adatait a 20. táblázat tartalmazza.



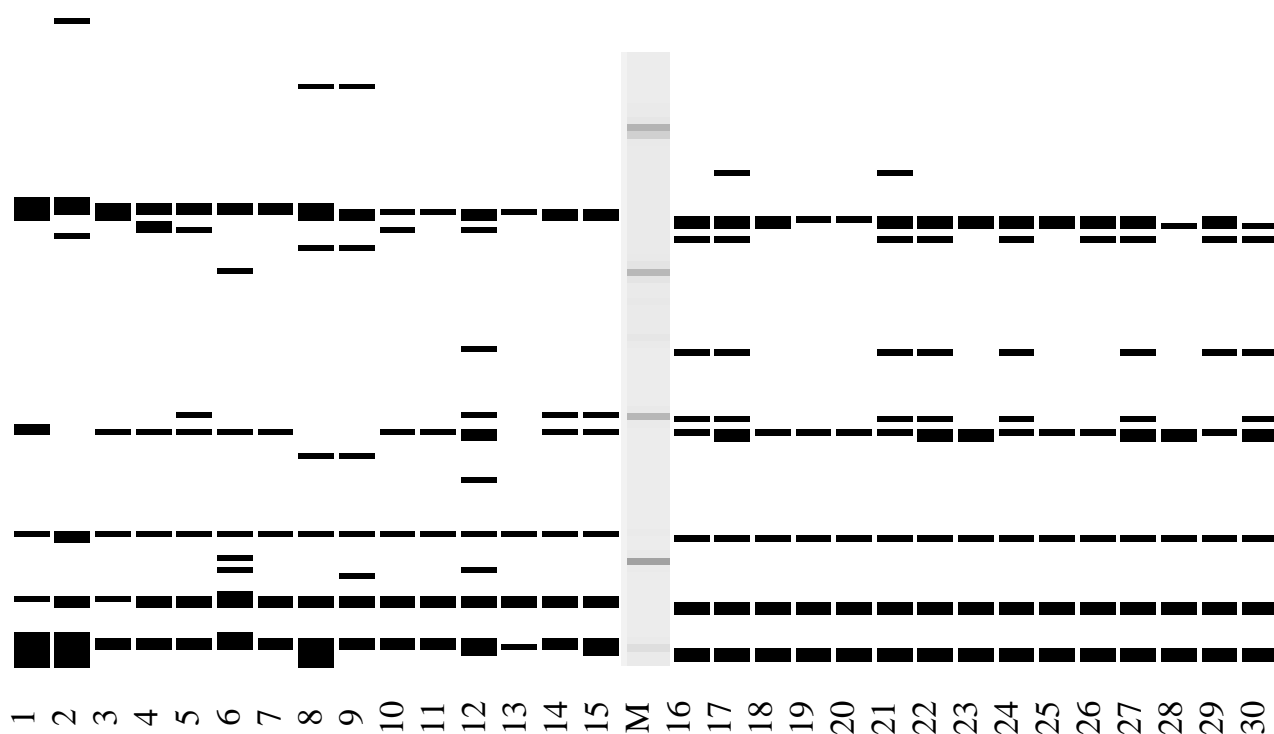
14. ábra. *P. halstedii* LTR-retrotranszozon szerkezeti felépítése és a megismeréséhez szekvenált szakaszok relatív elhelyezkedése A-tól G-ig.

20. táblázat. A *Plasmopara halstedii* genomi nukleinsavának felhasználásával, kromoszómasétálás módszerével meghatározott LTR-típusú retrotranszozon-szakaszainak hossza és NCBI GenBank adatbázisbeli kódja.

Régió	Szakasz	Hossz (bázis)	GenBank kód
A	58	1473	FJ647568
B	56	513	FJ647567
C	54_1	381	FJ647566
	54_5	409	FJ647565
D	52_11	964	FJ647564
	51_16	482	FJ647563
	51_15	470	FJ647562
	51_5	483	FJ647561
	51_3	478	FJ647560
	RT	RT_9	240
RT	RT_6	260	FJ647573
	RT_5	258	FJ647572
	RT_4	322	FJ647571
	RT_3	237	FJ647570
	RT_2	209	FJ647569
E	32_A	397	FJ647554
	32_B	435	FJ647555
F	34_7	330	FJ647558
	34_6	518	FJ647557
	34_5	557	FJ647556
G	36LTR	717	FJ647559

4.2.6. *P. halstedii* S-SAP-analízise

A fajspecifikus LTR-régióra illeszkedő 5' és 3' irányba tervezett S-SAP primerek, az LTR_5PLH (Cy5 TCGTATTGGACATACTGGCGATCTT), illetve az LTR_3PLH (Cy5 CTTAGAGGTAGCAACTAGATTGTGAA) segítségével kivitelezhetővé vált a retrotranszpozon alapú variabilitásvizsgálat a *P. halstedii* esetében. Ez a próba tíznél kevesebb, átlagosan nyolc terméket adott a vizsgált minták körében. A próbával kapott termékek mérete 50 és 300 bázis között változott. A filogenetikai vizsgálatához tíz termék meglétét vagy hiányát vettem figyelembe (15. ábra).

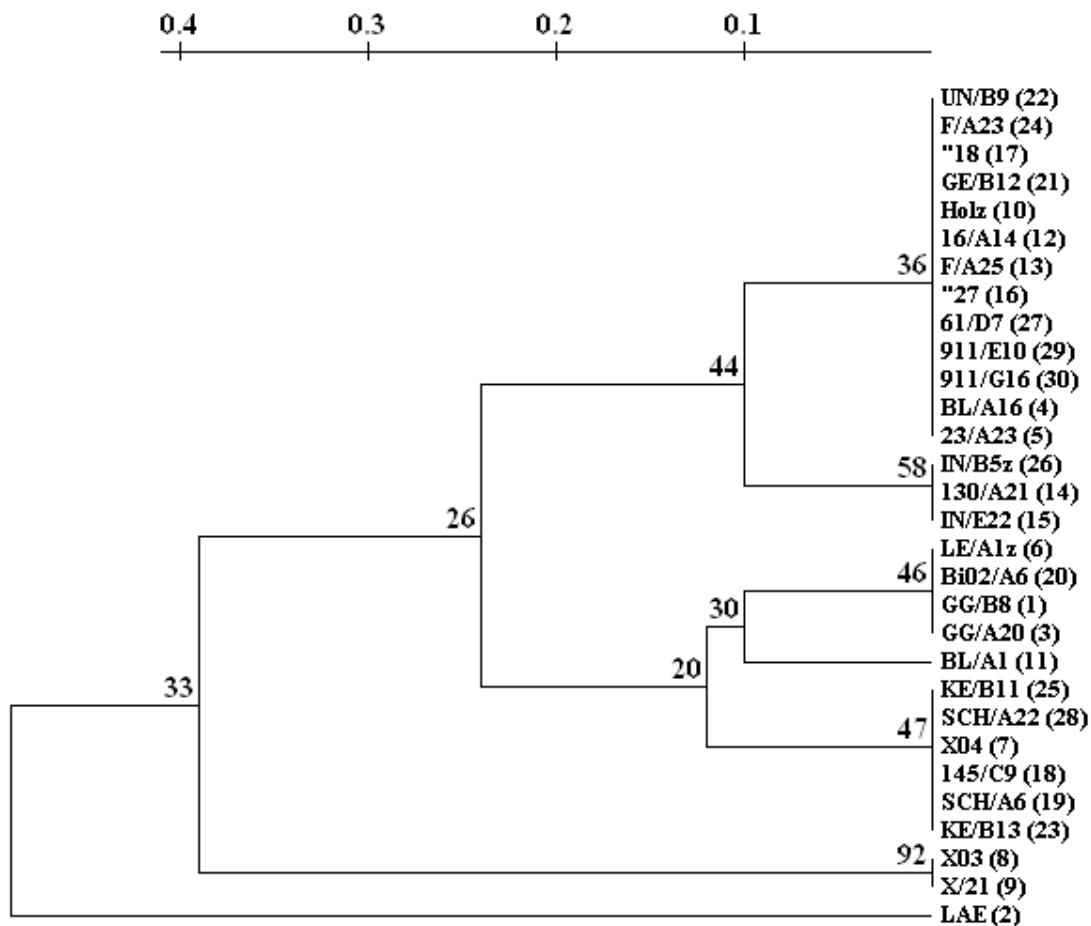


15. ábra. *P. halstedii* Mse+0 és LTR_5PLH primerek kombinációjával kapott S-SAP-mintázata. Minták:1-15, 16-30, M: Marker. Az egyes minták kódja a 16. ábrán van feltüntetve, ahol a sorszám zárójelben szerepel az izolátum kódja mögött. A molekulatömeg-marker (M) 50, 100, 150, 200 bázis méretű.

A retrotranszpozonok inszerciós polimorfizmusának következtében alcsoportok elkülönülése figyelhető meg a populáción belül az S-SAP-módszerrel (16. ábra). A legnépesebb csoportot alkotó

magyar, német, francia és amerikai eredetű izolátumok: 61/D7, 911/E10, 911/G16, GE/B12, Holz, BL/A16, #18, #27, 23/A23, F/A23 mintázata hasonlított a legjobban egymásra. A retrotranszpozon alapú S-SAP-módszer többek között szántóföldi izolátumhoz köthető specifikus mintázatot adott a GG izolátum minkét vizsgált egysporangium-tenyészetére, a GG/A20 és a GG/B8 esetében. Hasonló jelenség volt megfigyelhető a vizsgált IN (IN/B5z és IN/E22), SCH (SCH/A6 és SCH/A22) KE (KE/B11 és KE/B13) izolátumok esetében is.

A *Xanthium* (X03 és X/21) és *H. × laetiflorus* (LAE) gazdanövényekről származó izolátumok szintén tartalmazták a vizsgált retrotranszpozont, de gazdanövényeik alapján elkülönültek a többi, napraforgóról származó izolátumok csoportjától (16. ábra).



16. ábra. *P. halstedii* 30 izolátumával végzett S-SAP-vizsgálat alapján kalkulált dendrogram neighbour-joining módszerrel és UPGMA analízissel, Treconw programmal megjelenítve. A zárójelben megadott számok a 15. ábrán található mintasorrendre utalnak.

4.2.7. Izoenzimvizsgálat CAE-vel

A CAE-vizsgálatok kivitelezéséhez elegendő összesen 25 mg minta. Reakciónként mintegy 30–100 µg sporangium és sporangiumtartó kivonatára volt szükség az enzimaktivitás kimutatáshoz. Az enzimek elválasztásához szükséges futásidő 20–40 perc között változott. A vizsgált 16 izoenzim aktivitás alapján négy csoportba volt sorolható: nem festődő (NF), gyenge jelet adó (Gy), nem reprodukálható (NR) és végül, az erősen festődő (E). Az enzimek festődési jellemzőit a 21. táblázat foglalja össze.

21. táblázat. A vizsgált enzimszisztemek enzimkódexbeli (EC) száma, az elválasztáshoz használt futtató puffer, az elválasztási idő és az enzimfestődés jellemzése.

Enzim rövidítés	EC szám	Puffer	Futásidő	Szignál aktivitás ^a
APH	3.1.3.2	TG	25p	E
ADH	1.1.1.1	TG	20p	Gy
ALP	3.1.3.1	CAAMP	25p	NF
GPI	5.3.1.9	TG	30p	NR
GDH (NAD)	1.4.1.2	TG	20p	Gy
GDH (NADP)	1.4.1.4	TG	20p	Gy
G6PDH	1.1.1.49	TG	20p	E
HEX	2.7.1.1	TG	20p	Gy
IDH	1.1.1.42	CAAMP	40p	E
LDH	1.1.1.27	LiOH	20p	Gy
LAP	3.4.11.1	CAAMP	20p	NF
MDH	1.1.1.37	CAAMP	20p	E
ME	1.1.1.40	TG	30p	NR
PEP A	3.4.13	TG	20p	NR
PEP C	3.4.13	TG	20p	NR
PGM	5.4.2.2	TG	30p	E

^a Szignál aktivitás és ismételhetőség. E: erős, Gy: gyenge, NF: nem festődik, NR: nem reprodukálható

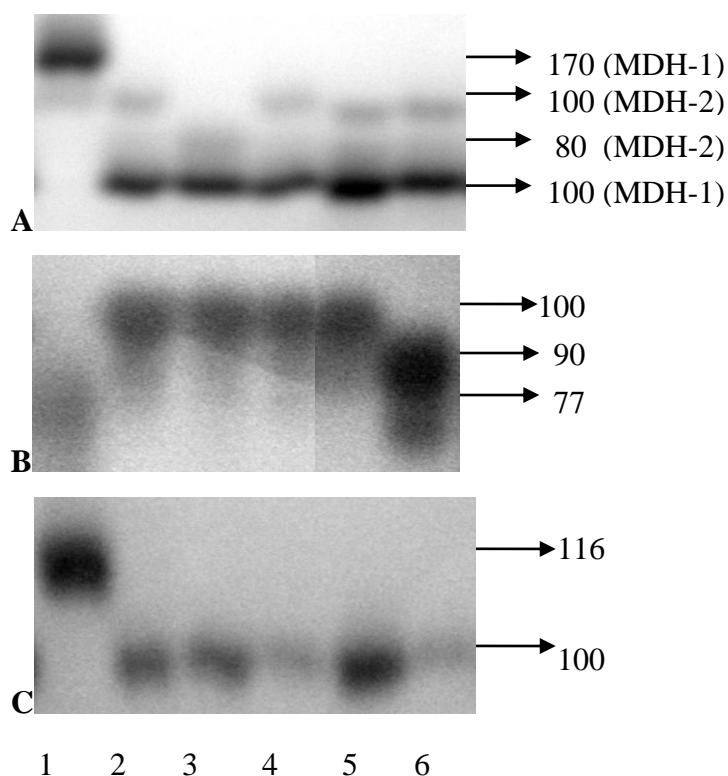
Az enzimaktivitás az alkalikus foszfatáz (ALP) és a leucin-aminopeptidáz (LAP) izoenzimiek esetében nem volt kimutatható. Az alkohol-dehidrogenáz (ALP), a NAD-függő glutamát-dehidrogenáz (GDH-NAD), a NADP-függő glutamát-dehidrogenáz (GDH-NADP), a hexokináz (HEX) és a tejsav-dehidrogenáz (LDH) alacsony szintű aktivitást mutatott. A maleinsav (ME), két peptidáz (PEPA és PEPC) és a glükózfoszfát-izomeráz (GPI) festődése nem volt jól reprodukálható, mivel a festődés intenzitása, valamint az enzimek elektroforetikus mobilitása változott az ismétlések során.

A vizsgált izoenzimiek közül ötlet kaptunk jól értékelhető eredményeket, ez az almasav-dehidrogenáz (MDH), az izocitromsav-dehidrogenáz (IDH), a foszfoglükomutáz (PGM), a savas foszfatáz (APH), és a glükóz-6-foszfat-dehidrogenáz (G6PDH). Három esetben, a PGM, IDH és az MDH enzimeknél találtunk allelikus eltérésekre utaló jeleket. A kimutatható izoenzimlokuszok alapján a mintákat négy multilokusz-fenotípusba (MLP-be) lehetett sorolni (22. táblázat). Az 1-es MLP tartalmazta az izolátumok többségét. A 2-es MLP-re jellemző mintázatot egy magyar és egy szerbiai izolátum 2-2 egysporangium-tenyészetéből származó izolátum mellett ötödikként egy németországi minta mutatta. A 3-as MLP-be egy izolátum tartozott, mely a *H. × laetiflorus*ról származott, míg a 4-es MLP-t a *Xanthium*ról származó X03 izolátum alkotta.

22. táblázat. *Plasmopara halstedii* izolátumok multilokusz-fenotípusos besorolása (MLP) izoenzim genotípus kombináció alapján.

MLP ^a	Izoenzimgenotípus				Mintaszám
	IDH	MDH-1	MDH-2	PGM	
1	100/100	100/100	100/100	100/100	38
2	100/100	100/100	100/100	90/90	5
3	100/100	100/100	80/80	100/100	1
4	116/116	170/170	100/100	77/77	1

^aMLP: multilokusz-fenotípus



17. ábra. *P. halstedii* CAE-vel kimutatott izoenzimintázata három enzimek reakció (A-C) bemutatása alapján: A: almasav-dehidrogenáz (MDH) aktivitása két lokuszban figyelhető meg (MDH-1 és MDH-2), az aktív enzim relatív mobilitás (RM) értékeit a nyilak mögötti szám jelöli. B: foszfoglükomutáz (PGM) monomer negyedleges szerkezete homozigóta mintákra utal, ahol RM77, 90 és 100 figyelhető meg; C: két alegységből álló izocitromsav-dehidrogenáz alléljai (IDH) RM100 és 116. Mintasorrend 1-6-ig: X03 (MLP4), IN/E22 (MLP1), LAE (MLP3), UN/B9 (MLP1), BL/A16 (MLP1), SCH/A6 (MLP2), zárójelben a multilokusz-fenotípus (MLP) besorolás szerepel.

MDH. A két lokuszú almasav-dehidrogenáz enzim termékeire eltérő enzimatis aktivitás jellemző. Az intenzíven festődő lokuszt MDH-1-nek azonosítottam, míg a gyengén festődőt MDH-2-nek. Mindegyik vizsgált mintában két elektroforetikus csík festődött az MDH izoenzim esetében. A minták homozigótának bizonyultak (17/a ábra, 23. táblázat). Az MDH-1 allélok RM 100 és RM 170, az MDH-2 allélok RM 80 és RM 100-nak bizonyultak. A vizsgált minták körében három genetikai kombinációt lehetett azonosítani. Az összes napraforgóról származó izolátum, valamint két *Xanthium*ról származó izolátum (X02 és X04) mindkét lokuszra nézve a 100/100 genotípusba tartozott. Az évelő *Helianthus* × *laetiflorus*ról származó LAE izolátum egyedi genotípust képviselt, melyet az MDH-1 100/100 és MDH-2 80/80 jellemzett. Egy harmadik genotípust (MDH-1 170/170 és MDH-2 100/100) a *Xanthium*ról származó X03 izolátum alkotott (23. táblázat).

PGM. A foszfoglükomutáz enzim egy lokuszban kódolt és monomer szerkezetű, azaz az aktív enzim egy alegységből áll, mégis a fő festődő terméket általában egy elmosódó, gyengén festődő melléktermék kísérté. Az értékelésnél a mellékterméket nem vettem figyelembe. A PGM szintén polimorfnak mutatkozott, vizsgálataink során a PGM 100-as, 90-es és 77-es alléljait lehetett azonosítani. Mindegyik vizsgált minta homozigótának bizonyult. Az izolátumok *100/100*, *90/90* és *77/77* genotípusokat képviselték (17/b ábra, 23. táblázat). Az összes *Helianthus*-fajról származó izolátum a 100-as vagy a 90-es allélt tartalmazta. A *90/90*-es genotípus magyarországi (Bi02/A4, Bi02/B6), szerbiai (911/C11, 911/C12) és német (LE/A1) izolátumban volt megtalálható, melyek 100, 310 és 700-as patotípusba tartoztak. A *Xanthium*ról származó X02 és X04 izolátumok a többi napraforgóról származó izolátummal együtt a *100/100* genotípusba tartozott. A *Xanthium*ról származó X03 izolátum egyedül képviselte a *77/77* genotípust (23. táblázat).

IDH. A dimerikus izocitromsav-dehidrogenáz enzimnek két allélját lehetett azonosítani (100 és 116) homozigóta formában. Mindegyik izolátumra a *100/100*-as genotípus volt jellemző az X03-as izolátumot kivéve, ami *116/116* genotípust mutatott (17/c ábra, 23. táblázat).

APH és G6PDH. A savas foszfátáz és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim mindegyik izolátumnál monomorfnek bizonyult az X03 kivételével. Az APH kettő, a G6PDH pedig három csíkot mutatva festődött. Az X03 minta gyengén festődő, elmosódó jelet adott mindkét enzimmel.

23. táblázat. Az izoenzimvizsgálat során felhasznált *P. halstedii* izolátumok jellemzése és multilokusz-fenotípus (MLP) besorolása

Izolátum kódja	Minta típus ^a	Gazdanövény ^b	Gyűjtés helye	Év ^c	Forrás ^d	Virulencia-fenotípus ^e	MLP ^f
911/C11	SSL	HA	Szerbia	1995	1	700	2
911/C12	SSL	HA	Szerbia	1995	1	100	2
Bi02/A4	SSL	HA	Magyarország	2000	1	100	2
Bi02/B6	SSL	HA	Magyarország	2000	1	100	2
98/A22	SSL	HA	Magyarország	1991	1	700	1
130/A21	SSL	HA	Magyarország	1991	1	700	1
130/B15	SSL	HA	Magyarország	1993	1	700	1
130/B20	SSL	HA	Magyarország	1993	1	700	1
29-13/F3	SSL	HA	Magyarország	1998	1	700	1
145/C9	SSL	HA	Magyarország	1994	1	710	1
145/C15	SSL	HA	Magyarország	1994	1	710	1
01/A2	FI	HA	Magyarország	2001	1	710	1
129	FI	HA	Magyarország	1991	1	730	1
101/C1	SSL	HA	Magyarország	1992	1	730	1
114/A10	SSL	HA	Magyarország	1998	1	330	1
61/D7	SSL	HA	Magyarország	1989	1	330	1
X02	FI	XS	Magyarország	2002	1	710	1
X03	FI	XS	Magyarország	2003	1	(717) CLI	4
X04	FI	XS	Magyarország	2004	1	710	1
IN/A7	SSL	HA	Franciaország	-	2	nt	1
IN/B5	SSL	HA	Franciaország	-	2	nt	1
IN/E22	SSL	HA	Franciaország	-	2	703	1
16/A14	SSL	HA	Franciaország	-	2	710	1
18	FI	HA	Franciaország	-	2	710	1
23/A23	SSL	HA	Franciaország	-	2	730	1
24	FI	HA	Franciaország	-	2	710	1
27	FI	HA	Franciaország	-	2	730	1
BL/A16	SSL	HA	Franciaország	-	2	730	1
LE/A1	SSL	HA	Németország	-	2	310	2
SCH/A6	SSL	HA	Németország	-	2	300	1
SCH/A22	SSL	HA	Németország	-	2	300	1
SCH/B10	SSL	HA	Németország	-	2	300	1
SCH/B18	SSL	HA	Németország	-	2	300	1
SCH/C4	SSL	HA	Németország	-	2	300	1
GG/A20	SSL	HA	Németország	-	2	310	1
GG/B8	SSL	HA	Németország	-	2	300	1
UN/B4	SSL	HA	Németország	-	2	nt	1
UN/B9	SSL	HA	Németország	-	2	730	1
KE/B11	SSL	HA	Németország	-	2	nt	1
KE/B13	SSL	HA	Németország	-	2	nt	1
HOLZ	FI	HA	Németország	-	2	730	1
GE/B12	SSL	HA	Németország	-	2	710	1
LAE	FI	HxL	Németország	-	2	nd	3
FAR/A23	SSL	HA	USA	-	2	710	1
FAR/A25	SSL	HA	USA	-	2	730	1

^a FI: szántóföldi izolátum, SSL: egysporangium-tenyészet; ^b HA: természetű napraforgó, XS: szerbtövis, HxL: *Helianthus × laetiflorus*; ^c -: nem ismert; ^d 1: Szent István Egyetem Növényvédelemtani Tanszék gyűjteménye, 2: Hohenheim Egyetem Botanikai Intézetének gyűjteménye; ^e nt: nem tesztelt, nd: nem detektálható; ^f MLP: multilokusz-fenotípus

4.3. Új tudományos eredmények

1. Elsőként bizonyítottuk, hogy a napraforgót a *P. halstedii* Farl. (Berl. et de Toni) mellett a szerbtövis kórokozójaként leírt *P. angustiterminalis* Novot. is fertőzheti, és azon ivaros és ivartalan úton egyaránt szaporodik. Másrészt megállapítottuk, hogy a szerbtövisen mind a *Plasmopara halstedii*, mind a *P. angustiterminalis* egyaránt előfordul.
2. Megállapítottuk, hogy a *Plasmopara halstedii* egysporangium-tenyészetek patotípusa a szántóföldi izolátumra jellemző kiindulási virulencia-fenotípushoz képest szegregálódtak.
3. Kimutattuk, hogy a *Plasmopara halstedii* ITS-mérete közel 2600 bázis hosszú, melynek oka az ITS2-régióban található többszörös inszerció. Megállapítottuk, hogy a *Plasmopara angustiterminalis* ITS-mérete 3225 bázis, mely a *Plasmopara halstedii*hez hasonlóan szintén az ITS2-régióban tartalmaz inszerciót, azonban ennek bázisösszetétele, valamint struktúrája eltér a *P. halstedii*re jellemzőktől.
4. Elsőként mutattuk ki a *P. halstedii*ben *Ty-copia* típusú retrotranszpozon elemet, mely LTR-régióját sikeresen alkalmaztuk inszerciók polimorfizmus vizsgálatára S-SAP módszerrel.
5. Elsőként vizsgáltuk a *P. halstedii* izoenzimintázatát cellulóz-acetát-gélelektroforézises (CAE) módszerrel, ami alapján négy multilokuszos fenotípuscsoportba soroltuk a mintákat. A módszerrel a kórokozó nagyfokú homozigotását támasztottuk alá.
6. Elsőként jellemeztük a szerbtövist fertőző *Plasmopara angustiterminalis* Novot. izolátumot molekuláris genetikai módszerek (ITS, iSSR, izoenzim) alkalmazásával.
7. Kimutattuk, hogy a szerbtövisről származó *Plasmopara angustiterminalis* Novot. izolátumok a hazai *P. halstedii*vel szemben rezisztens differenciáló vonalakat is fertőzik, azok sziklevelén sporulációra képesek. A közös gazdanövény lehetőséget teremthet a két faj közötti interspecifikus genetikai kölcsönhatásokra, valamint a populációk diverzitásának bővülésére.

5. MEGVITATÁS

5.1. A vizsgált *Plasmopara*-izolátumok fenotípusos változékonysága

5.1.1. Szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. morfológiai jellemzése

A fénymikroszkópos megfigyelések eltérést mutattak ki a napraforgóról és a szerbtövisről származó izolátumok között a sporangiummorfológia, a zoosporogenezis ideje és a sporangiumonként képződő rajzóspórák száma tekintetében. Novotelnova (1966) szerint a szerbtövist fertőző *Plasmopara* egy különálló faj, nevezetesen a *P. angustiterminalis*, melynek sporangiummérete $12\text{--}27 \times 9\text{--}18 \mu\text{m}$, ami viszont jóval kisebb az általunk mértéknél (átlagosan $41,1 \pm 7,8 \times 27,0 \pm 4,6 \mu\text{m}$). Ennek egyik magyarázata a kórokozó nagyfokú morfológiai változatosságában keresendő, hiszen a sporangium méretét befolyásolja az adott gazdanövény és annak kondíciója egyaránt. A méretet befolyásolja továbbá a sporuláló növényi rész is, a gyökér, a sziklevel, a hipokotil vagy a lomblevél felületén eltérő méretű sporangiumok alakulhatnak ki (Sackston, 1981a; Sakr et al., 2008). A sporangiumméret változatosságára hívja fel a figyelmet Sackston (1981a), mely alapján az általam vizsgált szerbtövisről származó izolátumot nem lehet egyértelműen elkülöníteni a többi *P. halstedii* mintától (3. táblázat).

A zoosporogenezis inkubációs ideje *P. halstedii* esetében 2–3 óra (Virányi és Oros, 1991; Spring et al., 1998), ellenben a szerbtövisről származó X03 izolátum esetében ez a folyamat 2–3-szor gyorsabb volt, alig egy órát vett igénybe. A rövid inkubációs idő az izolátum agresszivitását, fokozottabb életképességét jelzi, hiszen rövidebb ideig kell fennállnia a fertőzést elindító speciális körülményeknek. Valószínűleg a *Xanthium*ról származó izolátumnál tapasztalt gyors zoosporogenezis összefüggésbe hozható a sporangiumonként kialakuló kevés (átlagosan mindössze 6 db) rajzóspórával; ami kevesebb mint fele, a *P. halstedii*nél hasonló körülmények között fejlődő, átlagosan 15–20 db rajzóspórának (Virányi és Oros, 1991; Spring et al., 1998).

5.1.2. Szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. gazdanövénykörének vizsgálata

Szerbtövisről gyűjtött X03 jelű izolátummal csíranövényfertőzéses módszert alkalmazva sikeresen fertőztünk a GK-70 és a HAR-335 napraforgófajtákat. Az izolátum sporulált a napraforgó sziklevelén, a hipokotilon és a gyökéren egyaránt. Ez egyértelművé tette a kórokozó patogenitását a napraforgón. Mivel azonban a fertőzés sziklevelre korlátozódó maradt, vagyis a kórokozó nem

kolonizálta a másodlagos szöveteket, valamint elmaradt a tipikus levélklorózisos tünet, a vizsgált izolátum feltehetően nem azonos a napraforgó-peronoszpórával, a *Plasmopara halstedii*vel, alátámasztva Novotelnova (1963) morfológiai bélyegekre és gazdanövény-specifitásra alapozott véleményét.

Spring et al. (2003) egy *Helianthus* × *laetiflorus*ról származó *Plasmopara*-izolátumot mikroszkópi megfigyelésekkel, keresztfertőzéses kísérletekkel, zsírsavösszetétel-vizsgálattal és az LSU- (large ribosomal subunit) szekvencia elemzésével jellemzett. Ezek alapján a vizsgált izolátumot *P. halstedii* fajként azonosították és a 100-as patotípusba sorolták. Ugyanakkor a virulenciatesztben ez a *Helianthus* × *laetiflorus*ról származó izolátum lényegi eltérést mutatott a napraforgóról gyűjtött izolátumoktól. Bár a kérdéses izolátum nem sporulált a HA-265, HA-274, DM-2, HAR-4 és HAR-5 napraforgóvonalakon, a kórokozó micéliuma kimutatható volt ezekből a növényekből is, sőt a HAR-4 vonal esetében teljes csíranövény-pusztulást is tapasztaltak. A szerbtövisről és az évelő *Helianthus* × *laetiflorus*ról származó *Plasmopara*-izolátumok esetében tehát egyrészt megfigyelhetők a *P. halstedii* fajkomplexumra jellemző morfológiai bélyegek, másrészt viszont patogenitásban eltérést mutatnak a napraforgóról származó *Plasmopara*-izolátumoktól. Ez a jelenség is példa arra, hogy a gazdanövény-specializációval kezdődő szegregáció során lejátszódó genetikai folyamatok új változatok megjelenéséhez, esetleg egy új faj kialakulásához is vezethet.

5.1.3. Szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. zsírsavmintázata

Spring és Thines (2004) szerint a biotróf petespórák szervezetek esetében a klasszikus morfológiai és gazdanövénykör-vizsgálatokon túl további módszerek is szükségesek a faj azonosításhoz. Ilyen módszer lehet például a zsírsavösszetétel vizsgálata, amelynek segítségével szerbtövisről és napraforgóról származó izolátumok között sikerült különbséget kimutatni a sztearinsav (C18:0) és olajsav (C18:1) arányban. Másrészt viszont a *P. halstedii*re jellemző magas eikozapentaenoin-sav (C20:5) arány (Spring et Haas, 2002) mindkét izolátumban kimutatható volt, ami a két taxon közeli rokonságát támasztja alá.

5.1.4. Szerbtövisről származó *Plasmopara* sp. fungicidérzékenysége

A napraforgó peronoszpórák megbetegedésével szembeni védelem a rezisztens fajtákra, valamint a vetőmag metalaxilos csávázására épül (Horváth et al., 2005). Az új fajtabejelentéseknél

előírás a hazánkban található öt napraforgóperonoszpóra-patotípussal szembeni rezisztencia megléte. Mivel a szerbtövisről származó X03 izolátum sporulált olyan differenciáló vonalakon is, amelyek a *P. halstedii* hazai patotípusaival szemben rezisztensként viselkednek, így a természetben lévő fajták rezisztenciátulajdonsága ezzel az új virulencia-fenotípussal szemben nem ismert. A szerbtövisről származó X03 típusú izolátumok elleni védekezésben tehát csak a csávázásra lehet hagyatkozni. Az X03-as izolátum metalaxilérzékenység-vizsgálatát a teljes csíranövény bemártásos (WSI) módszerrel kellett végezni, mivel a kórokozó nem fertőzte sem a napraforgó valódi lomblevelét sem a sziklevel korongokat. A metalaxil azonban hatékonyan megvédte a HA-335-s vonal növényeit a fertőzéstől, sőt a metalaxillal kezelt növények hipokotilszövegeiben sem volt gombaképlet megfigyelhető. Így feltehető, hogy ez a 717 CLI virulenciatípus a napraforgó csávázása esetén nem fertőzi meg a természetben levő napraforgó föld alatti szöveteit. A korai fertőzés megakadályozásával, a patogenitási vizsgálataink alapján feltételezhetjük, hogy később másodlagosan már nem fertőzi a napraforgót. Állományban így elkerülhető a kétféle *Plasmopara*-izolátum együttes fertőzése, valamint evvel együtt az új virulenciakombinációk kialakulásának esélye is csökken. Azonban a táblaszegélyeken, illetve utak mentén vagy egyéb kultúrák gyomtársulásaiban az árvakelésű napraforgó és szerbtövis előfordulása lehetőséget teremthet a tulajdonságok rekombinációjára és egyben felveti a gyomszabályozás szükségességét is.

5.1.5. Egysporangium-előállítás

Az egysporangium-izolálás eredményességét alapvetően meghatározza az inokulum kora. Frissen nyert inokulummal nagyobb hatékonysággal lehetett egysporangium-vonalakat izolálni. Mivel idővel a sporangiumok életképessége csökkent, ennek látható jeleként egyre kevesebb sporangiumban fejlődött rajzospóra. Az egysporangium-vonal izolálása mirokapilláris és mikromanipulátor alkalmazásával nagyobb hatékonyságú (Spring et al., 1998), ami egyben lehetőséget ad egyetlen rajzospóra-tenyészet izolálására is. Érdekes azonban, hogy még ebben az esetben is csak mintegy 15%-ban alakul ki fertőzés. Ennek egyik oka lehet, hogy a sejtfal nélküli rajzospórák rendkívül érzékenyek a környezet ozmotikus viszonyaira, fizikai hatásokra, vagy akár a mikroszkóplámpa által leadott hőre.

A szerbtövisről származó izolátum metalaxilérzékenységének tesztelése során bebizonyosodott, hogy az X03 izolátum nem fertőzte meg sem a napraforgó szikleveléből sem a valódi lombleveléből kivágott levélkorongokat. Így ebből az izolátumból lehetetlenné vált a Spring et al. (1998) féle szikleveledarabokon felszaporított egysporangium-izolálási módszer alkalmazása a

tiszta tenyészetek előállításához. Végül a teljes csíranövény fertőzéses módszert kellett alkalmazni, ami körülményes, nagyobb helyigényű, és több időt vesz igénybe, azonban a sikeressége összemérhető volt a levélszegmensek fertőzésénél tapasztaltakkal.

5.1.6. Virulencia-fenotípusok változékonysága

A kísérletekbe vont, napraforgóról származó, magyarországi gyűjtésű *P. halstedii* szántóföldi izolátumok egysporangium-vonalai a szülői, azaz kiindulási izolátum virulenciakaraktere mellett, attól eltérő típusokat is tartalmaztak, sőt hazánkban eddig szántóföldön nem izolált virulencia-fenotípust is azonosítottam. Molinero-Ruiz et al. (2002) spanyolországi izolátumok egysporangium-tenyészetének virulenciavizsgálatakor hasonló jelenséget tapasztalt. Ezen eredmények értelmében úgy tűnik, hogy egyes szántóföldi izolátumok kevert mikropopulációnak tekinthetők virulencia-fenotípus szempontjából (24. táblázat).

24. táblázat. *P. halstedii* szántóföldi izolátumaiból izolált egysporangium-tenyészetek virulencia-fenotípus változékonysága.

Izolátum	Egysporangiumok száma	Virulencia-fenotípus
Bi02	3	100
	1	300
911	1	100
	1	300
	1	330
	1	730
130	5	700
	1	710
98	1	700
	7	700
29-13	2	710
	3	710
145	2	700
	1	710
101	1	730
	2	700
114	2	330
	6	330
61	1	730

A *Xanthium strumarium* (szerbtövis) Magyarországon elterjedt gyomnövény, gyakran megtalálható a napraforgótáblákban és azok szegélyében egyaránt. Az általunk vizsgált X02, X03 és X04 izolátumok is napraforgótábla szegélyében növő szerbtövisről származtak 2002-ből, 2003-ból és 2004-ből. A *Xanthium strumarium*ot fertőző *Plasmopara* elterjedtségére utal, hogy Kelet-Ausztriában is megfigyeltek szerbtövisen hasonló fertőzést (Voglmayr, et al., 2004), a kórokozót pedig morfológiai alapon *P. angustiterminalis* Novot.-ként határozták meg, azonban az ott izolált kórokozó patológiai vizsgálatáról nincs ismeretünk.

Az általunk jellemzett szerbtövisről származó X03 izolátum megfertőzte a termesztett napraforgót, azonban fertőzőképessége csak a primer szövetekre korlátozódott, még a *P. halstedii*-vel szemben semmilyen ismert rezisztenciagént sem tartalmazó HA-304 vonal esetében is. Az X03 izolátum a többi fogékony differenciáló vonalat (RHA-265, RHA-274, DM2, HAR-4, HAR-5, HA-335) sem fertőzte szisztemikusan, azaz a fertőzés mindvégig sziklevélre korlátozódó maradt. Az eddig jellemzett *P. halstedii* izolátumok között eddig nem azonosítottak ehhez hasonló, 717 (CLI) virulenciakaraktert. Maga a gyökér-hipokotil-sziklevél régióra korlátozódó CLI típusú rezisztencia régóta ismert a szakirodalomból (Cohen és Sackston, 1973), és gyakori jelenség adott izolátum – genotípus kombinációban.

A CLI típusú fertőzés vizsgálata során Virányi (1978), Mouzeyar et al. (1993) és Heller et al. (1997) is megállapította, hogy a kórokozó nem képes kolonizálni a növény másodlagos szöveteit, viszont életben marad a fertőzött növényi részekben és képes ott ivaros és ivartalan szaporodásra is. A virulencia-fenotípus megállapítására végzett fertőzési kísérletben a tesztelt kilenc genotípus közül az X03 izolátum hét vonalon bizonyult patogénnek, a PM-17 és 803-1 vonalakon viszont nem. Tehát a jelenleg köztermesztésben lévő napraforgóhibridekben található rezisztenciagének közül mindössze a PM-17 és a 803-1 vonalak rezisztenciafaktorai hatékonyak az X03 izolátum csírákori fertőzésével szemben. Azonban az a tény, hogy az X03 izolátummal szemben a differenciáló sor minden eleme rendelkezik egy általános rezisztenciafaktorral a másodlagos fertőzésekkel szemben, felveti annak a lehetőségét, hogy ez az izolátum esetleg mégsem tartozik a *P. halstedii* fajba. Így Novotelnova (1966) korábbi megfigyeléseinek megfelelően az X03-as izolátumot valójában eredeti gazdanövénye alapján, egy másik fajba, a *P. angustiterminalis* Novot.-ba kellene sorolni úgy, mint Voglmayr et al. (2004) tette a szerbtövisen talált *Plasmopara* sp. esetében; bár azt a megfigyelést patológiai vizsgálatok nem támasztották alá.

Habár napraforgóról 717 CLI virulencia-fenotípust mutató izolátumot még nem izoláltak (Gulya, 2007), laboratóriumi vizsgálataink egyértelműen bizonyították, hogy a *Xanthium*ról származó izolátum képes megfertőzni a termesztett napraforgót, így előfordulhat az is, hogy szántóföldi körülmények között kialakul a napraforgó kevert fertőzése, és az ismert

rezisztenciagének többségére nézve virulens utód jön létre. Továbbá az sem kizárt, hogy a napraforgót együttesen fertőző *P. angustiterminalis* a *P. halstedii*vel aszexuális rekombináció, esetleg hibridizáció révén új virulencia-fenotípust képviselő természetes fajhibridet hoz létre. A természetes fajhibridek kialakulása közismert jelenség a rokon *Phytophthora*-fajok között, ami akár a gazdanövénykör megváltozását is eredményezheti (Brasier et al., 1995; Man in 't Veld et al., 1998; Bonants et al., 2000). Érsek et al. (1995) két, közel rokon *Phytophthora*-fajnál, interspecifikus zoospóra-fúziót követően az utódok gazdanövénykör bővülését tapasztalta a szülői izolátumokhoz képest. Spring és Zipper (2006) a *P. halstedii* virulenciafaktorainak aszexuális intraspecifikus rekombinációját figyelte meg laboratóriumi körülmények között, kétféle patotípus együttes fertőzését követően.

5.2. Nukleinsav és fehérje alapú vizsgálatok

5.2.1. RAPD-analízis

A RAPD-módszer alkalmazása megteremtette hazánkban a *P. halstedii* molekuláris vizsgálatához is szükséges feltételeket, és ezáltal lehetővé vált a kórokozó változékonyságának molekuláris szintű tanulmányozása, valamint további polimorfizmust vizsgáló módszerek kivitelezése. A magyarországi izolátumok RAPD-vizsgálata során tapasztalt alacsony szintű polimorfizmus hasonló eredményt mutatott a már korábban, franciaországi izolátumok vizsgálata során publikált (Roedel-Drevet et al., 1997) adatokkal. Szintén alacsony szintű polimorfizmusról, 80-100%-os hasonlóságról számolt be Tourvieille et al. (2000) és Roedel-Drevet et al. (2003) a világ különböző napraforgó-termőhelyeiről származó izolátumok esetében is. Bár a RAPD-vizsgálat nem vezetett a várt eredményre, azaz a kapott polimorfizmus nem alkalmas a patotípusok elkülönítésére, betekintést kaphattunk a hazai napraforgó-peronoszpóra populációjának molekuláris változékonyságába a hazánkban megtalálható virulencia-fenotípusok vizsgálata során.

Tíz hazai izolátum RAPD-mintázata alapján végzett multidimenziós SPSS (Statistical Package for Social Sciences) statisztikai program alkalmazásával elkülönített négy fő csoport virulencia-összetétele több jellegzetességet mutatott. Az első csoportban a 100-as, az eredeti európai patotípus kivételével mindegyik hazánkban előforduló virulenciatípust képviselő izolátum jelen volt, ami felveti az új patotípusok nagyfokú genetikai hasonlóságát, melyek elkülönültek a kórokozó eredeti változatától, a 100-as patotípustól. A második csoportba tartozó izolátumok a 100-as és a 700-as patotípus közeli rokonságára utalhatnak. Érdekes azonban, hogy míg hazánkban a 700-as a

leggyakoribb patotípus, addig ez a patotípus például Németországban ritka, és csak az utóbbi években jelent meg (Gulya, 2007). A harmadik csoport a 330 és 730-as patotípus közeli rokonságát mutatja, melyek mindössze egy differenciáló vonalon adott reakcióban térnek el egymástól. Közös jellemzőjük még az is, hogy hazánkban e két patotípus előfordulása napjainkban viszonylag ritka (Virányi F., szóbeli közlés). A negyedik, önálló csoportot alkotó, 2001-ben izolált 100-as patotípus elkülönül a többi, 2000 előtt gyűjtött mintáktól, ami utalhat a kórokozó újbóli betelepülésére, esetleg behurcolására. Ezt a feltételezést alátámasztja az a megfigyelés is, miszerint az új patotípusok megjelenését követő izolálások között tisztán 100-as patotípusú izolátum hazánkban nem fordult elő az utóbbi években. A napraforgó-peronoszpóra franciaországi populációjának molekuláris vizsgálatakor Delmotte et al. (2008) szintén adott patotípusok többszöri betelepülését vetette fel.

5.2.2. iSSR-analízis

Először vizsgáltuk nem napraforgóról származó *Plasmopara*-izolátumok genetikai variabilitását iSSR-módszerrel. Míg a napraforgóról származó izolátumokra alacsony genetikai variabilitás jellemző, és patotípusra utaló jellegzetes mintázatot sem lehetett felfedezni, a különböző gazdanövényekről származó izolátumok statisztikailag elkülöníthetővé, azonosíthatóvá váltak az iSSR-módszerrel. Ugyanakkor a napraforgóról származó izolátumok között, korábbi eredményekhez hasonlóan (Intelmann és Spring, 2002; Roeckel-Drevet et al., 2003), találtunk egyedi izolátumokra jellemző mintázatokat, amelyek szántóföldi alpopulációk nyomon követésére lehetnek alkalmasak.

A vizsgált tízféle patotípus között virulencia-fenotípusra utaló marker nem volt kimutatható. Az általunk vizsgált négy metalaxiltoleráns izolátum sem különült el a metalaxilra érzékeny izolátumoktól. Ezen eredmények tükrében feltehető, hogy a virulencia megváltozásához hasonlóan a metalaxiltolerancia kialakulása is valószínűleg véletlenszerűen következik be. Amennyiben a virulencia megváltozása lehet egyetlen pontmutáció következménye (Knogge, 1996), talán a metalaxiltolerancia kialakulása is magyarázható hasonló alapon. Eredményeink azt mindenképpen alátámasztják, hogy a metalaxilérzékenységben történt változás nem okozott ezen a szinten kimutatható különbségeket a kórokozó populációban.

Az alternatív gazdanövényekről származó izolátumok közül a szerbtövisről gyűjtött X03 és ennek klónja, az X/21 egyaránt 717 (CLI) patotípusúnak mutatkozott, míg az X04 izolátum a napraforgóról gyűjtött izolátumokhoz hasonló tulajdonságokat mutatott a napraforgón

és 710-es patotípusúnak bizonyult. Az X04-es izolátum *P. halstedii*-jellegét az izolátum iSSR-mintázata is alátámasztotta. Az X04-es izolátum viselkedése alátámasztja Virányi (1984) megfigyelését, mely szerint a szerbtövis természetes gazdanövénye a termesztett és számos élő napraforgót fertőző *Plasmopara halstedii* fajnak. Mindeközben az X03 izolátum patológiai sajátosságai és iSSR-mintázata is Novotelnova (1966) azon nézetét támasztja alá, mely szerint a szerbtövist támadó *Plasmopara*-faj nem azonos a napraforgót fertőző *P. halstedii*vel, és *P. angustiterminalis* Novot. néven új fajként azonosította. Saját eredményeink és korábbi tapasztalatok (Virányi, 1984; Novotelnova, 1966) alapján feltételezhető, hogy a *X. strumarium*on nem egy, hanem két *Plasmopara*-faj is fertőzhet.

Az iSSR-módszerrel kimutatható molekuláris változékonyság mértéke a gazdanövény-specializáció megjelenésére utal a *Plasmopara halstedii* fajkomplexumon belül, megerősítve Savulescu (1941) és Novotelnova (1966) korábbi taxonómiai megfigyeléseit. A *Helianthus* × *laetiflorus*ról származó (LAE) izolátumra jellemző egyedi mintázat is megerősíti a módszer alkalmasságát a gazdanövény-specializáció kimutatására még olyan esetben is, amikor a kérdéses izolátumot korábban (Spring et al., 2003) *P. halstedii*nek azonosították. A fajon belüli gazdanövény-specializáció agronómiai, illetve patológiai sajátosságainak tisztázása, valamint ennek jelentősége további vizsgálatokat igényel.

5.2.3. LTR-retrotranszpozon izolálása *P. halstedii*ből és S-SAP-analízise

A *P. halstedii*ben kimutatható a *Ty1*-copia típusú LTR-retrotranszpozon jelenléte. A retrotranszpozont nyolc egymást követő lépésben feltérképeztem, és Tph-nak neveztem el. A retrotranszpozon megismerése során, adott szakaszokon belül (A-G-ig, 14. ábra) kettő-hat klón bázissorrendjét is meghatároztam, melyek egymással nagyfokú hasonlóságot mutattak ugyan, de nem voltak azonosnak tekinthetőek. Miután a retrotranszpozonok több kópiában is megtalálhatóak a genomban (Flavell et al., 1992), és a vizsgálat során teljes genomi DNS-t használtam, a kapott szekvenciák valószínűleg különböző retrotranszpozonokról készülhettek. A megismert szakaszok konzervatív régióinak összeillesztése által egy közel 4300 bp hosszúságú szakaszt kaptam, ami méretében hasonlatos az ismert *Ty1*-copia típusú retrotranszpozonokhoz (Pelsy és Merdinoglu, 2002). Az általam izolált szakaszon szintén felismerhető volt az 3'LTR-régiót megelőző, jellegzetes PPT (poly purin track) -szakasz és az ezt követő LTR-régió (25. táblázat), melyet egy TG motívum indít és egy CA szakasz zár le.

25. táblázat. *P. halstedii*-ből származó Tph és ismert LTR-retrotranszpozonok PPT- (Poly Purine Track) szekvenciái irodalmi adatok alapján. Pyggy, (Taylor et al., 2001), Skippy, (Anaya és Roncero, 1995), Maggy, (Farman et al., 1996), REAL, (Kaneko et al., 2000) és CFT-1, (McHale et al., 1992).

Retrotranszpozon neve/gazdaszervezet	PPT		LTR
Tph (<i>Plasmopara halstedii</i>)	GAGGGGAAG	TAT	tgaaga
Pyggy (<i>Pyrenophora graminea</i>)	AAGAAGGGGAGGGAGAAGGGGGG	TAT	tgtaat
Skippy (<i>Fusarium oxysporum</i>)	GGAGGGGAGAGA	TCG	tggtac
Maggy (<i>Magnaporthe grisea</i>)	GGAAGGGGGAA	TAC	tgtcac
REAL (<i>Alternaria alternata</i>)	AAGGAGGGGGG	TAT	tgtaac
CFT-1 (<i>Cladosporium fulvum</i>)	AGAGAGGG GA	TGG	tggtac

A kromoszómasétálás-módszer alkalmasnak bizonyult arra, hogy egy 230 bázis hosszúságú reverz traszkriptáz-génszakaszból kiindulva fajspecifikus LTR-régiót határozzak meg további inszerciós polimorfizmus vizsgálatokhoz, az S-SAP-módszerhez.

A retrotranszpozonok értékes markerként szolgálnak a genom alakulásának, fejlődésének megismeréséhez (Flavell et al., 1992; Ellis et al., 1998). A retrotranszpozonok inszerciós polimorfizmusának következtében az S-SAP-módszer a fajon belüli variabilitás vizsgálatára is alkalmas (Waugh et al., 1997). Az így kapott reakciótermékek további szekvenciavizsgálata alkalmat adhat funkcionális régiók, működő gének irányított megismerésére, hiszen a retrotranszpozonok jellemzően a genom aktív régióiba épülnek be (Flavell et al., 1992; White et al., 1994).

Az S-SAP-módszer alapján a *P. halstedii* egysporangium-izolátumok a gyűjtési helyük szerint csoportokra voltak elkülöníthetők, az iSSR-módszerrel (Intelmann és Spring, 2002) kapott eredményekhez hasonlóan. Viszont az S-SAP-módszer eredményei alapján a szántóföldi eredetre utaló csoportosítás az izolátumok sokkal szélesebb körében volt megfigyelhető, mint az iSSR-módszer esetében, ahol ez a jelenség csak néhány izolátumra volt jellemző. Az S-SAP-próbával bár kevesebb termék képződött az iSSR módszernél megfigyeltékhez képest, a termékek jól reprodukálhatónak és alkalmasnak bizonyultak az izolátumok csoportosítására. Mind az S-SAP-, mind az iSSR-módszer hasonló eredményre vezetett, aminek egyik oka az lehet, hogy az iSSR-módszer szintén a genomban ismétlődő, repetitív elemek polimorfizmusán alapszik. A molekuláris polimorfizmus kereséséhez használt módszerek közül a RAPD adta a legkevésbé polimorf mintázatot a vizsgált izolátumok körében.

Az S-SAP-módszerrel igazolható volt a Tph *Ty1-copia* típusú retrotranszpozon jelenléte a nem napraforgóról származó izolátumok körében is, ami alátámasztja az eltérő gazdanövényről származó izolátumok közeli rokonságát. Ha azt is figyelembe vesszük, hogy az LTR-régiók fajspecifikusnak tekinthetők, akkor kimondhatjuk, hogy ezek az izolátumok valószínűleg a gazdanövény-specializáció során távolodhattak el egymástól.

5.2.4. Izoenzimvizsgálat

A *P. halstedii* egy diploid homotalliás szervezet, életciklusában mind az ivaros, mind az ivartalan szakasz rendszeresen előfordul (Sackston, 1981a; Spring és Zipper, 2000). A folyamatos rekombináció, illetve a számtalan utód megfelelő forrásként szolgálhat a változatos patotípusok, valamint a csökkent növényvédőszer-érzékenységű törzsek kialakulásához egyaránt. Felmerül a kérdés, vajon ez a nagymértékű változékonyság hogyan követhető nyomon a helyi populációk monitorozásával? Ennek tradicionális módszere a fenotipikus jellegek vizsgálata, mint például a virulenciakarakter meghatározása (Gulya et al., 1998; Tourvieille et al., 2000a) vagy a fungicidtolerancia vizsgálata (Gulya, 2000). Mindezekén túl számos törekvés történt a kórokozó molekuláris változékonyságának megfigyelésére. Nukleinsav szintű polimorfizmusvizsgálat RAPD- és iSSR-módszerekkel alacsony szintű polimorfizmust mutatott ki a különféle földrajzi eredetű minták között (Roedel-Drevet et al., 1997 és 2003; Tourvieille et al., 2000b; Intelmann és Spring, 2002; Komjáti et al., 2004). Spring et al. (2006a) összefüggést vélt felfedezni az ITS- és a virulenciajellemzők között. Habár ezek a vizsgálatok számos adattal szolgáltak, a kórokozónál tapasztalt genetikai variabilitás kimutatására és a fajon belüli változatok azonosítására nem bizonyultak eléggé informatívnak.

A *P. halstedii*vel közeli rokonságban álló *Phytophthora infestans* biológiájának és populációdinamikai jellemzésének egyik eszköze az izoenzimvizsgálat, mely egységesített módszertana következtében az adatok nemzetközi összehasonlítását is lehetővé teszi (Cooke és Lees, 2004). A *P. halstedii* populációját eddig ezzel a módszerrel nem vizsgálták.

Esetünkben az izoenzimintázat kimutatásának egyik sarkalatos pontja a vizsgálat kivitelezéséhez szükséges minta mennyiségének meghatározása volt. A kórokozó obligát biotróf jellegéből következően csak a gazdanövényében szaporítható, ezért genetikai vizsgálatokhoz kizárólag kis mintamennyiséggel elvégezhető módszerek jöhettek számításba. A CAE-módszer nagy előnye a reakciónkénti kis (31–100 µg) mintamennyiség esetében tapasztalható jó felbontóképesség (Hebert és Beaton, 1993).

Kísérleti körülményeink között a CAE-módszerrel történő vizsgálat alkalmasnak bizonyult a sporangiumból és sporangiumtartóból kinyerhető izoenzimintázat analízisére. Ez összhangban van Goodwin et al. (1995) megállapításával, miszerint a CAE-módszer alkalmas a *P. infestans* sporangiumából kinyerhető izoenzim változékonyságának kimutatására. Az izoenzimvizsgálatok további előnye a nukleinsav alapú vizsgálatokkal szemben, hogy viszonylag egyszerűen kivitelezhető, könnyen értékelhető és a különböző laboratóriumok között is összevethető adatokkal szolgál. Míg a fitoftóráknál nagyfokú polimorfizmust mutattak ki peptidáz (PEP) enzimmel (Goodwin et al., 1995), a *P. halstedii* esetében a peptidázok például gyengén festődtek és az eredményeket sem lehetett megbízhatóan reprodukálni (21. táblázat). Így a *Plasmopara* vizsgálatához a *Phytophthora*hoz képest további enzimreakciók tesztelése is szükségessé vált. A vizsgált enzimek közül végül öt mutatkozott hasznosnak az összehasonlításokhoz, bár az allelikus eltéréseket mutató PGM, MDH és IDH genotípusok nem voltak összefüggésbe hozhatók a kórokozó patotípusaival. A jövőben, a különböző kutatóhelyekről származó izoenzimvizsgálatok eredményeinek összehasonlíthatósága végett standard izolátumok bevezetése és használata lenne szükséges.

Az izoenzimanalízissel nyert adatok előnye, hogy kodominánsak, azaz alkalmasak populációgenetikai vizsgálatokra. A *P. halstedii* diploid, homotalliás jellegéből adódik, hogy az ivaros szaporodás során kialakuló utódra a nagyfokú homozigótaság jellemző (Sackston, 1981a; Spring és Zipper, 2000). És valóban, az általunk vizsgált izolátumok –eredettől függetlenül– izoenzimintázat alapján homogénnek bizonyultak. Az európai és amerikai eredetű minták 84%-a egyetlen MLP típusba tartozott. Ez a megfigyelés összhangban áll a szintén alacsony polimorfizmust kimutató nukleinsav alapú vizsgálati módszerek eredményével (Roedel-Drevet et al., 1997; Tourvieille et al., 2000b; Intelmann és Spring, 2002; Roedel-Drevet et al., 2003; Komjáti et al., 2004, Giresse et al., 2007).

A *Plasmopara*-nemzetségen belül a fajok azonosításához, valamint a *P. halstedii* fajkomplexum további taxonokra osztásához nem állnak rendelkezésünkre megfelelő morfológiai markerek (Sackston, 1981a), ezért az izoenzimvizsgálatok során a napraforgóról gyűjtött izolátumokon kívül a szerbtövisről és a *Helianthus* × *laetiflorus*ról származó izolátumokat is felhasználtam. Az egyetlen izolátum, amely az MLP3-as csoportot alkotta, a *Helianthus* × *laetiflorus*ról származott, ez az izolátum a napraforgóról származó izolátumoktól mindössze az MDH-2 lokuszban mutatott különbséget, alátámasztva az LAE-izolátum közeli rokonságát a *P. halstedii*vel, továbbá ez az eredmény összhangban van Spring et al. (2003) ezen izolátumra vonatkozó megállapításaival.

Érdekes módon a szerbtövisről izolált, majd napraforgón fenntartott két izolátum (X02 és X04) elektroforetikus jellemzői nem tértek el a többi, napraforgóról származó izolátumtól, mindkettő az MLP1-be tartozott. Azonban egy másik, szintén szerbtövisről gyűjtött izolátum, az X03, ami a napraforgót csak CLI típusúan fertőzi, azaz csak a gyökér, hipokotil és sziklevel régióban szisztemizálódik (Vear, 1978; Virányi, 1978), egy teljesen egyedi, MLP4-es mintázatot mutatott. A szerbtövisről származó izolátumok közötti különbség arra enged következtetni, hogy a *Xanthium strumarium* két *Plasmopara*-fajnak is gazdanövénye lehet, a napraforgót fertőző MLP1-es típusnak és egy másik, elsősorban szerbtövésre specializálódott típusnak (MLP4), amely bár csökkent mértékben, de a napraforgón is patogén. Ez az eredmény, igaz csak részben, alátámasztja Novotelnova (1966) véleményét, aki szerint a *P. halstedii* természetett napraforgóra, illetve más rokon növényekre specializálódott változatai önálló fajokként különülnek el. A kérdés eldöntésére további izolátumok gazdanövénykörü és molekuláris vizsgálatára lenne szükség. Ennek ellenére, az izoenzimanalízis alkalmas lehet a magyarországi és külföldi *P. halstedii* populációk további összehasonlító vizsgálatára, a populáción belüli változások észlelésére és nyomon követésére, valamint a *gene-flow*ként ismert jelenség tanulmányozására.

5.2.5. A *Plasmopara halstedii* ITS-régiójának meghatározása

Az ismétlődő genetikai elemek közül filogenetikai vizsgálatokra és fajon belüli taxonok elkülönítésére alkalmazható az rDNS, azaz a riboszómális DNS ún. ITS (Internal Transcribed Spacer) és IGS (InterGenic Spacer) régióinak szekvenciavizsgálata (White et al., 1990). A *P. halstedii* ITS-régiójára tervezett PCR-módszer egy kb. 2600 bp hosszúságú szekvenciát eredményezett, ami jelentősen meghaladta a *Peronosporales* rendbe tartozó kórokozókra jellemző 900 bázispár méretű szakaszok hosszúságát (Voglmayr, 2003).

Mivel a jelenleg használatos szekvenáló módszerekkel a bázissorrend mindössze 500-700 bp hosszúságban olvasható megbízhatóan, a teljes ITS-régió bázissorrendjének meghatározáshoz kiegészítő primerekre volt szükség. Azonban a *P. halstedii* részleges ITS-szekvenciaadatai alapján Bachofer (2004) szerint a régió ismétlődéseket tartalmaz, ezért belső, szekvenáló primer tervezése nem tűnt megbízható módszernek a teljes szakasz megismeréséhez. A kérdéses fragmentum szekvenálható méretű egységekre darabolása már lehetővé tette a teljes ITS-régió megismerését, és rávilágított a szokatlanul hosszú ITS-szekvencia kialakulásának okára.

Thines (2007) szerint a *Peronosporales* rend fajaira általánosan jellemző az ITS2-régióban kimutatható, hosszúságra és összetételre nézve nagy változatosságot mutató ismétlődő szakaszok

jelenléte, azonban ezek gyakorlati jelentőségét nem ismerjük. A *P. halstedii* ITS-régiójában megismert ismétlődő szakaszok száma és változatossága jelentőséggel bírhat a populációgenetikai vizsgálatokban, valamint a *Plasmopara halstedii* fajkomplexum megismerésében is segítségünkre lehet. Például, Spring et al. (2006a) tizenöt napraforgó-peronoszpóra izolátum ITS-régiójának részleges vizsgálata alapján alacsony szintű variabilitást mutatott ki a 100, 330, 310 patotípusokba tartozó izolátumok körében, továbbá ezek elkülönültek a többi patatotípusba sorolt izolátumtól. A vizsgált ITS-régióban teljesen azonos nukleotidszekvencia jellemezte a 700, 701, 703, 710, 730-as patotípusokat, és felvetette a csoportba tartozó patotípusok közelmúltbeli kialakulásának lehetőségét (Spring et al., 2006a).

5.2.6. *Xanthium*ról származó izolátum ITS- és LSU-régiójának jellemzése

Vizsgálatunk során az X03 izolátum ITS-régiójának felszaporítása 3225 bázis hosszúságú terméket eredményezett, míg a közeli rokonságban álló *Peronospora*- és *Phytophthora*-fajok ITS-régiója ezzel szemben mindössze 700-800 bázis között változik (Cooke et al., 2002), tehát a kapott ITS-szekvencia hossza 3–400%-ban haladta meg a várt méretet, és nagyobbak bizonyult a napraforgóról származó izolátumok 2587 bp hosszúságú ITS-énél is (Thines et al., 2005). Mivel a napraforgóról származó izolátum ITS-régiója ismétlődő inszerciókat tartalmaz, felmerült annak a lehetősége, hogy a kétféle gazdanövényről származó izolátum méretbeli különbségét az inszerciók számában mutatkozó eltérés idézi elő. A kétféle ITS-szekvencia restriktív enzimekkel történő összehasonlításakor tapasztalt különbségek azonban a két minta nagyfokú genetikai eltérésére utalt, és felvetette az X03-szekvencia strukturális különbözőségét is.

A teljes ITS- (3190bp) szekvencia mérete 20%-al haladta meg az eddig ismert *Plasmopara* nemzetségbe tartozó fajok ITS-méretét (Spring et al., 2006a; Voglmayr et al., 2006). Szekvenciaanalízis során nyilvánvalóvá vált, hogy a *P. halstedii* napraforgóról származó izolátumával az ITS1-régió (1–218 bázis) 92,7%-ban mutat hasonlóságot, a konzervatív 5,8S-régió (219–374 bázis) 100%-ban megegyezik, míg az ITS2-régió kezdeti 76 bázisa (375–450 bázis) 92,1% -os hasonlóságot mutat. Az X03 esetében is repetitív elemeket lehetett felfedezni az ITS2-régió 2815 bázis hosszúságú szakaszában a *P. halstedii* faj ITS2-régiójához hasonlóan. A két izolátum ismétlődései bár hasonlóak, nem tekinthetők azonosnak, azonban értelmezésük szubjektív, hiszen Thines (2007) 14, egyenként kb. 180 bp hosszúságú repetitív elemet azonosított, amire két konzervatív szakasz (TCGGCGA és TGAACCGTAG) jellemző az egyébként változatos régió belül. Ezek a szakaszok homológiát mutatnak a *P. halstedii* mellett más peronoszporafajok

megfelelő szakaszaival is (Thines, 2007), ahol a repetitív régióról képződő RNS-ek másodlagos szerkezete valószínűleg hosszú harpinokat képez, de ezeknek mind a kialakulása mind a funkciója egyelőre ismeretlen (Thines, 2007). Más megközelítésben azonban az ITS2-régió öt teljes, kb. 350 bázis hosszúságú és egy fél repetitív elemet tartalmaz, melyek egymáshoz 76,2–98,9%-ban hasonlítanak és a genomban található más repetitív elemekhez hasonló funkciót tölthetnek be. Az, hogy ezeknek az átíródó, de a riboszóma felépítéséből kimaradó RNS-daraboknak mi lehet a szerepe, milyen további érési folyamaton mehetnek keresztül, további vizsgálatokat igényel. Így aztán azt is nehéz egyértelműen kijelenteni, hol kell funkcionálisan meghúzni a határt az ismétlések számát vagy hosszát illetően.

Rokon fajok ITS-régióinak összehasonlítása során a filogenetikai elemzéshez csak a fajok között konzervatívnak tekinthető, mintegy 610 bázis hosszúságú szakasz lett felhasználva, hogy a számításokat az inszerciók, illetve deléciók ne torzítsák el (Mitchell és Zuccaro, 2006). Az X03 izolátum ITS alapú filogenetikai vizsgálata megerősítette a Spring et al. (2003) által *Xanthium strumarium*-ról gyűjtött *Plasmopara*-izolátum LSU-analízise során kapott eredményeket, mely szerint közeli rokonság áll fenn a kétféle izolátum között, de ezek faji szinten nem tekinthetők azonosnak. Ezt a megállapítást tükrözte az iSSR-vizsgálat alapján végzett molekuláris filogenetikai elemzés is, mely élesen elkülönítette az egyik szerbtövisről származó *Plasmopara*-fajt a *P. halstedii* fajtól. Az ITS-szekvencia elemzése így genetikai szinten nyújtott segítséget a faji hovatartozás problémakörének feloldására a kétféle gazdanövényről származó izolátum esetében, továbbá részben magyarázatul szolgált a vizsgálatok során tapasztalt patológiai különbségek hátterére.

Az általam vizsgált X03 izolátum genomi nagy riboszómális alegysége D1/D2/D3-régiójának szekvenciája 100%-ban egyezett egy Ausztriában, *Xanthium*-ról gyűjtött izolátum megfelelő szakaszával (AY178535) (Spring et al., 2003). A napraforgót is fertőző, szerbtövisről gyűjtött magyarországi X03 izolátum és osztrák izolátum a részleges LSU szekvencia analízise alapján azonosnak tekinthető, és egyben felhívja a figyelmet a kórokozó szélesebb körű előfordulására is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Hazánkban a napraforgó-termesztés során fellépő betegségek közül jelentős termés kiesést idézhet elő a *Plasmopara halstedii*, a napraforgó-peronoszpóra. A kórokozó az 1940-es évekre tehető európai elterjedését követően hosszú ideig patológiailag egységes volt, majd az elmúlt három évtized alatt az egységes populációban különböző virulenciafaktorokat tartalmazó változatok jelentek meg. A populáció virulencia-fenotípus összetételének nyomon követéséhez a nemzetközi egyezményen alapuló, differenciáló fajtasorra történő fertőzés ad lehetőséget. Az értékelés ezen differenciáló vonalak fertőzésre adott válaszain alapszik, ez azonban idő-, hely- és munkaigényes. A szakirodalomból ismert, és ezt hazai tapasztalatok is megerősítik, hogy a napraforgó mellett más fészkes virágú növényeket is fertőz a *P. halstedii*. Így például a szerbtövisen (*Xanthium strumarium* L.) megjelenő kórokozó fertőzési forrásként szolgál a közeli napraforgók számára. Munkám során célul tűztem ki a napraforgón és szerbtövisen előforduló peronoszpórapopulációk változékonyságának tanulmányozását, morfológiai, patológiai és molekuláris genetikai jellemzését.

Munkám kiinduló pontjaként meghatároztam a hazánkban napraforgóról és szerbtövisről gyűjtött *Plasmopara halstedii* izolátumok patotípusát. Ezt követően mindkét növényről származó izolátumokból egysporangium-tenyészeteket állítottam elő, és meghatároztam ezek legfontosabb fenotípusos jellemzőit (sporangiumméret, rajzospóra-kirajzás időtartama, virulenciakarakter, zsírsavösszetétel, metalaxilérzékenység). A hazai izolátumok mellett külföldi izolátumokat is bevontam a kísérletekbe, melyek során polimorfizmusvizsgálatokat végeztem a rendelkezésre álló virulencia-fenotípusok, illetve szubpopulációk körében. A nukleinsav alapú módszerek közül RAPD- és iSSR-analízist, ITS-szekvenciameghatározást, valamint LSU- (Large Ribosomal Subunit) szakaszok összehasonlító elemzését végeztem, és *Ty-copia* típusú retrotranszpozont izoláltam S-SAP- (Sequence Specific Amplified Polymorphism) vizsgálathoz. Végül izoenzimanalízist végeztem az intraspecifikus változékonyság nyomon követésére.

Megállapítottam, hogy a *Plasmopara halstedii* szántóföldi izolátumaiból nyert egysporangium-tenyészetek virulencia-fenotípus szempontjából szegregálódtak, azaz a kiindulási populációra jellemző virulenciakaraktertől eltérő klónokat is eredményeztek. A szerbtövisről származó *Plasmopara*-izolátum csökkent mértékben, csupán a primer szövetekre (gyökér, hipokotil, sziklevel) korlátozódoan fertőzte a napraforgót, ugyanakkor mind ivartalan, mind ivaros szaporodásra képes volt ezekben a növényekben. A fenotípusos vizsgálatok igazolták, hogy a szerbtövisről származó *Plasmopara*-izolátum nem azonos a napraforgón közismert *P. halstedii* fajjal. A szerbtövisről származó izolátum különbözőségét és faji hovatartozását a molekuláris

vizsgálatok is alátámasztották, ezek alapján ezt az izolátumot a *Plasmopara angustiterminalis* Novot. fajnak tekintjük.

A napraforgóról származó izolátumok virulenciafaktorainak és patotípusainak elkülönítésére a RAPD-módszer nem bizonyult alkalmasnak. Ezzel szemben az iSSR-módszerrel bizonyos izolátumokra egyedi mintázatot kaptunk, melynek szerepe lehet a kórokozó terjedésének monitorozásában, továbbá ezzel a módszerrel az izolátumok gazdanövényeik szerint elkülöníthetőknek bizonyultak. Az ITS-régió elemzésével megállapítottuk, hogy a *P. halstedii* ITS-mérete közel 2600 bázis hosszú, melynek oka az ITS-2-régióban található többszörös inszerció. A szerbtövisről származó *Plasmopara*-izolátum ITS-mérete 3225 bázis, mely szintén az ITS-2-régióban tartalmaz inszerciót, valamint szekvenciája és struktúrája eltér a *P. halstedii*-re jellemzőktől. *P. halstedii*-ben meghatároztam egy *Ty-copia* típusú retrotranszpozon teljes szekvenciáját és egy fajspecifikus LTR-régiót, melyet sikeresen alkalmaztam inszerció polimorfizmus vizsgálatára. Elsőként alkalmaztam a *P. halstedii* esetében sporangiumból kiinduló izoenzimanalízist CAE-val, amely a kórokozó nagyfokú homozigótaságát támasztotta alá. A vizsgált minták körében talált öt, jól kimutatható izoenzimből három mutatott allelikus eltéréseket, melynek alapján négy multilokusz-fenotípuscsoportba lehetett a mintákat besorolni.

7. SUMMARY

In Hungary, one of the major yield-limiting factors of sunflower production is the downy mildew of sunflower (*Helianthus annuus* L.). This pathologically uniform oomycetous pathogen spread across Europe by the 1940s. In the past three decades, over thirty virulence phenotypes have appeared in the population. Monitoring the changes and distribution of the virulence characters of the pathogen can be done by applying the internationally accepted differential system. However, evaluation of virulence factors that are based upon the resistance/susceptibility reactions of the given differential lines, are time, space and labour consuming. Based on literature data and local observation, *P. halstedii* also infects asteraceae species other than sunflower. Cocklebur (*Xanthium stumarium* L.) can serve as a source of inoculum to infect the nearby sunflower fields.

The aim of this study was to characterize the variability of *Plasmopara* populations collected from sunflower and cocklebur by applying morphological, pathological and molecular genetic tools.

The study was conducted on isolates originated from sunflower and cocklebur collected in Hungary which were characterized for virulence phenotype. Isolates originated from both host plants were used to develop genetically pure single-sporangium isolates. These were characterized phenotypically by measuring sporangia size, determining the number of zoospores and the incubation period for zoospore release, virulence character, metalaxil sensitivity and fatty acid profile. Additionally, foreign isolates from other sunflower growing countries were included in our studies. Populational polymorphisms were studied at the molecular level to compare variability of virulence phenotypes and sub-populations. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) and iSSR (inter Simple Sequences Repeat) analyses were carried out. Furthermore, ITS (Internal Transcribed Spacer) and LSU (Large Ribosomal Subunit) regions were sequenced for comparisons and description of the isolates. Also a *Ty-copia* type retrotransposon for S-SAP (Sequences Specific Amplified Polymorphism) study was isolated. In addition isozyme stainability assay on sporangia and sporangiophore of *Plasmopara halstedii* as well as isozyme analysis for the study of the populational variation were performed.

Based on the observations, I concluded that single sporangia isolates of the *P. halstedii* segregated for virulence phenotype as compared to the original field isolates where they were sub-selected from. Pathogenicity of *Plasmopara* isolates from *Xanthium* sp. was limited on sunflower, that is, infection was restricted to the primary tissues (root, hypocotyl and cotyledon). However, this pathogen was able to complete its life cycle by producing zoospores as well as oospores in the root tissues of sunflower. Evaluation of phenotypic data revealed that the *Plasmopara* isolate X03

collected from *Xanthium strumarium* differed from the common sunflower infecting *P. halstedii*. Differences between the two kinds of *Plasmopara* isolates were supported by the molecular data. Conclusively, the X03 isolate from cocklebur should be considered as *Plasmopara angustiterminalis* Novot., which were previously described as a part of the *P. halstedii* species complex.

Of the molecular tools used to analyze the variability of the downy mildew of sunflower, the RAPD technique was not powerful enough to distinguish between the various virulence phenotypes. The iSSR polymorphisms, however resulted in isolate-specific patterns; this may be applicable to monitoring and distinguishing isolates according to their host origin. As for the ITS region, it was discovered that its length was app. 2600 bp in *P. halstedii*, which exceeded the expected size of this region. Sequence analysis of the ITS of *P. halstedii* suggested that the extreme size is due to multiple insertions in the ITS-2 region. In comparison, the *Plasmopara* isolate X03 from cocklebur had even larger ITS region with app. 3225 bp, that was also due to multiple repetitions in the ITS-2 region, but the insertions between the two kinds of isolates were different regarding composition and copy number of the repetitions. For the detection of variability below species level it was possible to identify and sequence a species-specific *Ty-copia* type retrotransposon from *Plasmopara halstedii* and also to use its long terminal repeat (LTR) region for developing a probe for S-SAP technique. For the first time CAE isozyme polymorphism studies were carried out with *Plasmopara halstedii* sporangia; results confirmed the high level of homozygosity of the pathogen. Among the enzymes investigated, five ones were well stainable and three of these revealed allelic differences. Samples were grouped into four multilocus phenotype groups.

8. MELLÉKLET

8.1. Irodalomjegyzék

- Abelin, E.C.A., Stax, A.M., Gruyter, J., Hubert, A. (2002) Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. *Mycological Research*, 106: 419-427.
- Albourie, J.M., Tourvieille, J., Labrouhe, D.T. (1998) Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 235-242.
- Allard, C. (1978) Progress of hypocotyl infection in sunflower seedlings resistant to *Plasmopara halstedii*. Abstr. Pap. VIII. International Sunflower Conference Mineapolis, USA No. 24.
- Anaya, N., Roncero, M.I.G. (1995) Skippy, a retrotransposon from the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular and General Genetics*, 249: 637-647.
- Andrews, R., Kirby, G.C., Adams, M. (1988) The population biology of a smut fungus, *Ustilago spiniifidis* Ludw. II. Isozyme polymorphism and geographic differentiation. *Australian Journal of Botany*, 36: 347-353.
- Bachofer, M. (2004) Molekularbiologische Populationsstudien an *Plasmopara halstedii*, dem Falschen Mehltau der Sonnenblume. Dissertation, pp.1-140. Universität Hohenheim, Germany
- Bakonyi, J., Ládai, M., Dula, T., Érsek, T. (2002) Characterisation of isolates of *Phytophthora infestans* from Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 108:139-146.
- Bennetzen, J.L. (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*, 42: 251-269.
- Benz, A., Spring, O. (1995) Identification and characterisation of an auxin-degrading enzyme in downy mildew infected sunflower. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46: 163-175.
- Boeke, J.D., Corces, V.G. (1989) Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annual Review of Microbiology*, 43: 403-434.
- Bohár, Gy., Vajna, L. (1996) A parlagfü (*Ambrosia artemisifolia* var. *elatior* L. Descourt.) egyes kórokozó gombáinak hazai előfordulása. *Növényvédelem*, 32: 527-528.
- Bonants P.J.M., Hagenaar-De Weerd M., Man in 't Veld W.A., Baayaen R.P. (2000) Molecular characterization of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum*. *Phytopathology*, 90: 867-874.
- Bonde, M.R., Peterson, G.L., Emmett, R.W., Menge, J.A. (1991) Isozyme comparisons of *Septoria* isolates associated with citrus in Australia and United States. *Phytopathology*, 81: 517-521.
- Borovkov, A.Y., McClean, P.E. (1993) A tandemly repeated sequence from the *Plasmopara halstedii* genome. *Gene*, 124: 127-30.

- Borovkova, I.G.A.Y., Borovkov, P.E., McClean, P.E., Gulya, T.J, Vick, B.A. (1992) Restriction fragment length polymorphisms and RAPD markers in DNA of *Plasmopara halstedii*, the downy mildew fungus of sunflower. In: Proc. 13th Int. Sunflower Conf. Pisa. pp.1420-1425.
- Brasier, C.M. (1987) The dynamics of fungal speciation. In: Rayner, A.D.M., Brasier, C.M., Moor, D. (eds) *Evolutionary Biology of the Fungi*. Cambridge University Press, New York, pp. 231-260.
- Brasier, C.M., Rose, J., Gibbs, J.N. (1995) An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology*, 44: 999-1007.
- Brown, J.K.M. (1999) The evolution of sex and recombination in fungi. In: Worrall, J.J. (ed.) *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. pp:63-95.
- Carson, M.L. (1981) New race of *Plasmopara halstedii* virulent on resistant sunflowers in South Dakota. *Plant Disease*, 65: 842-843.
- Chadha, S., Gopalakrishna, T. (2005) Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers for the genetic diversity assessment of the rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*). *Genome*, 48: 943-945.
- Choi, Y.J., Kiss, L., Vajna, L., Shin, H.D. (2009) Characterization of a *Plasmopara* species on *Ambrosia artemisiifolia*, and notes on *P. halstedii*, based on morphology and multiple gene phylogenies. *Mycological Research*, 113: 1127-1136.
- Chen, W., Schneider, R.W., Hoy, J.W. (1992) Taxonomic and phylogenetic analyses of ten *Pythium* species using isozyme polymorphisms. *Phytopathology*, 82: 1234-1244.
- Cohen, Y., Sackston, W.E. (1973) Factors affecting infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany*, 51: 15-22.
- Cohen, Y., Sackston, W.E. (1974a) Seed infection and latent infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany*, 52: 231-238.
- Cohen, Y., Sackston, W.E. (1974b) Disappearance of IAA in the presence of tissues of sunflowers infected by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany*, 52: 861-866.
- Cooke, D.E.L., Lees, A.K. (2004) Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology*, 53: 692-704.
- Cooke, D.E.L., Williams, N.A., Williamson, B., Duncan, J.M. (2002) An ITS-based phylogenetic analysis of the relationships between *Peronospora* and *Phytophthora*. In: Spencer-Phillips, P.T.N., Gisi, U., Lebeda, A. (eds.) *Advances in Downy Mildew Research*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 161-165.
- Covarelli, L., Tosi, L. (2006) Presence of sunflower downy mildew in an integrated weed control field trial. *Journal of Phytopathology*, 154: 281-285.
- Delanoe, D. (1972) Biologie et epidemiologie du mildiou du tournesol. *Inf. Tech. CETIOM*, 29: 1-49.

- Delmotte, F., Bucheli, E., Shykoff, A.J. (1999) Host and parasite structure in a natural plant-pathogen system. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46: 163-175.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'Baya, J., Vear, F., Tourvielle, J., Walser, P., Tourvielle, L.D. (2008) Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, 8:534-540.
- Dick, M.W. (2001) The classification of the Straminipilous fungi within the eukaryote kingdoms. In: Dick, M.W. (ed.) *Straminipilous fungi*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, pp. 101-115.
- Ellis, T. H. N., Poyser, S.J., Knox, M.R., Vershinin, A.V., Ambrose, M.J. (1998) *Ty1-copia* class retrotransposons insertion site polymorphism for linkage and diversity analysis in pea. *Molecular and General Genetics*, 231: 233-242.
- Enjalbert, J., Duan, X., Giraud, T., Vautrin, D., Vallavieille-Pope, C., Solignac, M. (2002) Isolation of twelve microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Ecology Notes*, 2: 536-565.
- Érsek, T., English, J.T., Schoelz, J.E. (1995) Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges using zoospore fusion. *Phytopathology*, 85: 1343-1347.
- Farman, M.L., Tosa, Y., Nitta, N., Leong, S.A. (1996) MAGGY, a retrotransposon from the genome of rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular and General Genetics*, 251: 665-674.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Flavell, A.J., Smith, D.B., Kumar, A. (1992) Extreme heterogeneity of *Ty1-copia* group retrotransposons in plants. *Molecular and General Genetics*, 231: 233-242.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296.
- Forbes, G.A., Goodwin, S.B., Drenth, A., Oyarzum, P., Ordonez, M.E., Fry, W.E. (1998) A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, 82: 811-818.
- Frank, J. (1999) *A napraforgó biológiája és termesztése*. Mezőgazda kiadó, Budapest. pp. 5-422.
- Garcia, G., Gulya, T.J. (1991) Sunflower downy mildew race distribution in North Dakota and Minnesota. In: *Proceedings of the National Sunflower Association Sunflower Research Workshop*. Fargo, pp. 3-5.
- Giresse, X., Tourvielle, L.D., Richard-Cervera, S. (2007) Twelve polymorphic expressed sequence tags-derived markers for *Plasmopara halstedii*, the casual agent of sunflower downy mildew. *Molecular Ecology Notes*, 7: 1363-1365.
- Goodwin, S.B., Sujkowski, L.S., Fry, W.E. (1995) Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of potato late blight disease fungus. *Phytopathology*, 85: 669-676.

- Goossen, P.G., Sackston, W.E. (1968) Transmission and biology of sunflower downy mildew. *Canadian Journal of Botany*, 46: 5-10.
- Grünwald, N. J., Goodwin, S.B., Milgroom, M. G., Fry, W.E. (2003) Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology*, 93: 738-746.
- Gulya, T.J. (2000) Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew and control through genetics and alternative fungicides. Proc. 15th ISA Conf., Toulouse, France, 2000. I. pp. 79-84.
- Gulya, T.J. (2002) First report of cross-infectivity of *Plasmopara halstedii* from marshelder to sunflower. *Plant Disease*, 86:919.
- Gulya, T.J. (2007) Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda, A., Spencer-Phillips, P. (eds.) *Advances in Downy Mildew Research* vol. III. Palacky University, Czech Republic pp. 193-201.
- Gulya, T.J., Miller, J.F., Virányi, F., Stackston, W.E. (1991a) Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 14: 11-15.
- Gulya, T. J., Sackston, W. E., Virányi, F., Masirevic, S., Rashid, K. Y.(1991b) New Races of the Sunflower Downy Mildew Pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *Journal of Phytopathology*, 132: 303-311.
- Gulya T.J, Rashid K.Y., Masirevic, S.M. (1997) Sunflower Diseases. In: Schneider, A.A. (ed.) *Sunflower Technology and Production* American Soc. Agronomy, Wisconsin, USA. pp. 263-379.
- Gulya T.J, Tourvieille, L.D., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K.Y., Virányi, F. (1998) Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). III. ISA Sunflower Downy Mildew Symposium, Fargo, USA, 13-14 January, pp. 130-136.
- Gulya, T.J., Urs, N.V.R.R. (1985) A new race of sunflower downy mildew. *Phytopathology*, 75: 1339.
- Hall, G.S. (1996) Modern approaches to species concepts in downy mildews. *Plant Pathology*, 45: 1009-1026.
- Heath, D.D., Iwama, G.K., Devlin, R.H. (1993) PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acids Research*, 24: 5782-5785.
- Hebert, P.D.N., Beaton, M.J. (1993) Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. A practical handbook. Helena Laboratories. pp. 1-33.
- Heller, A., Rozynek, B., Spring, O. (1997) Cytological and physiological reasons for the latent type of infection in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Journal of Phytopathology*, 145: 441-445.
- Horváth, Z., Békési, P., Virányi, F. (2005) A napraforgó védelme – Betegségek. *Növényvédelem*, 41: 307-331.

- Hovmoller, M.S., Justesen, A.F., Brown, J.K.M. (2002) Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in north-west Europe. *Plant Pathology*, 86: 1163-1168.
- Intelmann, F., Spring, O. (2002) Analysis of total DNA by minisatellite and simple sequence repeat primers for the use of population studies in *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 555-559.
- Judelson, H.S. (2002) Sequence variation and genomic amplification of a family of Gypsy-like elements in the oomycete genus *Phytophthora*. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1313-1322.
- Judelson, H.S., Randall, T.A. (1998) Families of repeated DNA in the oomycete *Phytophthora infestans* and their distribution within the genus. *Genome*, 41: 605-615.
- Jukes, T.H., Cantor, C. (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (ed.) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York. pp. 21-132.
- Kalendar, R., Grob T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A. (1999) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 704-711.
- Kalendar, R., Schulman, A.H. (2006) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*, 1: 2478-2484.
- Kaneko, I., Tanaka, A., Tsuge, T. (2000) REAL, an LTR retrotransposon from the plant pathogenic fungus, *Alternaria alternata*. *Molecular and General Genetics*, 263: 625-634.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30: 3059-3066.
- Komjáti, H., Fekete, Cs., Virányi F. (2004) Genetic and molecular characterisation of *Plasmopara halstedii* isolates from Hungary. In: Spencer-Phillips, P., Jeger, M. (eds.) *Advances in Downy Mildew Research vol. II*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht pp. 193-201.
- Knogge, W. (1996) Fungal infections of plants. *Plant Cell*, 8: 1711-1722.
- Kumar, A., Bennetzen, J.L. (1999) Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 33: 479-532.
- Kurnik, E., Léránth., J., Parragh, J., Vörös, J. (1976) Unusual symptom of downy mildew of sunflower (*Plasmopara halstedii*) in Hungary. *Proc. Int. Sunflower Conf. 7th vol. 2*: 205-209.
- Láday, M., Bagi, F., Mesterházy, Á., Szécsi, Á. (2000). Isozyme evidence for two groups of *Fusarium graminearum*. *Mycological Research*, 104: 788-793.
- Leppik, E.E. (1966) Origin and specialisation of *Plasmopara halstedii* complex on the compositae. *FAO Plant Protection Bulletin*, 14: 72-74.
- Lievens, B., Claes, L., Vanachter, A.C.R.C., Cammue, B.P.A., Thomma, B.P.H.J. (2006) Detecting single nucleotide polymorphisms using DNA arrays for plant pathogen diagnosis. *FEMS Microbiological Letter*, 255: 129-139.

- Ljubich, A., Gulya, T.J., Miller, J.F. (1988) A new race of sunflower downy mildew in North America. *Phytopathology*, 78:1580.
- Man in 't Veld, W.A., de Cock, A.W.A.M., Ilieva, E., Léverque, C.A. (2002) Gene flow analysis of *Phytophthora porri* reveals a new species: *Phytophthora brassicae* sp. Nov. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 51-62.
- Man in 't Veld, W.A., Veenbaas-Rijks, W.J., Ilieva E., de Cock, A.W.A.M., Bonants, P.J.M. Pieters, R. (1998) Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology*, 88: 922-929.
- Manubens, A., Lobos, S., Jadue, Y., Toro M., Messina, R., Lladser, M., Seedenfreund, D. (1999) DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 255-267.
- Mao, Y., Tyler, B.M. (1991) Genome organization of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Experimental Mycology*, 15: 283-291.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B., Ward, E. (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pesticide Management Science*, 59: 129-142.
- McClelland, M., Petersen, C., Welsh J. (1992) Length polymorphisms in tRNA intergenic spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:1499-1504.
- McHale, M.T., Roberts, I.N., Noble, S.M., Beaumont, C., Whitehead, M.P., Seth, D., Oliver, R.P. (1992) CfT-1: an LTR-retrotransposon in *Cladosporium fulvum*, a fungal pathogen of tomato. *Molecular and General Genetics*, 233: 337-347.
- Melero-Vara, J.M., Garcia-Baudin, C., Lopez-Herrera, C.J., Jimenez-Diaz, R.M. (1982) Control of sunflower downy mildew with metalaxyl. *Plant Disease*, 66:132-135.
- Micales, J.A., Bonde, M.R., Peterson, G.L., (1992) Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics. In: Aurora, D.K., Elander, R.P., Mukerji, K.G. (eds.) *Handbook of Applied Mycology Vol. 4, Fungal Biotechnology*. New York, Marcel Dekker, pp. 57-79.
- Miller, J.F., Gulya, T.J. (1988) Registration of six downy mildew resistant sunflower germplasm lines. *Crop Science*, 27: 210-212.
- Mitchell, J.I., Zuccaro, A. (2006) Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, 20: 62-74.
- Molinero-Ruiz, M.L., Dominguez, J., Melero-Vara, J.M. (1999) Evaluation of Spanish isolates of *Plasmopara halstedii* by their tolerance to metalaxyl. In: 15th technical Consultation of the FAO Research Network on Sunflower, 1999. Abstr.
- Molinero-Ruiz, M.L., Dominguez, J. Melero-Vara, J.M. (2002) Races of isolates of *Plasmopara halstedii* from Spain and studies on their virulence. *Plant Disease*, 86: 736-740.

- Molinero-Ruiz, M.L., Melero-Vara, J.M., Gulya, T.J., Dominguez J. (2003) First report of resistance to metalaxyl in downy mildew of sunflower caused by *Plasmopara halstedii* in Spain. *Plant Disease*, 87: 749.
- Molinero-Ruiz, M.L., Dominguez J., Gulya, T.J., Melero-Vara, J.M. (2005) Reaction of field populations of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) to metalaxyl and mefemoxam. *Helia*, 28: 65-74.
- Molinero-Ruiz, M.L., Cerdón-Torres, M.M., Melero-Vara, J.M., Domínguez, J. (2008) Resistance to metalaxyl and to metalaxyl-M in populations of *Plasmopara halstedii* causing sunflower downy mildew. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30: 97-105.
- Mosa, A.A., Kobayashi, K., Ogoshi, A., Kato, M., Sato, N. (1993) Isoenzyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. *Plant Pathology*, 42: 26-34.
- Mouzeyar, S., Tourvieille, L.D., Vear, F. (1993) Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Journal of Phytopathology*, 139: 289–297.
- Mouzeyar, S., Vear, F., Tourvieille, L.D. (1995) Microscopical studies of the effect of metalaxyl on the interaction between sunflower, *Helianthus annuus* L. and downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology*, 101: 399-404.
- Nishimura, M., (1922) Studies in *Plasmopara halstedii*. I. The infection of *Helianthus annuus* L. by zoospores. *J. Coll. Agric., Hokkaido Imp. Univ.* 11, pp. 185-198.
- Novotelnova, N.S. (1962) *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni as a conspecies. *Botanicheski Zhurnal* 47: 970–981. Abstract, *Review of Applied Mycology*, 42: 4.
- Novotelnova, N.S. (1963) A survey of *Plasmopara* species parasitic on Compositae. *Proceedings of the Second Symposium on Problems in Investigating the Fungus and Lichen Flora of the Baltic Republics*, Academy of Sciences, Lithuanian SSR, Vilnius, USSR. pp. 111-118.
- Novotelnova, N.S. (1966) Lozhnaya muchnistaya rosa podsolnechnika (Downy mildew of sunflower). *Nauka, Acad. Sci. U.S.S.R., Moscow*, pp. 39-55.
- O'Donnell, K. (1993) *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. (eds.) *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 225-233.
- Orellana, R.G. (1970) Resistance and susceptibility of sunflowers to downy mildew and variability in *Plasmopara halstedii*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 97: 91-97.
- Oudemans, P., Coffey, M.D. (1991) A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. *Mycological Research*, 95: 1025-1046.
- Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.

- Peever, T.L., Olsen, L., Ibanez, A., Timmer, L.W (2000) Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathology*, 90: 407-414.
- Pelsy, F., Merdinoglu, D. (2002) Complete sequence of *Tvv1*, a family of *Ty1 copia*-like retrotransposons of *Vitis vinifera* L., reconstituted by chromosome walking. *Theoretical and Applied Genetics*, 105:614–621.
- Penaud, A. (1994) Mildiou du tournesol: la progression des nouvelle races se poursuit. *Oleoscope*, 19:21.
- Petróczi, I. (1956) A napraforgó-peronoszpóra terjedése magyarországon. *Agrártudomány*, 8: 354-355.
- Podhradzky, J. (1954) A napraforgó új betegsége, a napraforgó-peronoszpóra (*Plasmopara halstedii* (Fral.) Berl et de Toni) Magyarországon. *Növénytermelés*, 3: 129-134.
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiß, M., Oberwinkler, F. (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (*Peronosporales*) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 94: 834-849
- Roeckel-Drevet, P., Coelho, V., Tourvieille, J., Nicolas, P., Tourvieille, L.D. (1997) Lack of genetic variability in French identified races of *Plasmopara halstedii*, the cause of downy mildew in sunflower, *Helianthus annuus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 260-263.
- Roeckel-Drevet, P., Tourvieille, J., Gulya, T.J., Charmet, G., Nicolas, P., Tourvieille, L.D. (2003) Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 492-502.
- Rozynek, B., Spring, O. (2000) Pathotypes in sunflower downy mildew in southern parts of Germany. *Helia*, 23: 27-34.
- Rozynek, B., Spring, O. (2001) Leaf disc inoculation, a fast and precise test for the screening of metalaxyl tolerance in sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology*, 149: 309-312.
- Rzhetsky, A., Nei, M., (1993) Theoretical foundation of the Minimum-Evolution method of phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 10:1073-1095.
- Sackston, W.E. (1981a) Downy mildew of sunflower. In: Spencer, D.M. (ed.) *The Downy Mildews* Academic Press, London, UK. pp. 545-575
- Sackston, W.E. (1981b) The sunflower crop and disease: Progress, problems and prospects. *Plant Disease*, 65: 643-648.
- Sackston, W.E. (1992) Managing the major sunflower diseases: from cultural practices to breeding for resistance. Proc. 13th International Sunflower Conf. Pisa Sept 7-11. Vol 1. pp. 667-699.
- Sackston, W.E., Gulya, T.J., Miller, J.F. (1990) A proposed International system for designating races of *Plasmopara halstedii*. *Plant Disease*, 74: 721-723.

- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sakr, N., Ducher, M., Tourvieille, J., Walser, P., Vear, F., Touvieille, D.L. (2008) Variation in form and size of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) zoospores. *Mycological Progress*, 7: 257-265.
- Savulescu, M.A.R. (1941) Die auf Compositen parasitierenden *Plasmopara* Arten. *Bulletin de la Section Scientifique de l' Academie Roumaine*, 24: 1-23.
- Scherer, E., Gisi, U. (2006) Characterisation of genotype and mating type in european isolates of *Plasmopara viticola*. *Journal of Phytopathology*, 154: 489-495.
- Shetty, K. (1998) Managing metalaxyl-resistance in *Plasmopara halstedii* from a chemical company perspective. III. Sunflower Downy Mildew Symposium, Fargo, USA. Jan. 13-14. pp.74-78.
- Sokal, R.R., Michener, M.A. (1958) Statistical method for evaluating systematic relationship. *University Kansas Scientific Bulletin*, 28: 1409-1438.
- Spring, O. (2009) Transition of secondary to systemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* – An underestimated factor in the epidemiology of the pathogen. *Fungal Ecology*, 2:75-80.
- Spring, O., Bachofer, M., Thines, M., Riethmüller, A., Göker, M., Oberwinkler, F. (2006a) Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity and geographic origin based on ITS sequence data. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 309-315.
- Spring, O., Benz, A., Faust, V. (1991) Impact of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection on the development and metabolism of sunflower. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 98: 597-605.
- Spring, O., Haas, K. (2002) The fatty acid composition of *Plasmopara halstedii* and its taxonomic significance. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 263-267.
- Spring, O., Rozynek, B., Zipper, R. (1998) Single spore infections with sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology*, 146: 577-579.
- Spring, O., Thines, M. (2004) On the necessity of new characters for classification and systematics of biotrophic Peronosporomycetes. *Planta*, 219: 910-914.
- Spring, O., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Oberwinkler, F. (2003) Characterisation of a *Plasmopara* isolate from *Helianthus × laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acids and molecular phylogenetic data. *Mycological Progress*, 2: 163-170.
- Spring, O., Zipper, R., (2000) Isolation of oospores of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, and microscopical studies on oospore germination. *Journal of Phytopathology*, 148: 227-231.

- Spring, O., Zipper, R. (2006) Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. Mycological Research, 110: 657-663.
- Spring, O., Zipper, R., Heller-Dohmen, M. (2006b) First report of metalaxyl resistant isolates of *Plasmopara halstedii* on cultivated sunflower in Germany. Journal of Plant Diseases and Protection, 113: 224.
- Suoniemi, A., Tanskanen, J., Schulman, A.H. (1998) Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom. Plant Journal, 13: 699-705.
- Sudisha, J., Niranjana, S.R., Sukanya, S.L., Girijamba, R., Lakshmi, D.N., Shekar, S.H. (2010) Relative efficacy of strobilurin formulations in the control of downy mildew of sunflower. Journal of Pest Science, 83: 461-470.
- Taylor, E.J.A., Stevens, E.A., Bates, J.A., Morreale, G., Lee, D., Kenyon, D.M., Thomas, J.E. (2001) Rapid cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. Plant Pathology, 50: 347-355.
- Thines, M. (2007) Characterisation and phylogeny of repetitive elements giving rise to exceptional length of ITS2 in several downy mildew genera (Peronosporaceae). Fungal Genetics and Biology, 44: 199-207.
- Thines, M., Komjáti, H., Spring, O. (2005) Exceptional length of ITS in *Plasmopara halstedii* is due to multiple repetitions in the ITS-2 region. European Journal of Plant Pathology, 112: 395-398.
- Tourvieille, J., Millon, J., Roeckel-Drevet, P., Nicolas, P., Tourvieille, L.D., Gulya, T.J. (2000) Molecular variability of *Plasmopara halstedii*. In: Proc. 15th International Sunflower Conference, Toulouse, Vol.II, I: 67-72.
- Tourvieille, L.D., Champion, R., Vear, F., Mouzeyar, S., Said, J. (1988) Une nouvelle race de mildiou en France, identification et control. Information techniques, N. 104.
- Tourvieille, L.D., Gulya, T.J., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K.Y., Virányi, F. (2000a) New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). Proc. 15th International Sunflower Conference, Toulouse, Vol. II, I: 61-65.
- Tourvieille, L.D., Lafon, S., Walser, P., Raulic, I. (2000b) A new race of *Plasmopara halstedii*, pathogen of sunflower downy mildew. Oleagineux, 7: 404-405.
- Tosi, L., Zizzerini, A. (2004) First report of downy mildew caused by *Plasmopara helianthi* races 700 and 703 of sunflowers (*Helianthus annuus*) in Italy. Plant Disease, 88: 1284.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000) Microsatellites in different eukariotic genomes: survey and analysis. Genome Research, 10: 967-981.
- Tuboly, L. (1971) A napraforgó-peronoszpóra és a fertőzés körülményeinek vizsgálata. Növényvédelem korszerűsítése, 5: 51-62.

- Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, 10: 569-570.
- Vear, F. (1974) Studies on resistance to downy mildew in sunflowers (*Helianthus annuus* L.). Proc. 6th Int. Sunf. Conf. Bucharest, pp. 297-302.
- Vear, F. (1978) Réaction de certains génotypes de tournesol résistants au mildiou (*Plasmopara helianthi*) au test de résistance sur plantule. *Ann. Amélior. Plantes*, 28: 327-332.
- Vear, F., Leclerq, P. (1971) Deux nouveaux genes de resistance au mildiou du tournesol. *Annales Amélior. Plantes*, 22: 251-255.
- Vear, F., Serre, F., Roche, S., Walser, P., Tourvieille, L.D. (2006) Recent research on downy mildew resistance useful for breeding industrial-use sunflowers. ISA 1st Symposium on Sunflower Industrial Use. Udine, Italy, Sept. 11-13. pp. 1-8.
- Viljoen, A., Wyk, P.S., Nowell, D.C., Gulya, T.J. (1997) Occurance of downy mildew on sunflower in South Africa. *Plant Disease*, 81: 111.
- Virányi, F. (1977) Napraforgó-peronoszpóra fertőzöttség kimutatása laboratóriumban. *Növényvédelem*, 13: 289-293.
- Virányi, F. (1978) Harmful incidence of *Plasmopara halstedii* in downy mildew „resistant” sunflower. *Phytopathologische Z.*, 91: 362-364.
- Virányi, F. (1984) Recent research on the downy mildew of sunflower in Hungary. *Helia*, 7: 35-38.
- Virányi, F. (1988) *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berl. et de Toni. In: Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., Lelliot, R.A., Archer, S.A. (eds.) *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 228-230.
- Virányi, F. (1991) A *Plasmopara halstedii* rasszok és a genetikai védelem lehetőségei. *Növényvédelem*, 27: 241-244.
- Virányi, F. (1992) *Plasmopara halstedii*. In: EPPO Data Sheets on Quarantine Pests. pp. 612-617.
- Virányi, F. (2002) The sunflower-*Plasmopara halstedii* pathosystem: Natural and artificially induced coevolution. In: Spencer-Phillips, P., Gisi, U., Lebeda, A. (eds.) *Advances in Downy Mildew Research*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 167-172.
- Virányi F., Dobrovolszky A. (1980) Systemic development of *Plasmopara halstedii* in sunflower seedlings resistant and susceptible to downy mildew. *Phytopathologische Zeitschrift*, 97: 179-185.
- Virányi, F., Gulya, T. (1995) Inter-isolate variation for virulence in *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) from Hungary. *Plant Pathology*, 44: 619-624.
- Virányi, F., Gulya, T. J., Masirevic, S. (1992) Races of *Plasmopara halstedii* in Central Europe and their metalaxyl sensitivity. In: Proc. 13th. Int. Sunflower Conf., Pisa, Italy. Vol I.: 865-868.

- Virányi, F., Masirevic, S. (1990) A napraforgó-peronoszpóra új rassza Magyarországon. *Növényvédelem*, 26: 274.
- Virányi, F., Oros, G. (1991) Developmental stage response to fungicides of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). *Mycological Research*, 95: 199-205.
- Virányi, F., Spring, O. (2010) Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10658-010-9683-0
- Virányi, F., Walcz, I. (2000) Population studies on *Plasmopara halstedii*: host specificity and fungicide tolerance. Proc.15th. Int. Sunflower Conf., Toulouse, France, VOL. II/I: 55-59.
- Voglmayr, H., Riethmüller, A., Göker, M., Weiß, M., Oberwinkler, F. (2004) Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of the downy mildews with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. *Mycological Research*, 108: 1011-1024.
- Voglmayr, H. (2003) Phylogenetic study of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences. *Mycological Research*, 107: 1132-1142.
- Voglmayr, H., Fatehi, J., Constantinescu, O. (2006) Revision of *Plasmopara* (Chromista, *Peronosporales*) parasitic on *Geraniaceae*. *Mycological Research*, 110: 633-645.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot., J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Walcz, I., Bogár, K., Virányi, F. (2000) Studies on an Ambrosia isolate of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 23: 19-24.
- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A.J., Pearce, S.R., Kumar, A., Thomas, B.B.T., Powell, W. (1997) Genetic distribution of BARE-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genetics*, 253: 687-694.
- White, T.J., Burns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds). *PCR protocols: A guide to Methods and Applications*. San Diego, California, Academic Press Inc. pp: 315-322.
- White, S.E., Habers, L., Wessler, S.R. (1994) Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes. A role of copia-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 91: 11792-11796.
- Wöstemeyer, J., Kreibich, A. (2002) Repetitive elements in fungi (Mycota) impact on genomic architecture and evolution. *Current Genetics*, 41: 189-198.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

- Zimmer, D.E. (1974) Physiological specialisation between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. *Phytopathology*, 64: 1464-1467.
- Zimmer, D.E., Hoes, J.A (1978) Diseases. In: Carter, J.F. (ed.). *Sunflower science and technology, agronomy*. American Society of Agronomy, Madison, USA. pp. 225-262.
- Zimmer, D. E., Kinman, M. L. (1972) Downy mildew resistance in cultivated sunflower and its inheritance. *Crop Science*, 12: 749–751.
- Zwankhuisen, M.J., Govers, F., Zadoks, J.C. (1998) Development of potato late blight epidemics: Disease foci, disease gradients and infection sources. *Phytopathology*, 88: 754-763.

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani Virányi Ferenc tanár úrnak, hogy témavezetőként segítette a munkámat és megosztotta velem a napraforgó-peronoszpórák titkos világát. Szeretnék köszönetet mondani Kiss József tanár úrnak, a tanszéki dolgozóknak és kedves laboránsunknak, Tündének, hogy befogadtak. Szeretnék köszönetet mondani továbbá Prof. Hornok Lászlónak és az MBK mikológiai csoportjának, ahol a molekuláris munka alapjait sajátíthattam el, melynek eredményei egy könyvfejezetben kaptak helyet. Kutatóéveim alatti vándorlásom újabb állomásaként érkeztem az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetébe, ahol akkor még Érsek Tibor adott lehetőséget, hogy a növénykórtani csoportban izoenzimvizsgálatokat végezzek Bakonyi Józseffel, akinek szintén szeretnék köszönetet mondani odaadó segítségéért, türelméért és gyakorlatias tanácsaiért. Az együtt töltött idő eredményességét két közös publikáció bizonyítja. Köszönet illeti Walcz Ilonát, aki a hazai napraforgó-nemesítés egyik kiemelkedő alakja, és örök kórtanosként mindig észrevett valami kuriózumot a tenyészkertjében, amit rendre megosztott kutatókkal és hallgatókkal egyaránt. Én a szerbtövisről gyűjtött izolátumot köszönhetem neki és a nem pusztán szakmai beszélgetéseket. Szeretnék köszönetet mondani a DAAD-ösztöndíjért, aminek segítségével egy éven át dolgozhattam a Hohenheim Egyetemen, Spring professzor úr laborjában és lehetőséget kaptam az általuk gyűjtött izolátumokkal bővíteni a vizsgálataimat. Köszönet jár a Marie Curie ösztöndíjért, ez tette lehetővé, hogy Cambridge-ben, a NIAB intézetben tölthettem 8 hónapot, és David Lee vezetése mellett fejleszthettem molekuláris ismereteimet a mindig lelkes Matias Pasquali olasz kutató társaságában, felejthető kudarok és felejthetetlen sikerélmények közepette. Továbbá külön köszönet illeti azokat, akik hittek abban, hogy ez a dolgozat egyszer valóban elkészül: elsőként említeném Szódi Szilvit, a családomat, továbbá Gulyás Andrást és Dejan Jovanovicot akik volt és jelenlegi főnökeim a Pioneer-nál.