



SOPRONI
EGYETEM



Sipos György, Kredics László, Chen Liqiong, Sahu Neha, Prasanna Arun, Champramary Simang, Kedves Orsolya, Indic Borís, Raj Garima, Nyikos Bendegúz Richárd, Huyn Thu, Kocsubé Sándor, Vörös Mónika, Marik Tamás, Nagy Viktor Dávid, Szekeres András, Münsterkötter Martin, Bencsik-Bóka Bettina, Szűcs Attila, Tyagi Chetna, Merényi Zsolt, Vágvölgyi Csaba, Nagy László

AZ ERDÉSZETI KÁRTEVŐ *ARMILLARIA* (TUSKÓGOMBA) NEMZETSÉG PATOLÓGIÁJA ÉS A BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI

GINOP-2.3.2-15-2016-00052

SZÉCHENYI 2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális
Fejlesztési Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

**Sipos György¹, Kredics László², Chen Liqiong², Sahu Neha³, Prasanna Arun³,
Champramary Simang^{1,2}, Kedves Orsolya², Indic Boris¹, Raj Garima¹,
Nyikos Bendegúz Richárd¹, Huyn Thu², Kocsubé Sándor², Vörös Mónika²,
Marik Tamás², Nagy Viktor Dávid², Szekeres András², Münsterkötter Martin¹,
Bencsik-Bóka Bettina², Szűcs Attila², Tyagi Chetna², Merényi Zsolt³,
Vágvolgyi Csaba², Nagy László³**

AZ ERDÉSZETI KÁRTEVŐ ARMILLARIA (TUSKÓGOMBA) NEMZETSÉG PATOLÓGIÁJA ÉS A BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI

Layout, tördelés, technikai szerkesztés: Effix-Marketing Kft.



SOPRONI EGYETEM KIADÓ
SOPRON
2021.

A PROJEKT CÍME:

Az erdészeti kártevő *Armillaria* (tuskógomba) nemzetség patológiájának és a biológiai védekezés lehetőségeinek a vizsgálata

A PROJEKT AZONOSÍTÓ SZÁMA:

GINOP-2.3.2-15-2016-00052

A PROJEKT MEGVALÓSÍTÁS IDŐSZAKA:

2017. 01. 01. – 2021. 12. 31.

A FŐKEDVEZMÉNYEZETT NEVE:

Soproni Egyetem

KONZORCIUMI PARTNEREK:

Szegedi Tudományegyetem
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

A SZERZŐDÖTT TÁMOGATÁS ÖSSZEGE:

675 883 102 Ft

FELELŐS KIADÓ:

Prof. Dr. Fábíán Attila
a Soproni Egyetem rektora

LEKTOR:

Dr. Papp Tamás

ILLUSZTRÁTOR:

Dr. Sipos György

CÍMLAPKÉP:

Saját készítésű fotó

ISBN 978-963-334-415-6

ISBN 978-963-334-416-3 (pdf)

© Copyright – Minden jog fenntartva.

¹ Soproni Egyetem, Funkcionális Genomika és Bioinformatika Kutatócsoport

² Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Mikrobiológiai Tanszék

³ Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Gomba Genomika és Evolúció Kutatócsoport

BEVEZETÉS

Az *Armillaria* (tuskógomba) fajok világszerte az erdők természetes talajlakó társalkotói, amelyeknek egyes telepei (egyedei) a Föld felszínének legnagyobb méretű és leghosszabb életkorú szárazföldi élőlényei közé tartoznak. Ezen fajok a növényi sejtfal minden nagymolekulájú összetevőjét (lignin, cellulóz, pektin) képesek lebontani, ami által alapvető szerepet játszanak a növényi eredetű szerves anyagok teljes lebontásában és a szárazföldi élethez szükséges tápanyagok természetes körforgásának biztosításában.

Az *Armillaria* fajok nagy részét világszerte a legjelentősebb erdőkárosító gombafajok között tartják nyilván. Ezek az agresszív növénykórokozó fajok képesek az élő, ellenállóképességükben gyengülő fákat megtámadni és elpusztítani, majd a gazdanövény elhalása után a fa szöveteit teljesen lebontani. A kórokozó fajok a korhadékanyagok lebontásával bárhol képesek szaprotróf módon túlélni, ezért a talajból történő eltávolításuk, az ellenük való védekezés kialakítása rendkívüli szakmai kihívást jelent.

A projekt során több mint tíz *Armillaria* faj teljes genomszekvenciájának a meghatározása lehetővé tette ennek a komoly gazdasági károkat okozó gombanemzetségnek a szisztematikus, összehasonlító genomszintű vizsgálatát. A genomikai megközelítés, az alkalmazott modern molekuláris biológiai módszerek és az adatok magasszintű bioinformatikai kiértékelése pedig megnyitotta az utat a gomba patogenitásában és virulenciájában szereplő tényezők azonosítására és megalapozta egy olyan szakmai áttörés kereteit, ahol ez az évtizedekig súlyos, kezelhetetlen kórokozóként ismert gombafaj modellorganizmusként történő vizsgálata elindulhat.

A projekt további eredményei, amelyek az *Armillaria* fajok kártételének környezetbarát, biológiai védekezésen alapuló kezelésére irányultak, lehetővé teszik egy, az erdőállományok minőségjavulását megcélzó, hatékony erdővédelmi stratégia megtervezését és alkalmazását előzetes laboratóriumi teszteredmények alapján.

A PROJEKT CÉLKITŰZÉSEI

1. A patogén *Armillaria* fajok és társult mikrobiális közösségeik genetikai vizsgálata károsított, illetve természetes állapotú erdőtársulásokban
2. Az *Armillaria* fajok patogenitásában és virulenciájában szerepet játszó genetikai faktorok azonosítása
3. Az *Armillaria* fajok patogenitását meghatározó genetikai háttér evolúciós eredetének vizsgálata összehasonlító genomikai módszerekkel
4. A gomba károsító hatása ellen környezetbarát biológiai védekezésen alapuló stratégia kidolgozása és gyakorlati tesztelése súlyosan károsított erdészeti területen

A PROJEKT FONTOSABB EREDMÉNYEI

ARMILLARIA IZOLÁTUMOK ÉS A BIOKONTROLL CÉLJAIRA FELHASZNÁLHATÓ BAKTÉRIUM- ÉS GOMBATÖRZSEK IZOLÁLÁSA, TÖRZSGYŰJTEMÉNY KIALAKÍTÁSA

A baktériumokon és gombákon alapuló biokontroll ágensek a toxikus kémiai növényvédő szerek ígéretes, környezetbarát alternatívái a káros *Armillaria* fajok erdei talajban történő terjedésének megakadályozására. A biokontroll-jelölt gombák közül a *Trichoderma* fajok mikoparazitaként hatékonyan képesek lehetnek különféle antagonista mechanizmusokat alkalmazni a növénykórokozó gombák ellen. Munkánk során az *Armillaria* fajok antagonizálására potenciálisan alkalmas *Trichoderma* törzsek szűrésére, jellemzésére és szelektálására irányuló nagyszabású erőfeszítések az *Armillaria* fertőzések elleni közvetlen szabadföldi alkalmazásokra ígéretes törzseket eredményeztek.

Kezdeti terepmunkáink során elvégeztük a Keszthelyi-hegység területén vizsgált erdőrészek talajösszetételének vizsgálatát. A talaj minősége, mint abiotikus faktor, szerepet játszhat a területen található növényzet mikrobiális fertőzésekkel szembeni ellenállóképességének szabályozásában. A nagymértékben károsított területeken a talaj felső rétegeinek savassága és dominánsan homokos összetétele hozzájárulhatott az erdő gombák okozta kipusztulásához. Rizomorfa- és talajmintákat gyűjtöttünk a

károsított magyarországi tölgyerdőn túl egészséges ausztriai fenyőerdők erdei élőhelyeiről, *Armillaria* gombatörzseket, valamint a velük társult mikrobaközösségekből baktérium- és gombatörzseket izoláltunk, és az izolátumokból tiszta tenyészeteket készítettünk, melyeket törzsgyűjteményben helyeztünk el. A Keszthelyi-hegység erdőrészletéből származó rizomorfamintákból, valamint a Keszthelyi-hegységben, a Soproni-hegységben és az ausztriai Rosalia-ban gyűjtött termőtest-mintákból izolált *Armillaria* törzsek azonosítása a köztes átíródó elválasztó régió (ITS) és a transzlációs elongációs faktor 1a gén egy szakaszának szekvenciája alapján történt.

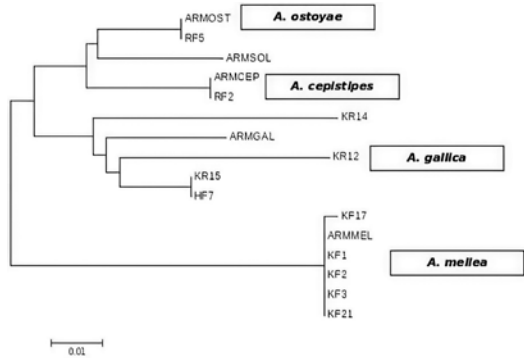
A kapott szekvenciák elemzése és a törzsek fajsztintú azonosítása a szekvencia-homológiai keresésén alapuló NCBI Nucleotide BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov) segítségével történt. A Keszthelyi-hegységből származó termőtest- és talajmintákból és a Soproni-hegységből származó termőtestmintákból izolált törzsek közül az analízis eredményeként 9 törzs *Armillaria mellea*-nak, 1 törzs pedig *Armillaria gallica*-nak adódott. A Keszthelyi-hegységből származó rizomorfamintákból izolált, valamint az ausztriai Rosalia-ból és a Sopron környéki Hidegvízvölgyből származó termőtest-mintákból izolált törzsek esetében a *tefl* gén egy szakaszát is amplifikáltuk, majd a kapott szekvenciákat összevetettük 5 ismert *Armillaria* genomról származó *tefl* szekvencia-adataival. A genomadattal bázisokban lévő szekvenciaadatok révén egyértelműen meg tudtuk határozni az izolátumok faji azonosságát. Három faj esetében az izolátumok *tefl* szekvenciái teljes mértékben megegyeztek az ismert genomok szekvenciaadataival, az *A. gallica* esetében azonban meglepő genetikai változatosságot találtunk, ugyanis csaknem minden izolátum *tefl* szekvenciája eltért a többi izolátum és a publikált genomszekvencia adataitól. Ilyen szintű genetikai eltérés két külön alfajra, vagy akár két külön fajra is utalhat, amelyek eltérő patogenitási sajátosságokkal is rendelkezhetnek.

Az *Armillaria* izolátumok genetikai vizsgálatával kiderült, hogy a Keszthelyi-hegység eddig vizsgált területein az elsődleges patogén *A. mellea* mindenhol megtalálható és a másodlagos, opportunista patogén *A. gallica* is dominánsan jelen van a tölgypusztulásban érintett termőhelyeken. A Soproni-hegységben, a Hidegvízvölgy mentén *A. gallica*, míg az ausztriai Rosalia-ból származó mintákból fenyőspecifikus *A. ostoyae* és *A. cepistipes* izolátumokat azonosítottunk.

Az *Armillaria* törzsek kísérletek céljára történő fenntartása, tenyésztése a törzsek lassú növekedése miatt komoly kihívást jelent. Megvizsgáltuk ezért 8 *Armillaria* törzs növekedési képességeit burgonya-dextróz táptalajon (PDA); 20 g/l hámozott, reszelt répával kiegészített burgonya-dextróz táptalajon (PCDA); BMDA táptalajon (3% malátakivonat, 2% glükóz, 2% agar) és malátás táptalajon (MA: 2% malátakivonat, 2% agar). A törzsek leoltása 6 mm-es dugófúróval kivágott agarkorongokkal történt. Az eredmények alapján az általunk vizsgált 5 különböző táptalaj közül a burgonya-dextróz-tartalmú bizonyult a legjobbnak.



Armillaria mellea
telep rizomorfákkal
(saját készítésű fotó)



Az izolált *Armillaria* törzsek *tef1*-szekvenciának összetevése 5 ismert *Armillaria* genomból származó *tef1* szekvenciaadatokkal. ARMOST: *A. ostoyae*, ARMSOL: *A. solidipes*, ARMCEP: *A. cepistipes*, ARMGAL: *A. gallica*, ARMMEL: *A. mellea* (saját készítésű fotó)

Mivel a szakirodalmi adatok alapján a növénykórokozó gombák elleni biológiai védekezésre a legígéretesebb mikroorganizmusok a baktériumok körében a *Bacillus* és *Pseudomonas* nemzetségek, a gombák körében pedig a *Trichoderma* nemzetség képviselői közül kerülnek ki, az alkalmazott baktérium- és gombaizolálási stratégia során elsősorban ezeket a mikrobacsoportokat céloztuk meg. Az izolálási csészéken növekedő telepeket egysejt-tenyészetek létrehozásával és átváltásával tisztítottuk, majd elhelyeztük őket a Szegedi Mikrobiológia Törzsgyűjteményben (www.szmc.hu).

A *Pseudomonas* izolátumok azonosítására az RNS-polimeráz B (*rpoB*) génre, a *Bacillus* és egyéb baktériumtörzsek azonosítására pedig a 16S riboszómális RNS génjére tervezett indítószekvenciákat (primer-eket) alkalmaztuk, míg a gombatörzsek molekuláris azonosítását az ITS régióra és a *tef1* génre tervezett primer-ekkel végeztük. A kapott szekvenciák elemzése és a törzsek fajszintű azonosítása a szekvencia-homológiák keresésén alapuló NCBI Nucleotide BLAST segítségével történt, melyet a *Trichoderma* törzsek esetében a *TrichoKey* 2.0 és *TrichoMARK* szoftverekkel (www.isth.info) végrehajtott elemzéssel egészítettünk ki.

Az izolált baktériumok között a *Pseudomonas mandelii* faj képviselői fordultak elő legnagyobb mennyiségben, melyet a *P. jessenii* faj követett. Fentiekén túl azonosítottuk még a *P. koreensis* és *P. fluorescens* fajok képviselőit, továbbá *Bacillus* és *Paenibacillus*



Pseudomonas-szelektív táptalajon izolált telepek (saját készítésű fotó)

törzseket, köztük a *P. castaneae*-t is. A *Trichoderma* fonalaszgomba-nemzetség tekintetében a mintákból összesen 64 *Trichoderma* törzset izoláltunk, melyek 14 fajt (*T. asperellum*, *T. atrobrunneum*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. guizhouense*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. longipile*, *T. paratroviride*, *T. paraviridescens*, *T. simmonsii*, *T. tomentosum*, *T. virens*, *T. viridescens*) képviseltek. A két erdőterületen (Keszthely és Rosalia) a *Trichoderma* közösségek eltérő összetételt mutattak.

ARMILLARIA GENOMOK SZEKVENÁLÁSA ÉS ÖSSZEHASONLÍTÓ GENOMIKAI VIZSGÁLATA

Az *Armillaria* nemzetség genomevolúciós mintázatait 5 *Armillaria* faj (*A. solidipes*, *A. ostoyae*, *A. mellea*, *A. gallica*, *A. cepistipes*) teljes genomszekvenciáját 22 rokon Basidiomycota faj genomjával kiegészítve rekonstruáltuk a COMPARE módszer segítségével. Ennek részeként vizsgáltuk a csoport génduplikációs és génvesztési mintázatait, a növényi sejtfal lebontásában szerepet játszó 23 géncsalád, valamint növénykórokozó gombákban azonosított, a patogénitásban szerepet játszó gének homológjainak evolúcióját. A géncsalád-evolúciós vizsgálatokból kapott eredményeket COMPARE-térképezésekkel, a kópiaszám-alapú vizsgálatok eredményeit heatmap-ek segítségével foglaltuk össze. Az első két *Armillaria* faj szekvenálása során mi használtuk először a legmodernebb szekvenálási technológiát (PacBio) eukarióta / gomba DNS-szekvenciák azonosítására. A továbbiakban alkalmazott komparatív genomikai analízis a témakörben világszinten az első, nagy volumenű szisztematikus vizsgálat, amely nagy felbontású képet adott az *Armillaria* fajok evolúciójáról, genomjaik fehérjekódoló géntartalmáról (beleértve a patogénitáért felelős géneket).

Kidolgoztunk egy reprodukálható termesztési protokollt, melynek segítségével megbízhatóan tudjuk az *A. ostoyae* fajt termőtestképzésre bírni, így a kísérletekhez szükséges mintákat előállítani. Az *A. ostoyae in vitro* termesztésének optimalizált paramétereit felhasználva termőtest-, rizomorfo- és vegetatív micéliummintákból összesen 50 RNS-kivonatot készítettünk, melyeket RNS-szekvenálásnak vetettünk alá. Az RNS-mintákból Illumina short-read könyvtárakat készítettünk, majd Illumina HiSeq platformon szekvenáltuk nagy szekvenálási mélységig. A kapott nyers szekvenciáfájlok tartalmát a genomra illesztve kvantifikáltuk minden gén expressziós szintjét, vizsgáltuk a biológiai ismétlések homogenitását (MDS plotok, hierarchikus klaszterezés felhasználásával), majd azonosítottuk a szignifikánsan eltérően expresszálandó és a fejlődésben szerepet játszó géneket. A kapott adatsor megteremtette a patogén fejlődési stádiumokra specifikus genetikai jellegzetességek vizsgálatának alapfeltételeit.

Az *A. ostoyae* fajban azonosítottunk közel 200 rizomorfa-specifikus gént és elvégeztük a gének komparatív genomikai és filoztratigráfiai analízisét (konzerváltság, evolúciós eredet). Rizomorfa-indukciós kísérletek segítségével meghatároztuk a rizomorfa-képződést szabályozó géneket és a kapcsolódó molekuláris mechanizmusokat.

A kapcsolódó tudományos publikáció (Sipos és mtsai., Nature Ecol. Evol. 2017) nagy visszhangot váltott ki mind a tudományos közösségben (>80 hivatkozás 2017 óta), mind az ismeretterjesztő médiában. Több mint 100 online és nyomtatott sajtóorgánium számolt be a kutatás eredményeiről (The New York Times, The Atlantic, New Scientist, index.hu, és számos más meghatározó médium).

Elvégeztük az eddig publikált *Armillaria* fajok komparatív szekretomikai analízisét, melynek során a bioinformatikai módszerek fejlesztésével olyan szekréción adatbázisokat hoztunk létre, amelyek magukban foglalják a GPI-alapú és egyéb hidrofób fehérjéket kódoló géncsaládokat is. Elvégeztük az *Armillaria* szekréción adatbázisaink és a gombafélék fehérje-alapú szekretált virulencia-faktorainak összehasonlító filoztratigráfiai vizsgálatát, amelynek segítségével egy *Armillaria*-specifikus “fehérorhasztó” patogenitási modellt állítottunk fel.

ARMILLARIA – GAZDANÖVÉNY KÖLCSÖNHATÁSI VIZSGÁLATOK

Az *Armillaria* fajok gyökérekolonizációs stratégiájának vizsgálata során *A. ostoyae* és *A. cepistipes* törzseket kombináltunk lucfenyő-gyökérmetszetekkel, majd monitortuk azok kolonizációját. A gomba faanyag-lebontó és kolonizációs képességét és az azt követő génextpressziós változásokat transzkriptomikai módszerekkel követtük. 12 RNS könyvtár szekvenálása történt meg Illumina platformon, a riboszomális RNS-ek eltávolításához RiboZero stratégiát alkalmazva. A kapott szekvenált read-eket a két faj genomjára térképeztük, differenciál expressziós analízist végeztünk, majd a szignifikánsan eltérően expresszált géneket funkcionálisan jellemeztük. A kísérlet módszertanához a tervezettől eltérő módon nem egysejt-transzkriptomikát, hanem hagyományos transzkriptomikai megközelítést alkalmaztunk. Az eltérés oka kettős:

- Előkísérleteink azt mutatták, hogy az irodalmi adatoktól és az általánosan elfogadott nézetektől eltérően nem rizomorfák, hanem egyedi hifák felelősek a lucfenyő gyökerébe történő behatolásért és annak kolonizációjáért. Ez szükségtelemné tette a rizomorfacsúcsok egysejt-transzkriptomikával történő vizsgálatát.

- Az időközben megjelent publikációk rámutattak arra, hogy a korábbi nézetekkel ellentétben a rizomorfacsúcsok nem tartalmaznak nyugvó, őssejtekre emlékeztető sejtípusokat, ehelyett sokkal valószínűbb, hogy az ún. „*immortal strand hypothesis*” magyarázza az *Armillaria* fajok alacsony mutációs rátáját. Az „*immortal strand hypothesis*” bizonyításával nyugvó, őssejtszerű sejtek keresésére irányuló kísérleteink értelmüket veszítették.

Ezek alapján úgy döntöttünk, hogy a nagyobb kihívást jelentő és rosszabb jel/zaj aránnyal rendelkező egysejt-transzkriptomika helyett hagyományos transzkriptomikát használunk. Döntésünket igazolja a kapott eredmények magas relevanciája és a gyökérekolonizáció mechanizmusainak megértésére tett lépéseink sikeressége.

A kambium-inváziót lehetővé tévő géncsaládok összehasonlító metabolomikai és génextpressziós vizsgálata *in vitro* inváziós tesztek (lucfenyő faszeletek) segítségével zajlott. A kísérletekben három fenyőspecifikus faj virulens, nem virulens és szaprotróf izolátumait vetettük össze.

ARMILLARIA FAJOK FAANYAG-LEBONTÓ KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

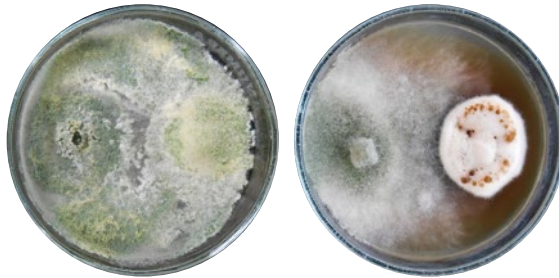
Az *Armillaria* fajokat hagyományosan ún. fehérkorhasztó gombáknak tartják. A fehérkorhasztó fajok képesek a faanyag minden komponensét (cellulóz, hemicellulóz, pektin, lignin) lebontani. Genomikai vizsgálataink azonban azt mutatják, hogy az *Armillaria* fajok egy nem konvencionális lignocellulóz-bontó génrepertoárral rendelkeznek.

Alaposabb vizsgálatok kiderítették, hogy az *Armillaria* fajok számos, egyébként a tömlősgombák lágykorhasztására jellemző vonással rendelkeznek. Ennek tükrében újradefiniáltuk a klasszikus irodalomban Basidiomycota lágykorhasztóként ismert faanyag-lebontó életmódot és elsőként jellemeztük az emögött meghúzódó extracelluláris enzimrendszereket.

A BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉSI BEAVATKOZÁSOKBAN ALKALMAZHATÓ BAKTÉRIUM- ÉS GOMBFAJOK TESZTELÉSE LABORATÓRIUMI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

A potenciális biokontroll szervezetek azonosítása céljából *in vitro* antagonizmus tesztet hajtottunk végre, melynek során kétnapos *Trichoderma* tenyészeteket oltottunk *Armillaria* törzsek mellé. A kísérleteket PDA-táptalajon kiviteleztek. 5 mm átmérőjű agarkorongokat vágunk a növénypatogén gombák 2 hetes telepeinek széléről, majd a konfrontációs táptalajokra helyeztük őket a Petri-csészék közepétől mért 1,5 cm-es távolságra.

2 hét elteltével micélium korongokat vágunk ki 2 napos *Trichoderma* telepek széléről, melyeket a konfrontációs táptalajokra helyeztünk a Petri-csészék közepétől mért 1,5 cm-es távolságra, ellenkező irányban. A két, táptalajra helyezett korong távolsága így 3 cm-re lett beállítva. A táplemezek 5 napig, 25 °C-on, sötétben történő inkubálása után a csészékről 10 cm-es távolságból digitális fényképeket készítettünk (Nikon S3500). Ezt követően a csészékről készült felvételeket *Armillaria* törzsek szerint kategorizáltuk. A vizsgált *Trichoderma* törzsekre az Image J 1.48 szoftver segítségével kivitelezett, képanalízisen alapuló módszer segítségével meghatároztuk a Biokontroll Index (BCI) értékeket, ezáltal számszerűsíthetővé és egymással összevethetővé váltak a vizsgált törzsek *in vitro* antagonistista képességei. A BCI-értékeket az alábbi képlet segítségével számoltuk ki (a magasabb BCI-érték jobb antagonistista képességet jelent):

$$BCI = (\text{Trichoderma telep területe} / \text{a Trichoderma és a növénypatogén gomba által együttesen elfoglalt terület}) \times 100$$


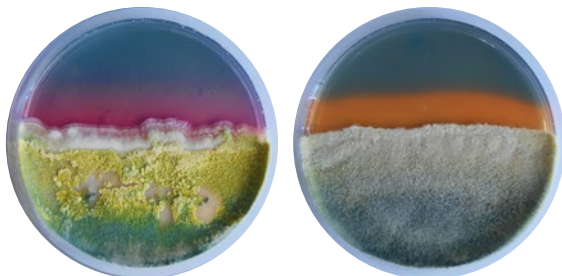
Trichoderma in vitro antagonizmusa *Armillaria*-val szemben. Az *Armillaria* a csésze jobb, a *Trichoderma* a csésze bal oldalára került leoltásra. Bal oldalon: erős antagonizmus, a *Trichoderma* képes volt az *Armillaria* telep felszínére növekedni, és ott ivartalan spórákat (konídiumokat) képezni. Jobb oldalon: gyenge antagonizmus, ránövekedés nem tapasztalható. (saját készítésű fotó)

Az eredmények alapján az erősen *Armillaria*-fertőzött területekről izolált *Trichoderma* törzsek többsége az *Armillaria* fajok hatékony *in vitro* antagonistájának bizonyult, így felhasználható lehet az *Armillaria* által okozott gyökérrothadás elleni biológiai védekezés céljaira. Másrészt viszont egyes *Trichoderma* fajok, illetve törzsek gyenge antagonistista képességeket mutattak az *Armillaria* törzsekkel szemben, melyet alacsony BCI-értékeik tükröztek. A legtöbb gyenge antagonistista képességekkel rendelkező izolátum az egészséges erdőterületekről származott.

A munka során összegyűjtött *Trichoderma* izolátumok jellemzése során megvizsgáltuk a törzsek cellulóz- és xilánbontó enzimrendszerekbe tartozó poliszacharidbontó enzimek, valamint a foszfor mobilizációjában szerepet játszó savas foszfatáz termelésére való képességét. Az *Armillaria* elleni legjobb *in vitro* antagonistista képességgel rendelkező fajok izolátumai ezen extracelluláris enzimek legrosszabb termelői közé tartoztak, és fordítva,

ami arra utal, hogy ezeknek a *Trichoderma* fajoknak az *Armillaria* elleni fő antagonista mechanizmusa a hifák és rizomorfák mikoparazitizmusa lehet, nem pedig a poliszacharidokért folytatott kompetíció, vagy a gyökerek foszfor-hozzáféréseinek fokozása.

Az indolecetsav- és sziderofórtermelés jellemzése és kimutatása szintén fontos paraméter a biokontroll-jelölt törzsek szűrése, illetve rizoszféra-kompetenciájuk megértése szempontjából. A vizsgált erdei eredetű *Trichoderma* izolátumok közül 40 törzs volt képes indolecetsav termelésére, többségük pedig sziderofórtermelő képességekkel is rendelkezett. Katekol-típusú, illetve hidroxamát-típusú sziderofórt termelő törzseket egyaránt sikerült azonosítani.



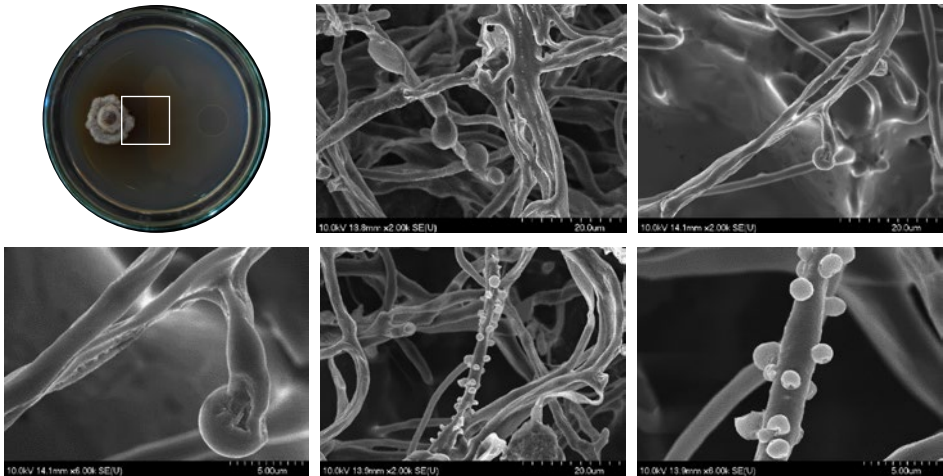
Katekol-típusú (balra) és hidroxamát-típusú (jobbra) sziderofórok Trichoderma törzsek általi termelése krómazurol táptalajon (saját készítésű fotó)

A potenciális biokontroll baktériumtörzsek *Armillaria* törzsekkel szembeni tesztelésének *in vitro* módszerét egy ismert biokontroll törzs (*Bacillus subtilis* SZMC 6179J) segítségével optimalizáltuk. Az izolált baktériumok *Armillaria* törzsekkel szembeni antagonizmusát ezt követően két különböző módszerrel vizsgáltuk. Az 1. módszer alkalmazásakor 50 μ l 10^6 sejt/ ml koncentrációjú baktériumszuszpenziót szélesztettünk PDA táptalajra. A 2 hetes *Armillaria*-tenyészetet tartalmazó 5 mm átmérőjű agarkorongot a baktériumot tartalmazó Petri-csésze közepére helyeztük el. Mindegyik *Armillaria* törzsből készítettünk egy-egy kontroll tenyészetet, ami csak a gombát tartalmazta. A kiértékelés során az *Armillaria* törzsek telepátmérőjét mértük és adtuk meg centiméterben. A kísérlet eredményei alapján a baktériumok jelenléte jelentős gátlást nem mutatott ezen módszer segítségével, a rizomorfaképződést azonban számos *Pseudomonas* törzs gátolta.

A 2. módszer alkalmazásakor 2 hetes *Armillaria* törzsből 5 mm átmérőjű agarkorongot helyeztünk a Petri-csésze közepére. A pontátoltással leoltott baktériumok a növénypatogén törzsektől 1-1 cm-re kerültek leoltásra. A 3 hetes inkubáció során az *Armillaria* telepek átmérőjét 3 időpontban lemértük, majd a 3 hét leteltekor a csészéket lefényképeztük (Nikon S3500). Ezen módszer alkalmazása során kizárólag egy izolátum, a 3/2-es jelű *Pseudomonas* törzs gátolta az *Armillaria* törzsek növekedését.

Ez a baktériumtörzs ígéretes biokontroll ágens lehet, a törzs gomba biokontroll ágensekkel való kompatibilitása, pl. a szabadföldi kísérlet céljára szelektált *Trichoderma* törzsekkel történő együttes alkalmazásának lehetősége azonban további vizsgálatokat igényel.

Az *A. mellea* és *A. ostoyae* fajok baktériumokkal (*Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus* sp.) zajló kölcsönhatásait pásztázó elektronmikroszkópiás vizsgálatoknak is alávetettük. Konfrontációs teszteket állítottunk be, majd az inkubációs idő letelte után a SEM vizsgálatokhoz többféle módszerrel készítettük elő a mintákat. Az egyik kísérleti összeállításban a baktériumtörzset a táptalaj felületére szélesztettük, és ugyanakkor ráoltottuk az *Armillaria* törzset a csésze közepére, majd két hétig inkubáltuk és a közepéről mintát vettünk. A másik alkalmazott kísérleti összeállításban a Petri-csésze közepétől 1 cm-re leoltottuk az *Armillaria* törzset, egy hétig inkubáltuk, majd 1 cm-re a csésze közepétől ellentétes irányba leoltottuk a baktériumtörzset, két hétig inkubáltuk és a közepéről mintát vettünk. A kezdeti direkt kontaktus hiányának köszönhetően az *Armillaria* képes növekedni, így SEM módszerrel vizsgálhatóvá válik a baktériumok *Armillaria* törzsekre gyakorolt hatása. Összesen 20 *Armillaria* törzs vizsgálata zajlott le 20 baktériumtörzsszel szemben 3-3 ismétlésben.



Armillaria ostoyae – *Pseudomonas fluorescens* kölcsönhatás vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóppal (saját készítésű fotó)

A fakultatív nekrotróf *A. ostoyae* az *Armillaria* nemzetség egyik legpusztítóbb erdei kórokozója, mely világszerte gyökérrothadási betegségeket okoz fásszárú növényeken. Jelenleg is folyik a hatékony védekezési intézkedések felmérése ezen földalatti kórokozó populációjának a korlátozására. A *T. atroviride* biokontroll tulajdonságai a faj genomjára,

proteomjára és szekréciójára támaszkodva a műtrágyák és kémiai peszticidek környezetbarát alternatívájaként komoly potenciált jelentenek a növénybetegségek elleni védekezés és az erdővédelem területén. A *T. atroviride* SZMC 24276 törzs (TA) jó antagonista képességgel rendelkezett a haploid *A. ostoyae* SZMC 23093 törzsszel (AO) szemben. A kettős tenyésztési vizsgálat eredményei alapján a haploid *A. ostoyae* SZMC 23093 törzs nagyfokú érzékenységet mutat a *T. atroviride* SZMC 24276 micéliuma általi invázióval szemben.

Az AO és a TA molekuláris kölcsönhatásainak vizsgálata céljából az *in vitro* kettős tenyésztésből kapott transzkriptomokat nagy teljesítményű, következő generációs szekvenálási technológia alkalmazásával elemeztük. A kórokozó-antagonista PDA táptalajon zajló kölcsönhatása során különböző időpontokat rögzítettünk a transzkriptomelemzés céljaira. Megpróbáltuk feltárni a molekuláris kölcsönhatás dinamikáját, beleértve a micéliumok egymással történő érintkezése előtti metabolitszintű kölcsönhatást, a mikoparazita kölcsönhatást (amikor a TA micélium fizikailag érintkezik az AO telepével), valamint a poszt-mikoparazita kölcsönhatást (amikor a TA már ránövekedett az AO telepének felszínére). A három kísérleti körülmény közül a konfrontációs minták nagyon jelentősen eltérő mintázatot mutattak a kontrollhoz képest, de egymáshoz képest is jelentősen eltértek. Szándékunk volt transzkripció szinten értelmezni az AO esetében a TA biokontroll inváziója által kiváltott védekező válaszokat, valamint a TA biokontroll aktivitását alátámasztó, az AO-val, mint gazdaszervezettel zajló kölcsönhatás során fellépő transzkripció válaszait is, ezért idősor-elemzést és funkcionális annotációt végeztünk, vizsgáltuk a dúsított útvonalakat, és elemeztük a differenciálisan expresszálódó géneket, beleértve a TA biokontrollal kapcsolatos, valamint az AO védekezéssel kapcsolatos gjenjelöltjeit.

A biokontroll ágens és a kórokozó *in vitro* kettős tenyészetben kivitelezett konfrontációs kísérletének transzkriptomelemzése hasznos megközelítésnek bizonyult a gombák kölcsönhatásának komplex dinamikai modellezésére. Tudomásunk szerint ez az első transzkriptom-elemzési tanulmány biokontroll gomba által megtámadott *A. ostoyae* esetében, mely betekintést nyújthat a növényi kórokozó-biokontroll ágens kölcsönhatás mechanizmusaiba. Az eredmények alapján a TA számos biokontroll stratégiát alkalmazott az AO-val szembeni konfrontáció során, az AO esetében pedig számos védekezési mechanizmus indult be a gombatámadás okozta súlyos negatív hatások elleni védekezés érdekében.

A táptalajkörnyezetben az egymással konfrontált fajok metabolitjai és más szekrétaumai hatására bekövetkezett változások, valamint a fizikai micéliuminvázió okozta kihívások befolyásolják a gombák transzkriptom-mintázatát. A TA számos biokontroll mechanizmusa már a fizikai érintkezés előtt aktiválódott. Ezek közé tartozik a

hidrolitikus enzimek és az antibiotikus hatású másodlagos metabolitok termelése. Másrészt a TA korai, a micéliumok érintkezése előtt az AO kórokozóra gyakorolt transzkripció hatása számos védekezési reakciót, például a kinolinsav (QA) termelését indukálta. Az érintkezés után további védekezési stratégiák indukálódtak, például megemelkedett a detoxifikációban feltételezhetően szerepet játszó peptidázok expressziója. Az AO-ban ennek ellenére azonban jelentős növekedésgátlás következett be az irányába növekedő TA hatására.

Összességében a gombák kölcsönhatásának transzkriptomikai vizsgálata alapján a védekező gének differenciális expressziója lehetővé teszi az AO számára a biokontroll ágens által kibocsátott metabolitok vagy extracelluláris enzimek érzékelését, illetve a TA inváziója elleni védekezés megkísérlését, másrészt a TA-nak a gazdaszervezet (AO) által indukált transzkriptomikai átprogramozása az AO – mint gazda/zsákmány – antagonizálása szempontjából jelentős biokontroll potenciállal rendelkező, mikoparazitizmussal kapcsolatos gének differenciális expressziójához vezet.

SZELEKTÁLT MIKOPARAZITA GOMBAIZOLÁTUMOK ALKALMAZÁSA SÚLYOSAN KÁROSÍTOTT ERDÉSZETI TERÜLETEKEN

A tuskógomba fajok ismert gyengültségi paraziták, melyek elhatalmasodva képesek számos faj és szőlőfajta pusztulását előidézni. Az *Armillaria* kártételével szembeni védekezés nehezen kivitelezhető, mivel a kórokozó a talajban maradt fás maradványokban viszonylag sokáig képes életben maradni. Lehetséges megoldásként szóba jöhet a fertőzött területről minden, 2 cm-nél vastagabb gyökér eltávolítása, illetve a talaj kémiai szerekkel (pl. metil-bromiddal) történő fertőtlenítése. A vegyszeres védekezés viszont a mezőgazdaságban és erdészetekben egyaránt számos kedvezőtlen hatással jár. A legkorszerűbb készítmények is károsítják a környezetet, gyakran nem csak a célzott gombakártevőt, hanem az élőhelyen jelen lévő hasznos gombákat is elpusztítják, emellett a talajvíz szennyezéséhez is vezetnek, mezőgazdasági rendszerekben (pl. szőlőtermesztés) pedig káros szermaradványok kerülhetnek a táplálékláncba, és azon keresztül az emberi szervezetbe. A fenti problémák miatt egyre nagyobb igény mutatkozik a környezetbarát, biológiai védekezési módszerek iránt.

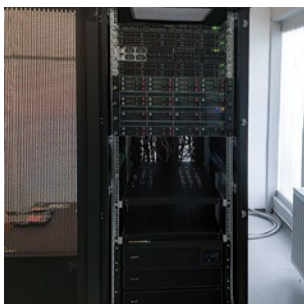
A *Trichoderma* nemzetség képviselői olyan talajlakó penészgombák, melyek sikeresen alkalmazhatók számos növénykórokozó gomba elleni biológiai védekezés céljaira. Hatékonyan versengenek a káros gombákkal az élőhelyért és a tápanyagokért, a káros gombákat gátló/elpusztító anyagokat termelnek, emellett közvetlen parazitaként is képesek számos gombakártevőt elpusztítani.

A Keszthelyi-hegységben beállítandó szabadföldi csemetekísérlet céljaira két, különböző fajokba (*T. vires* és *T. atrobrunneum*) tartozó, a Keszthelyi-hegységből származó, elpusztult rizomorfákról izolált, valamennyi tesztelt *Armillaria* törzssel szemben magas biokontroll index értékeket (100) mutató, sziderofórok és indolecet sav termelésére egyaránt képes törzset választottunk ki. A két kiválasztott *Trichoderma* törzs alkalmazásával szabadföldi kísérletet végeztünk két éves európai tölgyपालántákon, melyek egy, számos *Armillaria* telep rizomorfái által erősen fertőzött erdőterületre kerültek kiültetésre. A kiültetés során a kezelt facsemetek gyökereit a két *Trichoderma* törzs konídiumait egyaránt 10^6 /ml-es koncentrációban tartalmazó vizes szuszpenzióban, a kontroll facsemetek gyökereit sima csapvízben áztattuk 2 órán keresztül. A *T. vires* és *T. atrobrunneum* törzsekkel kezelt tölgyपालánták jobb, 84,3%-os túlélést mutattak az *Armillaria* által erősen fertőzött talajban a kezeletlen kontrollokhoz képest (54,7%).

A PROJEKT TÁMOGATÁSÁBÓL BESZERZETT FONTOSABB ESZKÖZÖK



SOE – Termesztő kamra és szerver (saját készítésű fotó)



SZBK – Növénynevelő kamra és szerver (saját készítésű fotó)

SZTE – GC-MS-alapú mikrobiológiai identifikáló rendszer (saját készítésű fotó)

VÁLOGATÁS A PROJEKT TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓKBÓL

FOLYÓIRATCIKKEK

Sipos, G., Prasanna, A.N., Walter MC., O'Connor, E., Bálint, B., Krizsán, K., Kiss, B., Hess, J., Varga, T., Slot, J., Riley, R., Bóka, B., Rigling, D., Barry, K., Lee, J., Mihaltcheva, S., LaButti, K., Lipzen, A., Waldron, R., Kredics, L., Vágvolgyi, Cs., Patrignani, A., Fitzpatrick, D., Nagy, L., Doyle, S., Anderson, J.B., Grigoriev, IV., Güldener, U., Münsterkötter, M., Nagy, L.G. Genome expansion and lineage-specific genetic innovations in the forest pathogenic fungi *Armillaria*. *NATURE ECOLOGY & EVOLUTION* 1: 1931–1941 (2017)

Heinzelmann, R., Croll, D., Zoller, S., Sipos, G., Münsterkötter, M., Güldener, U., Rigling, D. High-density genetic mapping identifies the genetic basis of a natural colony morphology mutant in the root rot pathogen *Armillaria ostoyae*. *FUNGAL GENETICS & BIOLOGY* 108: 44–54 (2017)

Tsykun, T., Rellstab, C., Dutech, C., Sipos, G., Prospero, S. Comparative assessment of SSR and SNP markers for inferring the population genetic structure of the common fungus *Armillaria cepistipes*. *HEREDITY* 119: 371–380 (2017)

Sipos, G., Anderson, J.B., Nagy, G.L. *Armillaria*. *CURRENT BIOLOGY* 28: R297–R298 (2018)

Kredics, L., Chen, L., Kedves, O., Büchner, R., Hatvani, L., Allaga, H., Nagy, V.D., Khaled, J.M., Alharbi, N.S., Vágvolgyi, C. Molecular tools for monitoring *Trichoderma* in agricultural environments. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY* 9: 1599 (2018)

Mercado-Blanco, J., Abrantes, I., Caracciolo, A.B., Bevivino, A., Ciancio, A., Grenni, P., Hryniewicz, K., Kredics, L., Proença, D.N. Belowground microbiota and the health of tree crops. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY* 9:1006 (2018)

Vörös, M., Manczinger, L., Kredics, L., Szekeres, A., Shine, K., Alharbi, N.S., Khaled, J.M., Vágvolgyi, C. Influence of agro-environmental pollutants on a biocontrol strain of *Bacillus velezensis*. *MICROBIOLOGY OPEN* 8:e00660 (2019)

Chen, L., Bóka, B., Kedves, O., Nagy V.D., Szűcs, A., Champramary, S., Patocskai, Z., Huynh, T., Indic, B., Vágvolgyi, C., Sipos, G., Kredics, L. Towards the biological control of devastating forest pathogens from the genus *Armillaria*. *FORESTS* 10: 1013 (2019)

Kappel, L., Münsterkötter, M., Sipos, G., Gruber, S. Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. *PLOS PATHOGENS* 16:e1008320 (2020)

Bóka, B., Manczinger, L., Kocsubé, S., Shine, K., Alharbi, N.S., Khaled, J.M., Münsterkötter, M., Vágvolgyi, C., Kredics, L. Genome analysis of a *Bacillus subtilis* strain reveals genetic mutations determining biocontrol properties. *WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* 35:52 (2019)

Heinzelmann, R., Münsterkötter, M., Sipos, G., Croll, D. Chromosomal assembly and analyses of genome-wide recombination rates in the forest pathogenic fungus *Armillaria ostoyae*. *HEREDITY* 124: 699–713 (2020)

Tamandegani, P.R., Marik, T., Zafari, D., Balázs, D., Vágvolgyi, C., Szekeres, A., Kredics, L. Changes in peptaibol production of *Trichoderma* species during *in vitro* antagonistic interactions with fungal plant pathogens. *BIOMOLECULES* 10: 730 (2020)

Sahu, N., Merényi, Z., Bálint, B., Kiss, B., Sipos, G., Owens, R., Nagy, L.G. Hallmarks of basidiomycete soft- and white-rot in wood-decay-omics data of two *Armillaria* species. *MICROORGANISMS* 9: 149. (2021)

Kedves, O., Shahab, D., Champramary, S., Chen, L., Indic, B., Bóka, B., Nagy, V.D., Vágvolgyi, C., Kredics, L., Sipos, G., Epidemiology, biotic interactions and biological control of Armillarioids in the Northern Hemisphere. *PATHOGENS* 10: 76 (2021)

KONFERENCIACIKK

Chen, L., Shahab, D., Kedves, O., Champramary, S., Indic, B., Nagy, V.D., Vágvolgyi, C., Kredics, L., Sipos, G. Armillarioid root rot invasion: possibilities of silvicultural and chemical control. In: 9th Hardwood Proceedings Pt. II. An Underutilized Resource: Hardwood Oriented Research pp. 90–96 (2021)

2021.

Készült 500 példányban.

ISBN 978-963-334-415-6



ISBN 978-963-334-416-3

**Pdf
verzió**

