

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BUDAPEST

A paprikában (*Capsicum annuum* L.) élő endofita gombák és gombavírusok jellemzése

Borbély Csaba

Kertészmérnök BSc.

Készült a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken

Tanszéki konzulens: Dr. Lukács Noémi egyetemi tanár, BCE Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

Konzulens: Dr. Halász Krisztián tudományos munkatárs, MTA, ÖKK-ÖBI

Bírálok: _____

Budapest, 2014. 11.23.

tanszékvezető/szakirányfelelős

konzulens

TARTALOM

1.BEVEZETÉS	4.
2.CÉLKITŰZÉS	5.
3.IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5.
3.1.Az étkezési paprika (<i>Capsicum annuum</i> L.) bemutatása.....	5.
3.1.1.Az étkezési paprika eredete, rendszertana és botanikája.....	5.
3.1.2.Az étkezési paprika gazdasági jelentősége.....	6.
3.1.3.Az étkezési paprika biológiai igényei, termesztése	6.
3.2. Az endofita gombák általános bemutatása	7.
3.3. Az endofita gombák jelentősége.....	8.
3.4.A mikovírusok bemutatása.....	11.
4.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13.
4.1. Növénynevelés és mintavétel	13.
4.2 A növények felszíni sterilizálása és az endofita gombák kitenyésztése.....	14.
4.2.1. Klóramfenikolos PDA táptalaj készítése.....	14.
4.2.2. Felszíni sterilizálás és a kitenyésztés elindítása.....	14.
4.2.3. A tenyésztés eredményeinek kiértékelése.....	15.
4.3. A kiválasztott gombatelepek izolálása	15.
4.4 Az izolált gombatelepek morfológiai csoportokba osztása.....	16.
4.5. Az adatok statisztikai kiértékelése.....	17.
4.6. Az izolált gombatelepek monospórást és monohifásítást.....	17.
4.7 Az izolált gombatelepek duplaszállú RNS tartalmának vizsgálata.....	18.
4.7.1. A munkafolyamat célja	18.
4.7.2.A felszaporítás előkészítése.....	18.
4.7.3. A folyékony táptalaj készítése.....	18.
4.7.4. A felszaporítás indítása.....	19.
4.7.5.A felszaporított gombákból történő nukleinsav kivonás.....	19.
4.7.5.1.A gomba sejtjeinek feltárása.....	19.

4.7.5.2 A nukleinsav kivonás menete.....	20.
4.7.6. Az immunoblotolás folyamata	20.
4.7.6.1.A nemdenaturáló poliakrilamid gélelektroforézis	21.
4.7.6.2. A félszáraz blottolás folyamata.....	21.
5.EREDMÉNYEK	23.
5.1 . Az endofita gombák általi kolonizáltság.....	23.
5.1.1 Az egyes fajták endofita gomba általi kolonizáltságának mértéke a különböző termőhelyeken	23.
5.1.2. Az egyes fajták kolonizációs rátája a tenyésztő függvényében.....	24.
5.1.3. Az egyes növényi szervek kolonizációs rátája a tenyésztőszak folyamán	26.
5.2. A gombák különböző morfológiai csoportjainak elterjedtsége.....	30.
5.2.1. Az <i>Altenaria</i> nemzetség eloszlása a különböző termőhelyeken, fajtákban és szervekben az októberi mintavétel esetében.....	34.
5.2.2. A 'DB' morfológiai csoport eloszlása a különböző termőhelyeken, fajtákban és szervekben az októberi mintavétel esetében.....	36.
5.2.3. Az <i>Acremonium</i> nemzetség előfordulása a különböző termőhelyeken és fajtákban az októberi mintavétel esetében.....	38.
5.2.4. A <i>Cladosporium</i> nemzetség eloszlása a különböző termőhelyeken és fajtákban az októberi mintavétel esetében	39.
5.2.5. Egyéb beazonosított morfológiai csoportok.....	40.
5.3.A dsRNS tartalmú mikovírusok detektálásának eredménye	42.
6. DISZKUSSZIÓ	44.
6.1.A növények endofita gombák általi kolonizáltságának értékelése	44.
6.2.Az egyes morfológiai csoportok elterjedtségének értékelése	46.
7. ÖSSZEFOGLALÁS	47.
8. IRODALOMJEGYZÉK	48.

1. BEVEZETÉS

A bioszféra élőlényei (vírusok, prokarióták, eukarióta egysejtűek, növények, állatok, gombák) bonyolult, sokszor még ismeretlen kapcsolatrendszerben állnak egymással, ennek következtében a fajok hatással lehetnek egymás életfolyamataira és populációdinamikájára. Ezek a kapcsolatok lehetnek az egyik vagy mindkét faj számára károsak (parazitizmus, versengés), semlegesek, vagy hasznosak (szimbionta kapcsolat) (Borvendég et al. 2001).

A fajok közötti kapcsolatok egyik érdekes típusa a növények szöveteiben élő endofita gombák és az ezen gombákban élő mikovírusok jelenléte. Endofita gombákat szinte minden hajtásos növényből kimutattak már, és egyre jobban megismerjük a gazdanövényekre gyakorolt sokrétű hatásukat is: növelhetik a növények biotikus és abiotikus stresszel szembeni ellenálló képességét, javíthatják növekedésüket, vitalitásukat (Hyde és Soyong, 2008). Ugyanakkor ezek a fajok zömében ismeretlen aktiváló faktorok hatására potenciálisan patogénné válhatnak, ekkor már növényvédelmi problémákat okozhatnak, hatásuk a semleges-hasznosból károssá válik (Botella et al. 2010). Ezek az endofita gombák gyakran társulnak mikovírusokkal, melyek gombagazdáikban morfológiai és élettani változásokat okozhatnak (Chu et al. 2002), ezáltal hatással lehetnek a gazdanövényre is.

Látható tehát, hogy a növények szöveteiben élő szervezetek bonyolult, és sokszor még ismeretlen kapcsolatrendszerben állnak egymással, egyfajta mikrobiomot alkotnak. Egyre inkább nyilvánvalóvá válik ezen hatások fontossága a növény fejlődésében, és napjainkban számos kutatás folyik ezen kapcsolatrendszerek kihasználásának lehetőségeire a kertészeti termesztésben.

A korábbi irodalmi adatok elsősorban természetes vegetációk, illetve termesztett trópusi fajok endofita gomba és mikovírus kolonizáltságával foglalkoztak. A hazai termesztett fajokról, különösen a lágyszárúakról nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre. Ezért tartottuk fontosnak a hazai zöldségtermesztés egyik meghatározó fajának, az étkezési paprikának (*Capsicum annuum* L.) vizsgálatát, mivel a termesztéstechnológiájában és növényvédelmében bevezetett új módszerek (abiotikus stresszel szembeni tolerancia, biológiai növényvédelem) komoly gazdasági haszonnal kecsegtetnek.

2. CÉLKITŰZÉS

Dolgozatom célja az étkezési paprika két fajtájában ('Hó F1', 'Kárpia F1') élő endofita gombák kitenyésztése, izolálása, morfológiai jellemzése és gyakoriságuk felmérése volt. Emellett reprezentatívan kiválasztott gombatorzsekből megkísértem duplaszálú RNS (dsRNS) genomú mikovírusok detektálását is. A kísérlet egy, a Növényélettan és Növényi Biotechnológiai tanszéken zajló nagyobb kutatás részfolyamata volt, melynek célja a különböző *Capsicum* fajokban és fajtákban élő nem patogén organizmusok (vírusok, baktériumok, gombák) felmérése, azonosítása és lehetséges hatásaik és kapcsolataik vizsgálata.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az étkezési paprika (*Capsicum annuum* L.) bemutatása

3.1.1. Az étkezési paprikája eredete, rendszertana és botanikája

A paprika neve a legtöbb nyelven, így a magyarban is a görög- és latin piperi-piper szóra vezethető vissza, ami borsot jelent (Somos, 1981). Ez tükrözi régi felhasználási területét: a drága importfűszer, a fekete bors (*Piper nigrum*) kiváltására honosították meg Európában, régi magyar neve, a törökbors is erre utal. A nemzetség tudományos nevét (*Capsicum*) vagy a görög capso, captein (marni, harapni), vagy a capshakes (tok, hüvely) szavakból nyerte (Somos, 1981).

Rendszertanilag a Solanaceae (Burgonyafélék) családba tartozik, több zöldségnövényünk rokon faja (paradicsom, burgonya, tojásgyümölcs). A nemzetséghez nagyjából 20-30 faj tartozik, többségük vad típus (pl. *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum*), hazánkban üzemi körülmények között csak a *Capsicum annuum* (étkezési paprika) fajtát termesztjük. A vad fajok nemesítési alapanyagként szolgálhatnak (Zatykó, 1993). A továbbiakban csak a hazánkban jelentős *Capsicum annuum* faj jellemzésével foglalkozom.

Az étkezési paprika őshazája a Dél-Amerikai kontinens (Mexikó, Guatemala) (Somos, 1981). Eredeti élőhelyén többéves, fásodó félcserje életmódot folytat, a hazai technológiákban egyéves növényként termesztjük. (Zatykó, 1993) Állandó helyre vetett állomány esetén főgyökérrendszer fejleszt, de tűzdelés vagy átültetés esetén (amikor a fiatal növény gyökere sérül) egyenrangú oldalgyökereket képez, így gyökérzete bojtos gyökérzetre hasonlít.

Hajtásrendszere lehet folytonos növekedésű, vagy determinált (csokros). A növény levelei ép szélűek, kerekded vagy ovális alakúak, kihegyesedők.

Virágai kétivarúak, szirmuk fehér, forrt. Fakultatív idegentermékenyülő, az idegentermékenyülés 50m-es izolációs távolságban már teljesen megszűnik. Termése húsos falú tok, mely gazdasági és biológiai érettségben is szüretelhető a felhasználás céljának megfelelően. Magja lapított vese alakú, ezermagtömege 5-7 g, csírázókéességét 3-4 évig őrzi meg. (Zatykó, 1993)(Balázs et al. 2000).

3.1.2.Az étkezési paprika gazdasági jelentősége

A magyar zöldségtermesztés egyik legmeghatározóbb zöldségnövénye, éves hazai termése meghaladja a 200000 tonnát, ezzel hazánk a világ 10 vezető paprikatermesztő országa közé tartozik. Az egyes paprika alakkörök közül a konzerviparban a paradicsomalkatú nagyjából 50%-os részaránnyal rendelkezik, míg szabadföldön mintegy 15%-kal, itt a fehér kúpos típus a legmeghatározóbb. A hazai termesztett paprika nagyjából 10%-a csípős, a többi alakkör elhanyagolható mennyiségű. Az étkezési paprika fő felvevőpiaca a hazai friss fogyasztás, nagyjából 50%-os részaránnyal. Ez a 10 kg/fő feletti éves fogyasztással magyarázható. A hazai konzervipar a termés mintegy 25%-át dolgozza fel, és nagyjából 7% kerül friss termékként exportra (Zatykó, 1993).

A paprika gazdasági jelentősége napjainkban is megmaradt, mivel a hazai igények mellett egyre jelentősebbek a magyar paprika iránti exportigények. A hazánktól északra és nyugatra elhelyezkedő fejlett országokban az egyre modernebb termesztéstechnológia következtében a kiváló minőségű hazai fehér kúpos paprika drágán értékesíthető, kedvelt kuriózumnak minősül (Mártonffy, 1999).

3.1.3.Az étkezési paprika biológiai igényei, termesztése

A sikeres termesztés alapvető követelménye az adott növényfaj biológiai igényeinek ismerete, és ezek lehető legsikeresebb kielégítése. Ezek a tényezők hatást gyakorolhatnak a paprikával együtt élő szervezetekre (köztük az endofita gombákra is), ezért fontos ezek áttekintő bemutatása.

A paprika környezeti igényeit, mint minden termesztett növény esetében az eredeti származási helyük (a paprikánál Dél-Amerika) határozza meg. Elmondható, hogy a paprika fényigényes növény, terméskötéshez 5000 lux feletti, és legalább 13-14 órás megvilágítás szükséges. A kritikus megvilágítás alatt a növény egyáltalán nem köt termést, de a túl alacsony

megvilágítás növeli a tenyészidő hosszát is. Hőigénye Markov-Haev szerint 25°C, ennél 7°C-kal magasabb hőmérséklet az ideális számára a csírázáskor, és 7°C-al alacsonyabb szikleveles korban, az első kötések létrejöttékor és éjszaka (Zatykó 1993). Vízigénye optimális termesztési körülmények között magas. Köztudottan tápanyagigényes növény, fontos a talaj nitrogén, foszfor és káliumtartalmának megfelelő arányban tartása, emellett fontos mikroelemek még számára a magnézium, a mész, a vas és a bór (Zatykó 1993, Balázs et al. 2000).

A növény termesztési körülményei befolyásolhatják a bennük élő endofita gombák életkörülményeit is, ezért fontos tisztában lennünk a paprika alapvető termesztéstechnológiáival. Általánosságban elmondható, hogy a rendszerváltás előtti időkben a hazai paprikatermesztést elsősorban a nagy mennyiségű, főleg szabadföldi, nem mindig magas minőséget biztosító tömegáru előállítása jellemezte. Napjainkra ez a trend megváltozott, az igényes fogyasztó csak a kiváló minőségű árut hajlandó megvásárolni. Ez az igény termesztéstechnológiai és növényvédelmi módszerek megváltozását vonta magával, emellett új fajták is megjelentek a piacon, ami az endofita élőlények életlehetőségeit és terjedési módjait is lényegesen befolyásolta. Hazánkban legelterjedtebb termesztési módok a szabadföldi palántás termesztés, illetve a növényházi hajtatus. A hajtatus történhet eredeti talajon, vagy talajnélküli hajtatussal valamilyen termesztőközege (Zatykó 1993; Mártonffy 1999).

A többi termesztett növényünkhöz hasonlóan a paprikánál is egyre nagyobb igény merül fel a vásárlók és a termesztők részéről is a lehető legalacsonyabb és legkíméletesebb vegyszerhasználatra. Növényházi körülmények között paprikánál is egyre gyakoribb a biológiai védekezés (pl. *Orius laevigatus* ragadozó atkákkal tripszek ellen). Az új hatóanyagok és védekezési stratégiák megváltoztathatják a kultúra fajösszetételét, tekintettel a paprika növény szöveteiben élő endofita gombákra és azok mikovírusaira is.

3.2. Az endofita gombák általános bemutatása

Az endofita gombák meghatározására számos definíció született, ezek közül a legáltalánosabban elfogadott Petrini (1991) meghatározása: „Endofita minden olyan növényi szövetekben élő organizmus, ami élete egy szakaszában képes a növények belső szöveteit kolonizálni úgy, hogy a növényen látható károsodást nem okoz.” Fontos itt kiemelni, hogy életciklusa egy szakaszában, mivel az endofita gombák között előfordulnak potenciális patogének is (Giordano et al. 2009), melyek többnyire ismeretlen faktorok hatására életük egy szakaszában már tüneteket okoznak a növényeken. A mikorrhiza gombákat nem soroljuk az endofiták közé, mivel ez a kapcsolat csak a növény erre specializált szervében jöhet létre, és a gomba is speciális képleteket fejleszt (Lukács (szerk.) 2013).

3.3. Az endofita gombák jelentősége

Az endofita gombák gazdanövényre gyakorolt hatásuk szerint lehetnek mutualisták, kommenzalisták és bizonyos esetekben paraziták is. Ezt a kapcsolatot több tényező befolyásolhatja, az abiotikus tényezők (hőmérséklet, napfénytartam, csapadék) mellett a növény életkora és egészségi állapota és az egyéb endofita organizmusok jelenléte is (Redman et al. 2001). Egy adott endofita gombafaj életciklusa során a többi tényező változásának függvényében többféle életmódot is folytathat a növényen belül.

Az endofita gombák elterjedtsége a növényben erősen függ a környezeti és termesztési tényezőktől, a növényfaj és -fajta gombafertőzésre való fogékonyságától, és vektorfajok jelenlététől. Korrelációanalízissel bizonyították, hogy a délnyugat-kínai gyepekben található arbuszkuláris mikorrhizagombák (melyek nem tekinthetők valódi endofitának) kolonizáltsága szignifikánsan összefügg a környezeti tényezőkkel (csapadék, napsütéses órák száma, talaj, stb.). A velük együtt jelenlévő fekete szeptált endofita gombák kolonizáltsága viszont csak a relatív páratartalommal és a napsütéses órák számával volt szignifikáns összefüggésben (Lingfei et al., 2005).

Termesztésben sokat tehetünk a potenciálisan patogén endofita gombák terjedésének megakadályozása érdekében, ezek közé tartozik a talajnélküli hajtítás fertőtlenített termesztőközege, rezisztens fajta termesztése, a növények optimális tápanyagellátása, a vektorszervezetek hatékony gyérítése, illetve a csepegtetőcsöves öntözés alkalmazása a szórófejes helyett, mert így kisebb a nedves levélfelületen a potenciális kórokozók terjedésének valószínűsége. Fontos a vetésforgó betartása, ez főleg gazdaspecifikus kórokozók esetén segít a terjedést gátolni; valamint az egészséges szaporítóanyag használata (Vétek és Nagy, 2011, Glits et al., 2012).

Capsicum annuum-ban élő patogén gombákra Muhammar és munkatársai végeztek kutatásokat Pakisztánban. Termesztett paprikanövények gombafajait vizsgálták gyökér, szár, levél és mag szervekből. Összesen hét nemzetséget, és 10 fajt sikerült kimutatniuk: *Alternaria alternata*, *Cephalosporium acremonium*, *Fusarium anthophilum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium aphanidermatum* és *Rhizoctonia solani*. (Muhammar et al. 1997). A paprika alternáriás megbetegedése hazánkban is jelentős, ez okozza ugyanis a paradicsomalkatú paprikák szürke magházpenészt, ami komoly termésminőségromlás okoz (Glits et al. 2012).

Bár az endofita gombák között számos potenciális parazita faj található, egy részük egész életciklusa folyamán láthatatlan marad a növényben, gazdaszervezetére nincs látható és bizonyítható hatással. Ilyen semleges kapcsolatban általában elsődleges lebontó fajok élnek a növény szöveteiben, melyek csak annak pusztulása után aktivizálódnak (Bacon és White, 2000).

A gazdanövényeikkel káros vagy semleges kapcsolatban lévő endofita gombák mellett sok olyan faj is megtalálható a növényekben, mely hasznos a növénygazdája számára. Ezek az endofiták javíthatják a növény kondícióját és vigorát, fokozhatják az abiotikus stresszel szembeni ellenálló-képességüket, és hatékony védelmet nyújthatnak bizonyos kórokozók és kártevők ellen is, ezáltal a jövőben a biológiai növényvédelem potenciális forrásait jelenthetik.

Egyes endofita gombák képesek növényi hormonokat, például gibberellineket(GA) és auxint (IAA) termelni, ezáltal hatással lehetnek gazdanövényük fejlődésére. Khan és munkatársai szárazságstressznek kitett paprikanövények gyökeréből izoláltak endofita gombákat, köztük a *Chaetomium globosum* fajt is. Az ebből a gombából felszaporítás után nyert filtrátumról bebizonyosodott, hogy szignifikánsan növelte a hibás gibberellin bioszintézisű mutáns rizsfajta (Waito C. rice) növények növekedését, klorofilltartalmát, levélfelületét és biomassza produktumát (Khan et al., 2012).

Az növényben élő endofita gombák antagonista hatással lehetnek a növény patogén gombáira, korlátozhatják a patogén növekedését *in vitro* és *in vivo* körülmények között is, ezáltal csökkentik az általuk okozott termésvesztést (Arnold et al. 2003). Ilyen antagonista hatást figyeltek meg a kaucsukfa (*Hevea brasiliensis*) endofita gombái, és a kaucsukfa kórokozó gombája, a *Microcyclus ulei* között Brazíliában. A kórokozó felelős a kaucsukfa dél-amerikai levélpénésznek (South American Leaf Blight) nevezett betegségéért, mely az ültetvények gyenge fejlődését okozza, ezáltal a gazdaságos gumi-előállítás egyik korlátozó tényezője a neotropikus régióban. Három, a kórokozó ellen eltérő rezisztenciával rendelkező kaucsukfajta leveleiből összesen 435 gombakoloníát izoláltak. 88 izolátumból liofilizált kultúrakivonatot nyertek, és ezek gátló hatását vizsgálták a *Microcyclus ulei* PMB26 konídiumainak csírázására *in vitro* körülmények között. 12,5%-os koncentráció mellett 13 filtrált endofita gombakultúra mutatott 80% feletti gátló hatást, ezeket az rDNS-ük ITS régiója alapján beazonosították. A gátló hatást mutató izolátumok a *Fusarium*, *Gibberella*, *Glomerella*, *Microsphaeropsis*, *Myrothecium*, *Pestalotiopsis* és *Phomopsis* nemzetségekbe tartoztak (Rocha et al. 2010).

Más kísérletekben a *Trichoderma viride* gomba spóra-szuszpenziójával kezelt gyümölcsfákat tökéletesen meg tudták védeni az ólomfényűség (kórokozó: *Stereum*

purpureum) fertőzésétől, ami ellen a mai napig semmilyen kémiai védekezési lehetőség nincs. A *Trichoderma harzianum* jól hat a bab és a paradicsom bizonyos betegségei ellen, a *Trichoderma lignorum* pedig az uborka és a gabonák gombás betegségei ellen (Steiner, 1994).

Az endofita gombák patogén gombákra gyakorolt gátló hatását más zöldségfajokon is megfigyelték. A paradicsom fitoftóra betegségének kórokozójára, a *Phytophthora infestans*-ra gátló hatást fejtenek ki bizonyos, paprikából, uborkából, tökből, paradicsomból és kínai kelből izolált endofita gombák. Ezek a gátló hatású törzsek a *Fusarium*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Colletotrichum* és *Choniochaeta* nemzetségekbe tartoztak (Kim *et al.*, 2006).

Az endofita gombák gátló hatást gyakorolhatnak a kórokozók mellett a kártevő állatokra is (Hernawati *et al.*, 2011), ezáltal a kártevők elleni biológiai növényvédelem új potenciális forrásai lehetnek. A természetes vegetációban az endofita gombákkal kolonizált magas- és réticsenkesz növények vizsgálatakor a gomba jelenlétének szignifikánsan gátló hatását figyelték meg két kártevőfaj, a viaszos tetvek közé tartozó *Phenococcus solani* és a levéltetvek közé tartozó *Sipha maydis* populációinak növekedésére.

Hernawati és társai Chilében vizsgálták a chilipaprikafajok (*Capsicum annuum* L.) levelének endofita gombáit, és ezen gombák hatását a kártevő *Aphis gossypii* levéltetűfajra. A növények leveleiből felszíni sterilizálást követően öt taxont tudtak azonosítani: *Aspergillus flavus*, *Nigrospora* sp., *Coniophthrychum* sp., illetve steril hifa 1 (SH1) és steril hifa 2 (SH2). Megállapították, hogy míg a levéltetűvel fertőzött és a levéltetűmentes növényegyedekben a gombafajok száma megegyezett, addig ezek gyakorisága eltérő volt. A *Nigrospora* sp., SH1 és SH2 gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a levéltetű mentes növényekben; a többi nemzetség esetén nem volt megfigyelhető különbség. Az endofita gombák hatását a levéltetvek populációdinamikájára és életfolyamataira az egyes izolált törzsekkel mesterségesen megfertőzött leveleken nevelt levéltetű-állományok vizsgálatával mérték fel. Megállapították, hogy az SH1 és SH2 törzs szignifikánsan csökkentette a kártevő termékenységet, emellett az SH2-vel végzett kezelés növelte a levéltetű életciklusának hosszát, és csökkentette a testméretüket. Az előzőekből következően az SH2 törzsnek volt a legerősebb elnyomó hatása az *Aphis gossypii* populációnövekedésére (Hernawati *et al.*, 2011).

A korábbiakban láthattuk a növényekben élő endofita gombák káros és hasznos hatásait a növénytermesztésre, ezen keresztül feltehetőleg az emberiség élelmiszer-előállítására. Emellett egy napjaikra egyre jelentősebbé váló területen is potenciális haszonforrásként lehet rájuk tekinteni, mivel egyes fajaik új lehetőségeket nyithatnak új, az emberiség számára hasznos bioaktív anyagok előállítására. Több endofita gombánál mutatták már ki bioaktív

másodlagos anyagcseretermékek jelenlétét a legkülönbözőbb vegyületcsoportokból: például fenolok, szteroidok, flavonoidok, kinonok, terpenoidok, alkaloidok, cikloalkánok (Schulz és Boyle, 2005). A természetes gyógyszerek és gyógymódok iránti fokozott igény elősegítheti a jövőben ezen erőforrások kutatásának és kiaknázásának elterjedését.

A fejezetben megismerkedtünk az endofita gombák a növénytermesztés és növényvédelem sikerére gyakorolt hatásain túl a humánegészségügyben elfoglalt lehetséges szerepükkel is. Mint ahogy arról a Bevezetésben már szó esett, ezek a gombák nemcsak a növényekkel élnek kapcsolatban, hanem egy bonyolult ökológiai kapcsolatrendszer elemei is. Az endofita gombák gyakran társulnak mikovírusokkal, ezek bemutatása a következő fejezet témája.

3.4.A mikovírusok bemutatása

A vírusok az élő és élettelen szervezetek határán állnak, mivel mindkét csoportra jellemző tulajdonságokat hordoznak. Élettelen szervezetekre jellemző tulajdonságuk a saját anyagcsere hiánya, míg szaporodóképességük az élő szervezetekkel mutat hasonlóságot.

Felépítésük egyszerű: DNS vagy RNS genomból, és az azt körülvevő fehérjeburokból állnak.

Saját anyagcsere nélküli sejtparaziták. Életjelenségeik csak a sokszorozódásra, és ezáltal az öröklődésre korlátozódnak. Szaporodásuk csak a gazdasejtekben lehetséges, bennük a vírus szaporítja magát, tehát nem önállóan szaporodik (Borvendég et al. 2011).

A duplaszálú RNS vírusok a virosok egy speciális csoportját alkotják, közös tulajdonságuk a duplaszálú RNS genom (Maan et al. 2007). A dsRNS vírusok a kórokozók egy nagyon széles csoportját alkotják, vannak közöttük humán és állategészségügyi, illetve mezőgazdasági jelentőségűek is. Sok izokaéder alakú dsRNS vírus markáns strukturális és funkcionális hasonlóságot mutat egymással, ami azt tükrözi, hogy hasonló problémával szembesülve lemásolják dsRNS genomjukat, így elkerülve a kolonizált faj dsRNS-aktív védekezési mechanizmusait (Mertens 2004).

A dsRNS vírusok 8 családba oszthatók: *Birnaviridae*, *Picobirnaviridae*, *Cystoviridae*, *Hypoviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Totiviridae* és *Reoviridae* (Mertens, 2004).

A mikovírusokat először kalapos gombatenyészetekben fedezték fel az 1960-as években (Ghabrial és Suzuki 2009). Azóta már számos gombafajban detektálták őket, aszkuszos és bazídiumos gombákból egyaránt (Yu et al. 2003). A legtöbb mikovírus dsRNS örökítőanyagú

(Pearson et al. 2009). Annak ellenére, hogy már számos, patogén és nem patogén gombákban élő mikovírust fedeztek fel, még csak keveset tudunk a gazdaszervezetben betöltött funkciójukról, biodiverzitásukról és ökológiájukról, azonban azt tudjuk, hogy hatással lehetnek az általuk kolonizált gomba, és ezáltal a gomba növénygazdájának fitneszére és ökológiájára (Feldman et al. 2012). Láthatjuk tehát, hogy a mikovírusok jelentős hatást gyakorolhatnak a növényi mikrobiomokra.

Feldman és munkatársai (2012) az oklahomai magasfüvű préri társulásának tagjait vizsgálták. Összevetették egy speciális parazita növény, a *Cuscuta cuspidata*, és gazdanövénye, az *Ambrosia psilotachya* endofita gombáit, és az azokban található mikovírusokat. A gombákat feszíteni sterilizálást követően tenyésztették ki mindkét növényfajból. A gombákat, illetve a gombákban előforduló dsRNS vírusokat szekvenciaanálízissel azonosították a DNS illetve RNS alapján. A két növényből összesen 25 gombataxont tudtak azonosítani, ezen gombák 10%-a tartalmazott detektálható vírusokat. A gombataxonok között több mikovírustípus közösen megtalálható volt, ebből a kutatók arra következtettek, hogy a mikovírusok a vártnál kevésbé specializáltak. Bár csak 16 mikovírustaxont azonosítottak, ami alacsonyabb, mint az azonosított gombataxonok száma, azonban úgy találták, hogy ezen vírusok fajakkumulációs rátája lehet hogy magasabb mint gombagazdáiké, ezáltal ezek a mikovírusok egy újabb szintet képviselhetnek az ökológiai közösségek biodiverzitásában (Feldman et al. 2012).

4.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Növénynevelés és mintavétel

Kísérleteinkben paprika (*C. annuum*) növényeket, ezen belül is két fajtát, a 'Hó F1' és a 'Kárpia F1' fajtákat vizsgáltunk. A növényeket a Budapesti Corvinus Egyetem soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaság Zöldségtermesztési Ágazatában nevelték növényházi és szabadföldi körülmények között. A magvetésre február 24-én került sor fényszobai körülmények közé, a kiültetés május 5-én történt. A szabadföldi növényegyedek eredeti talajon voltak termesztve csepegtetőcsöves öntözéssel, kordonos műveléssel, míg a növényházi egyedek talajnélküli hajtásban közetgyapoton. A növényegyedek elhelyezése a növényházban ikersorokba 60 és 90 cm-es sor, illetve 33 cm-es tőtávra történt, szabadföldön szintén ikersorba, de a sortávolság itt 40 és 100 cm volt, a tőtávolság megegyezett a növényházzal. A növényházban nevelt egyedek esetén biológiai növényvédelmet alkalmaztak ragadozó atkákkal, emellett három alkalommal Dipel növényvédőszerrel inszekticides kezelést végeztek. Szabadföldön folyamatosan védekeztek a kártevők ellen (Actara, Vertimec, Spintor és Decis Mega szerekkel), fungicides kezelésre egy alkalommal, július 14.-én került sor Amistar Top növényvédőszerrel.

A két paprikafajtában ('Hó F1' és 'Kárpia F1') előforduló endofita gombákat az egész tenyészidőszak alatt vizsgáltuk, az egyes mintavételek során valamennyi előforduló szervből, mindkét termőhelyen mintát véve. Az egyes mintavételeket görög betűkkel jelöltük. Az első két, azaz az α (április 11.) és β (május 10.) mintavételezéskor még nem voltam személyesen jelen, azokat még növényházban nevelt palántákról végezték (gyökér, szár, levél szervekből). A γ mintavételezéskor augusztus 22-én hét különböző növényi részt (fiatal levél, idős levél, fiatal termés, érett termés, érett termés kocsánya, szár, gyökér), a δ mintavételkor október 17.-én nyolc különböző növényi részt (fiatal levél, idős levél, fiatal termés, érett termés, érett termés kocsánya, szár, gyökér, idős termés magja) gyűjtöttünk be.

Fiatal levél alatt minden mintavételezéskor a hajtáscsúcstól számított első kifejlett levelet értettük, míg az idős levélnek a hajtáscsúcstól számított 6.-8. kifejlett levelet tekintettük. Fiatal termés volt az, aminek perikarpiuma még teljesen zöld volt, érett termés alatt már a biológiai érettségben lévő (azaz 'Hó F1' esetében narancssárgás-bíbor, 'Kárpia F1' esetében

egyöntetűen élénkpiros színű) perikarpiumú terméseket értettük. A szár mintáit a hajtáscsúctól számítva 15 cm-re lévő, még nem fásodott szárszakaszból vettük.

Mindkét fajtából vettünk mintát szabadföldön és növényházban is, és mindezt háromszoros ismétléssel (tehát egy adott típusból, például szabadföldi 'Kárpia F1' három különböző egyedről). A γ mintavételezéskor ennek megfelelően 84, míg a δ mintavételezésnél 96 szervből nyert mintával dolgoztunk. A gyökeret a szabadföldi egyedeknél a talajt meglazítva a talajszint alól gyűjtöttük be, míg a növényházi egyedeknél a közetgyapotkockát megbontva a tápközegből húztunk ki néhány gyökérszálat.

Az egy növényegyedről származó begyűjtött szerveket műanyag zacskóba tettük, a zacskókon jelöltük a növény fajtáját (Hó/Kárpia), a termesztési helyet (Szabadföldi/Növényházi), és a növényegyed sorszámát (1/2/3). A mintákat a laboratóriumban megfelelő sterilizálás után klóramfenikolos PDA táptalajra téve megkezdtük az endofita gombák kitenyésztését.

4.2 A növények felszíni sterilizálása és az endofita gombák kitenyésztése

4.2.1. Klóramfenikolos PDA táptalaj készítése

1 literes üvegbe bemértünk 39 g PDA port (Biolab, PDA 20500), majd 1 g klóramfenikolt. Az üveget a nyak alsó peremén lévő 1 literes jelig töltöttük desztillált vízzel. Rácsavartuk az üvegre a kupakját, és alaposan összeráztuk, ezt követően autoklávoztuk 1,2 baron 25 percig. A kész táptalajt steril körülmények között hőlégsterilizátorban sterilizált 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe töltöttük.

4.2.2. Felszíni sterilizálás és a kitenyésztés elindítása

Az endofita gombák kitenyésztése előtt a gyűjtött minták felszínét gondosan sterilizáltuk. Az egész folyamatot steril fülkében végeztük. A felszíni sterilizáláshoz használt oldatokat előzőleg hőlégsterilizátorban fertőtlenített befőttesüvekbe töltöttük, az üvegek felhasználásig alufóliával voltak lezárva, csak a steril fülkében nyitottuk ki őket. A növények felszíni sterilizálását 1 percig 70%-os etanolban, majd 10 percig 1%-os hipokloritban (háztartási hypo frissen ötszörösére hígítva), majd még egyszer 1 percig 70%-os etanolban történő áztatással végeztük, ezt követte a 2X1 perces steril desztillált vizes öblítés. Az öblítésre használt steril desztillált vizet az egyes minták között mindig cseréltük.

A felszíni sterilizáláson átesett növénydarabkákat lelángolt csipesszel steril Petri-csészére helyeztük, majd szikével 9 darabkát vágtunk le belőlük, és ezeket helyeztük a klóramfenikolos PDA táptalaj felszínére. Ezután a táptalajt tartalmazó csészét folpackkal lezártuk és feliratoztuk. A csészéken a következő adatokat tüntettük fel:

- a növény fajtája;
- a növényegyed száma;
- szabadföldi, vagy növényházi-e;
- a vizsgált szerv neve;
- dátum.

A csészéket megvilágítás nélkül szobahőmérsékleten inkubáltuk, néhány nap elteltével elkezdődött a gombatelepek megjelenése.

4.2.3. A tenyésztés eredményeinek kiértékelése

A gombatenyészeteket 14 nap elteltével értékeltük, amikor már várhatóan minden tenészhető gomba megjelent, de a telepek még nem nőttek össze. Mindenekelőtt megszámloltuk, hogy hány növénydarabkából fejlődött ki gombatelep. Az adatokat táblázatban rögzítettük. Emellett feljegyeztük, ha valamely növénydarabkából baktérium tenyésztett ki, vagy a csésze feltehetőleg kívülről származó gombával befertőződött. Ezután reprezentatíván kiválasztottuk azokat a telepeket, melyeket a későbbiekben izolálni szeretnénk, ezeket a Petri-csésze alján megjelöltük. Igyekeztünk minél többféle gombatelepet kiválasztani, ahol egy Petri-csészéről többet is izolálni kívántunk, ott a kiválasztott telepeket sorszámoztuk.

A megjelölt telepeket átoltottuk klóramfenikolos PDA táptalajra. A γ mintavételezéskor 65 kiválasztott gombatelepet izoláltunk, míg a δ mintavételezésből 53-at.

4.3. A kiválasztott gombatelepek izolálása

Az izolálás munkamenete:

1. Steril fülkében leszedtük a záró fóliát a kioltásra váró gombát tartalmazó Petri-csészéről.
2. Egy éles szikét alkoholba mártottunk, majd alaposan leégettünk.
3. Mivel a magas hőmérséklet ártana a gombatelepnek, a szikét használat előtt le kellett hűteni. Ezt úgy végeztük, hogy a pengét bemártottuk abba a steril táptalajba, melybe a gombát át készültünk oltani.

4. A steril csészét becsuktuk, az izolálendő telepet tartalmazót kinyitottuk, és a szikével az izolálásra kiválasztott telepből egy néhány milliméteres darabkát kivágtunk, és a szike hegyével kiemeltük. Ezt követően a csészét visszacsuktuk.
5. Kinyitottuk a steril táptalajt tartalmazó Petri-csészét, és a gombatelepe darabot a szike hegyével a csésze közepére helyeztük, a gombás oldalával lefelé. A szikét ismét lelángoltuk, és hagytuk egy kicsit kihűlni, mielőtt ismét az alkoholba mártottuk volna.
6. A csészét lefedtük, feliratoztuk, és folpackkal lezártuk.

Ha egy csészből több telepet is izoláltunk, akkor azokat külön steril Petri-csészébe helyeztük, és a csészéken bekarikázva jelöltük azt a sorszámot, amit kiválasztáskor megadtunk. Ezen kívül feltüntettünk minden adatot, amit a kitenyésztésre használt Petri-csészéken is feltüntettünk. Ekkor már nem írtuk ki az adatokat teljes részletességgel, hanem egy visszakereshető angol nyelvű rövidítésre tértünk át.

Magyarázat a jelölés beazonosítására a γH_2inFS ① jelölés példáján:

γ	mintavétel (γ/δ)
H	paprika fajta ('Hó F1'/'Kárpia F1')
2	növényegyed sorszáma (1/2/3)
in	növény tenyészhelye (inside/outside)
FS	szerv angol nevének rövidítése (S: szár, R: gyökér, YL: fiatal levél, OL: idős levél, YF: fiatal termés, MF: érett termés, FS: érett termés kocsánya)
①	izolálásra kijelölt gombatelepe sorszáma

A mintavételezéstől számított 21 nap után újra átnéztük a kitenyésztésre használt Petri-csészéket, és megszámoltuk az eltelt idő alatt újonnan megjelent gombatelepeket. Ezek közül a γ -nál nyolc, a δ -nál pedig kettő került kiválasztásra, amelyeket az előzőekben leírtak szerint szintén izoláltunk.

4.4 Az izolált gombatelepek morfológiai csoportokba osztása

Egy hét elteltével az izolált és növekvő gombatelepeket külső morfológiai tulajdonságaik alapján csoportokba rendeztük, az azonos csoportokba tartozókat egy betűjellel jelöltük (γ -nál: „A-AD”-ig, δ -nál: „DA-EC”-ig). Ezt a jelölést is feltüntettük a mintákon.

Ezt követően meghatároztuk az endofita gombák előfordulásának gyakoriságát az egyes mintákban, és ezen belül az egyes morfológiai csoportok gyakoriságát is. Az adatokat statisztikai módszerekkel értékeltük.

4.5. Az adatok statisztikai kiértékelése

A statisztikai kiértékelést annak megállapítása érdekében végeztük, hogy a kapott adatsorok eltéréseit elfogadhatjuk-e szignifikáns különbségként. Kettőnél nagyobb számú adat összehasonlítása esetén a szignifikáns különbség megállapítására χ^2 -próbát, míg az adatok páronként összehasonlítására z-próbát végeztünk. Elsőfajú hibának (α) 5%-ot tekintettünk. Nullhipotézisünk az volt, hogy az adatok nem különböznek szignifikánsan. Ha a próba elvégzése végén kapott érték alacsonyabb volt az elsőfajú hibánál (azaz 0,05-nél), akkor a nullhipotézist elvetettük, tehát az adatokat szignifikánsan különbözőnek fogadtuk el. Ha az érték magasabb volt, a nullhipotézist fogadtuk el. A későbbi táblázatokban a szignifikáns különbséget narancssárga, míg a nem szignifikáns különbséget zöld színnel jelöltük.

4.6. Az izolált gombatelepek monospórást és monohifásítást

Következő lépésként monospórást, a nem sporuláló törzseknél monohifásítást történt a tökéletes izolálás érdekében, majd a monospórást és monohifásított telepekből egy ferdeagaros bankot hoztunk létre. Ezeket a munkafolyamatokat Neda Haddaddehfi végezte.

4.7 Az izolált gombatelepek duplaszálú RNS tartalmának vizsgálata

4.7.1. A munkafolyamat célja

A munkafolyamat célja annak megállapítása volt, hogy a korábbiakban leírt módon kitenyésztett, izolált és monospórást-monohifásított endofita gombák tartalmaznak-e duplaszálú RNS-t, a dsRNS jelenléte ugyanis gombavírus fertőzésre utalhat. Ennek kimutatása érdekében először nagytömegű gombahifát kellett előállítanunk a reprezentatív kiválasztott törzsekből, ezekből teljes nukleinsav-kivonatot kellett készítenünk, majd immunoblotolással megállapítani, hogy az adott törzs tartalmazott-e dsRNS-t. A vizsgálathoz 28 mintát használtunk fel. A minták kiválasztásának legfőbb szempontja az volt, hogy minél többféle törzset, minél több morfológiai csoportból vizsgálhassunk az immunoblotolással, és így lehetőleg átfogó képet nyerjünk az endofita gombák esetleges vírusfertőzöttségéről.

4.7.2. A felszaporítás előkészítése

A nagytömegű gombafelszaporítást folyékony táptalajon végeztük. Ehhez a kiválasztott törzseket a hidegszobában tárolt monospórást, illetve monohifásított anyatelepekről először normál PDA táptalajra oltottuk át, majd az azon kitenyésztett gombatelepet feldarabolva vittük át a felszaporításhoz használt folyékony táptalajba.

4.7.3. A folyékony táptalaj készítése

A felszaporításhoz 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokat használtunk, ezeket vattadugóval zártuk le. A folyékony táptalajt az alábbi recept szerint állítottuk össze (1 liter táptalajra számolva):

1. 1 l táptalajra 150 g meghámozott burgonyát és 20 g kristálycukrot számolunk.
2. A meghámozott burgonyát apró kockákra vágjuk, és annyi vízben, ami bőven ellepi (de kevesebb, mint a kész táptalaj térfogata), minimum 30 percig főzzük, hogy szerkezete szétessen, a benne lévő nukleinsavak lebomoljanak.
3. A megfőtt burgonyának leszűrjük a levét, és ehhez hozzáadunk 20 g kristálycukrot.
4. A cukrot feloldjuk, és az edényt addig töltjük tiszta csapvízzel, amíg a táptalaj térfogata 1 liter nem lesz.

A felszaporításhoz mi 10 liter folyékony táptalajt készítettünk, ehhez tehát 1500 g apróra vágott burgonyát és 200 g kristálycukrot használtunk fel.

A tenyésztést 500 ml-es lombikokban végeztük, ezekbe szűrőanyagon keresztül (géz) tölcsérrel 250 ml táptalajt töltöttünk. A mennyiséget mérőhengerben mértük ki. A lombikokat bedugtuk a vattadugóval, majd dupla alufólia borítással befedtük őket. A fólia ráhelyezése előtt a vattadugókat annyira kijebb húztuk a lombik nyakában, hogy a fóliával megfogva a későbbiekben azzal együtt leemelhető legyen anélkül, hogy a vattadugót kézzel meg kellene érinteni. A táptalajok autoklávozását a Varioklav autoklávban végeztük.

4.7.4.A felszaporítás indítása

A felszaporításhoz a kívánt gombatelepből lehetőleg apró darabkákat kellett sterilen a folyékony táptalajba juttatnunk, hogy hatékonyan meginduljon a gombák nagytömegű felszaporodása.

A folyékony táptalajra oltás lépései:

1. A folyékony táptalajt tartalmazó lombikról óvatosan lefejtettük az alufóliát, és azzal együtt leemeltük a vattadugót úgy, hogy a fólia steril oldalához és a dugóhoz kézzel nem értünk.
2. Lelángoltuk a lombik száját.
3. Kinyitottuk a Petri-csészét, amiben a gomba nőtt, leégetett szikével apró kockákat (kb. 5x5mm méretűt, kb. 20-30 darabot) vágunk a gombatelepből a táptalajjal együtt, lehetőleg a telep szélén lévő aktívan növekvő területről.
4. A levágott telepdarabokat a szike hegyének segítségével a lombikban lévő folyékony táptalajba szórtuk.
5. Ismét lelángoltuk a lombik száját, és a lombikot lezártuk.

A folyékony táptalajra oltott gombatenyészeteket 2-3 hétig szobahőmérsékleten, megvilágítás nélkül inkubáltuk. Eközben néhány naponta körkörös mozdulatokkal átmozgattuk a folyékony táptalajban tenyésző gombát, hogy egyenletesen jusson oxigénhez minden része. A folyékony táptalajon felszaporodott gomba akkor alkalmas a nukleinsav-kivonásra, amikor már elég nagy tömegű, de még nem lépnek fel oxigénhiányos állapotok, amik telepdarabok pusztulását okoznák.

4.7.5.A felszaporított gombákból történő nukleinsav kivonás

4.7.5.1 A gomba sejtjeinek feltárása

A folyékony táptalajon felszaporított gombákról óvatosan leöntöttük a folyékony táptalajt, majd egy kis desztillált vizet öntöttünk a lombikba, és ezzel óvatosan átmostuk a telepet. Majd ezt is leöntöttük róla, és a tiszta gombatelepet főzőpohárba csúszttattuk.

A gombatelepet késsel nagyobb darabokra vágtuk, egy kis desztillált vizet öntöttünk hozzá, majd késes darálóval pépesítettük (fizikai sejtfeltátás).

4.7.5.2. A nukleinsav kivonás menete

1. 50 ml-es centrifugacsőbe 20 ml, vízfürdőben 65 °C-ra előmelegített 2%-os CTAB oldatot (2 % CTAB, 100 mM Tris pH:8,0, 20 mM NaEDTA, 1,4M NaCl) töltöttünk.
2. A feltárt gombapépből kb. 10ml-t hozzáöntöttünk.
3. Vízfürdőben 65 °C-on inkubáltuk 30-40 percen át.
4. Fülke alatt hozzáöntöttünk 20 ml kloroformot, alaposan összeráztuk.
5. 15 perc 4500 rpm fordulatszámú centrifugálás után a felülúszót átpipettáztuk új centrifugacsőbe.
6. A felülúszóhoz 20 ml kloroformot öntöttünk fülke alatt, és alaposan összeráztuk, majd 15 percig 4500 rpm-nél centrifugáltuk.
7. A felülúszót óvatosan új, steril centrifugacsőbe pipettáztuk, majd kétfelé osztottuk.
8. 3 ml 3 M Na-acetátot (pH=5,2) pipettáztunk hozzá.
9. 1,5 térfogat -20 °C -os etanolt töltöttünk hozzá, ezzel kicsaptuk a nukleinsavakat. Az alkohollal kicsapott nukleinsavat tartalmazó centrifugacsöveket néhányszor óvatosan megforgattuk, hogy összekeveredjen, de a nukleinsavak ne sérüljenek.
10. A csöveket minimum 1 órára -20°C-ra tettük
11. 1 óra elteltével a csöveket 4500 rpm-nél 5 percig centrifugáltuk.
12. A felülúszót elöntöttük, a csapadékot 500 µl 70 %-os -20 °C-os etanollal mostuk, majd ismét 5 percig 4500rpm-nél centrifugáltuk.
13. Az alkoholt leöntöttük, a csapadékot szárítottuk, majd 100 µl steril Milli-Q vízben fölvevük.
14. A mintákat ezután hűtőszekrényben +4°C-on tároltuk.

A kész minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop készülékkel ellenőriztük.

4.7.6. Az immunoblottolás folyamata

4.7.6.1.A nemdenaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

A blottolást megelőzően a nukleinsavakat 5% PAA-0,5XTBE gélen választottuk el. Egy nagy gélre 30 ml oldatot számítottunk.

30 ml 5% PAA- 0,5X TBE gél összetétele:

- 4,96 ml 30% akrilamid oldat
- 3 ml 5X TBE
- 21,81 ml Milli-Q víz
- 250 µl 10% APS oldat
- 15 µl TEMED

Az APS-t és a TEMED-et csak közvetlenül az öntés előtt kevertük a gélbe. A még folyékony oldatot pipettával juttattuk a két üveglap közé, majd belehelyeztük a fésűt.

Minden zsebbe 50 µg mintát igyekeztünk felvinni. Minden mintához 10 µl mintapuffert (1xLB) adtunk. A futtatást egy éjszakán át végeztük a xilencianol gél aljára futásáig (60V: 13 óra majd 30V: 1 óra 40 perc). Markerként a reovirus Dearing törzs genomi RNS-ét használtuk (Joklik, 1981).

4.7.6.2. A félszáraz blottolás folyamata

1. A blottolandó gél a gél méreténél minden irányban 1-1cm-rel nagyobb, 0,5X TBE pufferrel átitatott pozitív töltésű membránra (Zeta-Probe, BioRad) helyeztük. A gél és a membrán 2-2db, szintén 0,5X TBE pufferrel előre átitatott Whatman 3MM szűrőpapírral szendvicsbe fogva került a Semi-Dry (BioRad) elektroblott készülékbe. Ezt a gyakorlatban úgy valósítottuk meg, hogy a készülékbe alulra behelyeztük a negatív szivacsot, egy szintig feltöltöttük pufferrel, a szivacsra helyeztünk 2 szűrőpapírt, erre a gél, a gélre a blottmembránt, majd erre ismét 2 réteg szűrőpapírt és végül a másik szivacsot. A „szendvics” egyes rétegeinek felhelyezése során a rétegeket a pufferrel gondosan nedvesítettük, és ügyeltünk arra, hogy ne maradjanak közöttük légbuborékok. A blottolás időtartama 0,5 A áramerősségnél 2 óra volt.
2. A blottolást követően szétszedtük a „szendvicset”, és a membránon ceruzával bejelöltük a zsebek helyét.

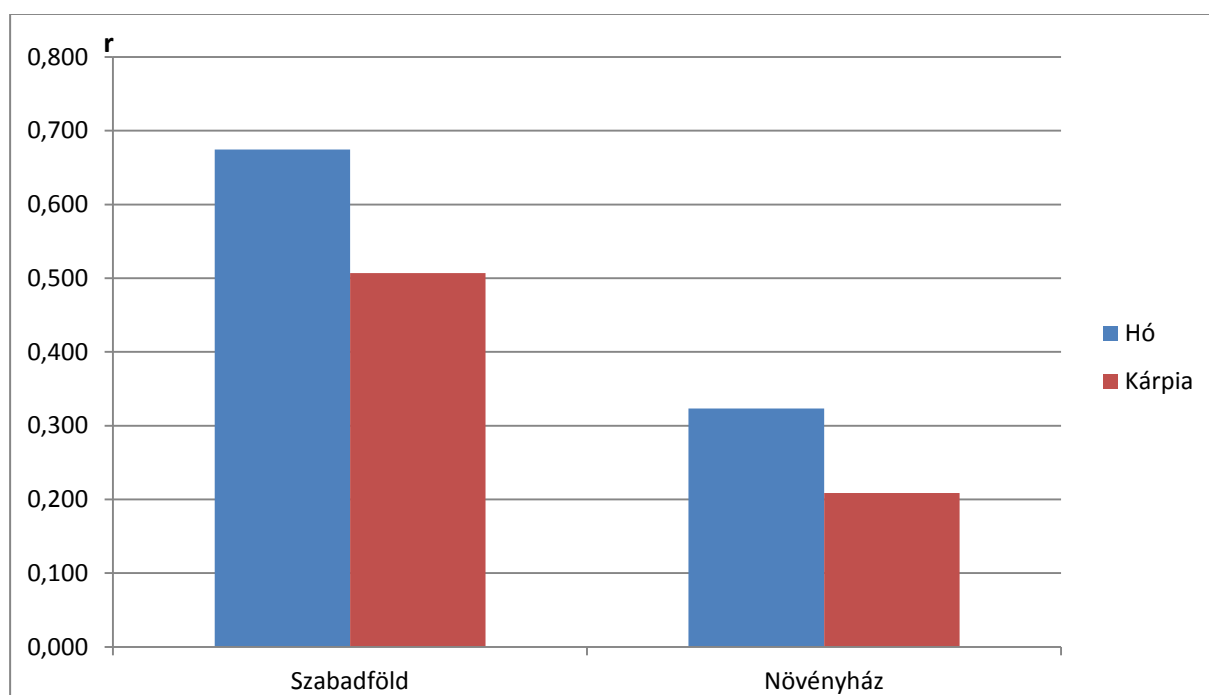
3. A gél Sammons- Schumacher ezüsfestéssel megfestettük, hogy ellenőrizzük a blottolás sikerességét. Az ezüsfestés menete:
 - i. A gél fixálóoldatban inkubáltuk egy éjszakán át. Fixálóoldat: 20 v/v% metanol és 0,5 v/v% ecetsav.
 - ii. A gél 30 percig festőoldatban inkubáltuk. A festőoldat 0,19 w/v%-os AgNO_3 oldat (azaz 1000ml oldatba 1,9 g AgNO_3 -kristály került).
 - iii. Négyyszer 15 másodpercig mostuk desztillált vízben
 - iv. A gél előhívóoldattal előhívtuk. Az előhívóoldat összetétele: 0,08 g/l NaBH_4 ; 15 g/l NaOH ; 4ml/l 36%-os formaldehid-oldat. A gél először átmostuk az előhívóoldatban, majd az előhívóban óvatosan rázogattva előhívtuk, amíg a kívánt színt el nem érte.
 - v. Leállítás: minimum 10 perces áztatás Na_2CO_3 (a gél sötétíti), vagy 5%-os ecetsavban (a gél világosabb lesz).
4. A szabadon maradt kötőhelyeket telítettük a membránon 100 ml 1X-es PBS-t és 0,5 g Blocking reagenst (Roche, 11 096 176 001) használva. A membránt 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az oldatban.
5. A dsRNS-specifikus J2 ellenanyag kötése. Az antitest hibridóma felülúszó formájában van fagyasztva, ezt használat előtt felolvasztottuk, és 1:1 arányban meghígítottuk 1X PBS+1%BSA-val. A membránt ebben az elsődleges ellenanyagban óvatosan rázatva +4°C-on inkubáltuk egy éjszakán át.
6. Mosás 1X PBS+0,1% TritonX-100-ban 2X 30 percig rázóasztalon enyhén rázatva.
7. Másodlagos ellenanyag kötése az elsődleges ellenanyaghoz. A másodlagos ellenanyag alkalikus foszfátazzal konjugált kecske anti-egér – IgG(H+L) volt, ezt 5000-szeres hígításban használtuk. Az oldat puffere: 1X PBS + 1% BSA.
8. Mosás 1X PBS + 0,1% TritonX-100 pufferben 2X 15 percig
9. Detektálás: A másodlagos ellenanyaghoz kötött alkalikus-foszfátáz szubsztátjai a BCIP és NBT; a termékük ibolyaszínű. Immunoblott-előhívó puffer: 100nM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl és 5 mM MgCl_2 . A szubsztátok koncentrációja: 175 $\mu\text{g/ml}$ BCIP (cc. dimetil formamidban oldva) és 340 $\mu\text{g/ml}$ NBT (70%-os dimetilformamidban oldva) volt. A membránt az előhívóoldatban a kívánt szín eléréséig tartottuk, utána beszkeneltük.
10. A membránt desztillált vízzel lemostuk és megszáritottuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1 . Az endofita gombák általi kolonizáltság

5.1.1 Az egyes fajták endofita gomba általi kolonizáltságának mértéke a különböző termőhelyeken

A növények endofita gombák által történő kolonizálását a termőhely nagyban befolyásolhatja, ezért a 'Kárpia F1' és a 'Hó F1' paprikafajták egyedeinek kolonizációs rátáját mind szabadföldi, mind növényházi körülmények között megvizsgáltuk, az egész tenyészedőszakban követve a folyamatot. Az összehasonlítás lehetősége csak a harmadik mintavételi időponttól volt adott, hiszen az első két mintavétel a mindkét termőhelyre palántaházban közösen végzett palántanevelés időszakában történt.



1. ábra: Az egyes fajták kolonizációs rátája a két termőhelyen (Kolonizációs ráta=kolonizált/minden vizsgált minta)

1. táblázat: A két fajta kolonizáltságának statisztikai kiértékelése a termőhely függvényében (narancssárga: szignifikáns különbség, zöld: nincs szignifikáns különbség; *: $1\% < \alpha < 5\%$, **: $0,0\% < \alpha < 1\%$, ***: $\alpha < 0,1\%$)

Termőhely	Hó-Kárpia
Szabadföld	***
Növényház	

2. táblázat: A két termőhely kolonizáltságának statisztikai kiértékelése a fajta függvényében (narancssárga: szignifikáns különbség, zöld: nincs szignifikáns különbség; *: $1\% < \alpha < 5\%$, **: $0,0\% < \alpha < 1\%$; *: $\alpha < 0,1\%$)**

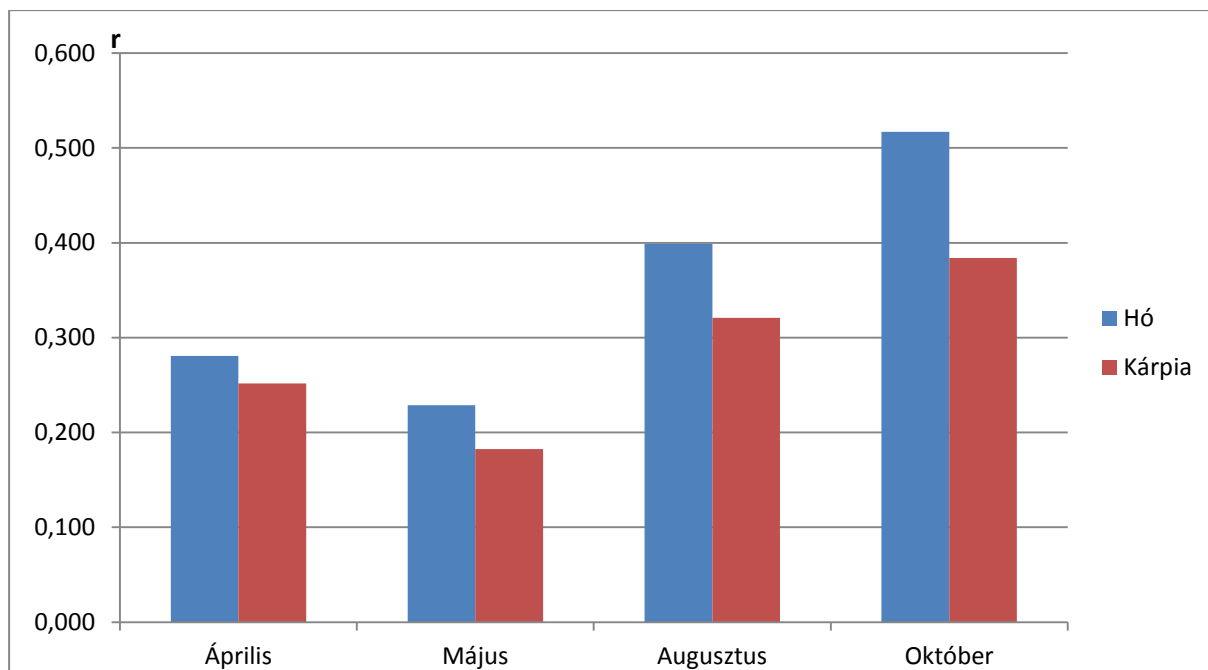
Fajta	Szföld-Nház
Hó	***
Kárpia	***

A két fajta kolonizációs rátájának összehasonlítása a két termőhelyen az 1. ábrán látható. A kolonizációs ráta kiszámításánál valamennyi szervből kitenyésztett gombát figyelembe vettünk, azaz kolonizációs ráta alatt az összes kolonizált minta és az összes minta hányadosát értjük. A grafikonon jól látható a két fajta közötti különbség, de ez csak a szabadföldi egyedek esetén jelent szignifikáns különbséget (1. Táblázat), itt a kúpos típusú 'HÓ F1' fajta kolonizáltsága nagyjából 25%-kal magasabb a kárpia típusú 'Kárpia F1' fajtaénál.

Az ábrán azonnal szembeüt, hogy a szabadföldi termőhelyen mindkét fajta esetében magasabb a kolonizáltság, a különbség statisztikailag vizsgálva is szignifikáns (2.táblázat), a két termőhely között nagyjából kétszeres a kolonizáltság aránya.

5.1.2. Az egyes fajták kolonizációs rátája a tenyésztési függvényében

Megfigyeléseket végeztünk arra vonatkozóan, hogy hogyan változik a fajták kolonizáltsági rátája a tenyésztési időszak folyamán. Eredményeinket a 3. ábra mutatja. Ebben az esetben is együttesen kezeltünk valamennyi szervből vett mintát.



2. ábra: Az egyes fajták kolonizációs rátája a tenyésztő függvényében (Kolonizációs ráta=kolonizált/minden vizsgált minta)

3. táblázat: Az egyes hónapok kolonizációs rátájának statisztikai kiértékelése a fajta függvényében (narancssárga: szignifikáns különbség, zöld: nincs szignifikáns különbség; *: $1\% < \alpha < 5\%$, **: $0,0\% < \alpha < 1\%$; ***: $\alpha < 0,1\%$)

Fajta	Khinégyzet	ápr.-máj	ápr.-aug	ápr.-okt.	máj-aug	máj-okt.	aug-okt.
Hó	***		**	***	***	***	***
Kárpia	***			**	***	***	*

4. táblázat: A két fajta kolonizáltságának statisztikai kiértékelése a tenyésztőszak függvényében (narancssárga: szignifikáns különbség, zöld: nincs szignifikáns különbség; *: $1\% < \alpha < 5\%$, **: $0,0\% < \alpha < 1\%$; ***: $\alpha < 0,1\%$)

Hónap	Hó-Kárpia
Április	
Május	
Augusztus	*
Október	***

A 2. ábra azt mutatja, hogy a növényegyedek kolonizációs gyakorisága a tenyésztőszak folyamán közel duplájára növekedett. Bár a diagramon az áprilisi és májusi kolonizáltság között egy kis különbség látható, ez statisztikailag nem szignifikáns egyik fajta esetében sem (3. táblázat). A május-augusztus illetve augusztus- októberi minták közötti különbség viszont már a Hó F1 és a Kárpia F1 fajta esetében is szignifikáns (3. táblázat), tehát a kolonizáltság növekedése ezekben az időszakokban már statisztikailag is kimutatható volt. Összevetettük a nem egymást követő mintavételek kolonizáltsági eredményeit is. Itt érdemes

megemlíteni, hogy az áprilisi és augusztusi értékek esetében a Hó F1 fajta esetén a különbség szignifikáns volt, míg a Kárpia F1 fajta esetén nem (3. táblázat).

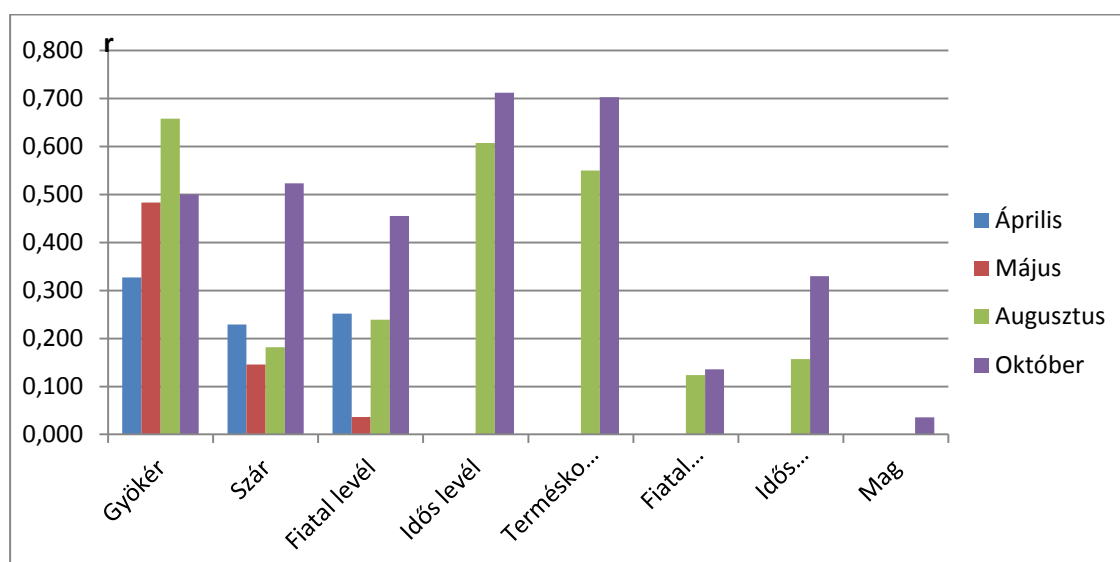
Első pillantásra meglepőnek tűnik, hogy májusban az áprilisinál alacsonyabb kolonizáltsági értékeket látunk, és bár ez nem szignifikáns különbség, lehetséges okaira a diszkusszióban részletesen kitérünk. Itt annyit jegyeznénk meg, hogy a májusi mintavételben voltak a fiatal növényi szervek legnagyobb arányban reprezentálva, ezért feltételezzük, hogy a kismértékű csökkenést az általában kevésbé kolonizált fiatal szervek magas részaránya okozhatta.

A kiültetést követően az endofita kolonizáltság a tenyészidőszak végéig erősen növekedett, és az áprilisi nagyjából 25%-os átlagról októberre elérte a 45%-ot.

Ezen a diagramon is látható a két fajta közötti eltérés, ez azonban csak augusztus és október hónapokban jelentett szignifikáns különbséget (4. táblázat). Eszerint a tenyészidőszak második felében (azaz idősebb növényegyedek esetén) már statisztikailag is bizonyítható különbség van a két fajta endofita gombákkal való társulására való fogékonyságára.

5.1.3. Az egyes növényi szervek kolonizációs rátája a tenyészidőszak folyamán

Vizsgálatunk egyik lényegi pontja volt, hogy az endofita gombák a növény mely szerveiben milyen gyakoriságban fordulnak elő, mert ennek fontos növényvédelmi, esetleg akár humánegészségügyi vonatkozásai lehetnek.



3. ábra: Az egyes növényi szervek kolonizációs rátája (Kolonizációs ráta=kolonizált/minden vizsgált minta)

6. táblázat: Az egyes növényi szervek kolonizációs rátájának statisztikai kiértékelése (narancssárga: szignifikáns különbség, zöld: nincs szignifikáns különbség; *: $1\% < \alpha < 5\%$; **: $0,0\% < \alpha < 1\%$; ***: $\alpha < 0,1\%$)

Szerv	Khinégyzet	ápr.-máj	ápr.-aug	ápr.-okt.	máj-aug	máj-okt	aug-okt.
Gyökér	***	*	***	**	**		**
Szár	***			***		***	***
Fiatal levél	***	***		***	***	***	***
Idős levél							*
Érett termés kocsánya							**
Fiatal termés							
Érett termés							**

A 3. ábrán az egyes szervek kolonizáltsága látható a négy mintavételnek megfelelő hónapokban (április és május hónapokban csak gyökérről, szárból és fiatal levélből vettünk mintát). Általános tendenciaként itt is megfigyelhető, hogy az egyes szervek kolonizáltsága a tenyészedőszak folyamán fokozatosan növekedett, azonban nem egyforma mértékben, és nem minden esetben szignifikánsan, illetve ettől a trendtől való eltérések is megfigyelhetők.

A gyökér kolonizáltsága folyamatos egyöntetű növekedést mutatott augusztusig, októberben azonban csökkent a mértéke. Ezt mutatja az 5. táblázat is, ahol látható, hogy a gyökér kolonizáltságában bekövetkező változások statisztikailag értékelhetők. Tehát az április és május (32,7%-ról 48,4%-ra), illetve a május és augusztus (48,4%-ról 65,8%-ra) között történt növekedés, és az augusztus és október (65,8%-ról 50,0%-ra) közötti csökkenés is szignifikánsak. A májusi és októberi kolonizáltság között nem mutatható ki szignifikáns különbség, tehát ezen két hónap kolonizáltsága közel megegyezik. Jól látszik, hogy a gyökér egyike a növény legmagasabb arányban kolonizált szerveinek, ez is jól mutatja, hogy milyen fontos szerepe van a termesztőközeg megválasztásának az endofita gombák terjesztésében.

A szár kolonizáltsága viszonylag alacsony maradt a tenyészedőszakban, azonban októberben hirtelen megugrott (52,3%-ra), az egymást követő hónapok mintáiban csak itt volt szignifikáns különbség kimutatható (5. táblázat).

A fiatal levelek adatainál jól megfigyelhető egy májusi visszaesés (az áprilisi 25,2%-ról 3,6%-ra), ez statisztikailag is értékelhető (5. táblázat), ami azt a feltevésünket támasztja alá, hogy a gombák gyorsan fejlődő növényi szövetekbe való betelepülése nem következik be azonnal, hanem idővel, fokozatosan megy végbe. Az augusztusi és októberi minták között a növekedés szintén szignifikáns volt, míg az áprilisi és az augusztusi kolonizáltság szinte megegyezett, köztük statisztikai különbség nem kimutatható.

Az idős levelek kolonizáltsága már az augusztusi mintavétel idején is nagyon magas volt (60,71%), és októberre további enyhe emelkedést mutatott (71,2%-ra), ami statisztikailag is kimutatható volt (5. táblázat).

Az érett termés kocsányának kolonizáltsága augusztus és október hónapokban is magas volt (55,0, illetve 70,3%), a közöttük lévő különbség szignifikáns (5. táblázat).

A fiatal termésfal kolonizáltsága augusztusban és októberben is alacsony volt (12,4, illetve 13,6%, a köztük lévő kis különbség nem tekinthető szignifikánsnak (5. táblázat).

Az érett termésfal kolonizáltsága magasabb volt (augusztusban 15,7, októberben 33,0%) mint a fiatal termésfalé. A két hónap közötti különbség szignifikáns (5. táblázat).

A magok endofita gombák általi kolonizáltságát rendkívül alacsonynak, szinte elhanyagolhatónak találtuk. A fejezetben leírt változások lehetséges okaira és következményeire a Diskusszió fejezetben részletesen kitérünk.

6.táblázat: Az egyes szervek közötti kolonizációs különbségek statisztikai kiértékelése az egyes hónapokban (narancssárga: szignifikáns különbség, zöld: nincs szignifikáns különbség; *: $1\% < \alpha < 5\%$, **: $0,0\% < \alpha < 1\%$, ***: $\alpha < 0,1\%$)

Szerv	Április	Május	Augusztus	Október
Gyökér/Szár	*	***	***	
Gyökér/Fiatal levél		***	***	
Szár/Fiatal levél		**		
Gyökér/Idős levél				***
Gyökér/Terméskocsony				***
Gyökér/Fiatal termésfal			***	***
Gyökér/Érett termésfal			***	**
Gyökér/Mag				***
Szár/Idős levél			***	**
Szár/Terméskocsony			***	**
Szár/Fiatal termésfal				***
Szár/Érett termésfal				**
Szár/Mag				***
Fiatal levél/Idős levél			***	***
Fiatal levél/Terméskocsony			***	***
Fiatal levél/Fiatal termésfal			*	***
Fiatal levél/Érett termésfal				*
Fiatal levél/Mag				***
Idős levél/Terméskocsony				
Idős levél/Fiatal termésfal			***	***
Idős levél/Érett termésfal			***	***
Idős levél/Mag				***
Terméskocsony/Fiatal termésfal			***	***
Terméskocsony/Érett termésfal			***	***
Terméskocsony/Mag				***
Fiatal termésfal/Érett termésfal				***
Fiatal termésfal/Mag				*
Érett termésfal/Mag				***

A 6. táblázatból kiolvasható, hogy az egyes szervek kolonizáltsága között volt-e szignifikáns eltérés az egyes hónapokban. A táblázatot az ötödik ábrával összevetve megállapítható, hogy mely szervek adott hónapban felmért kolonizáltsága között volt szignifikáns eltérés, és a két szerv közül melyiknek és mennyivel volt magasabb a kolonizációs rátája.

A gyökér és a szár összevetéséből látható, hogy a gyökér kolonizáltsága áprilistól augusztusig magasabb volt, mint a száré, azonban októberben ez a szignifikáns eltérés megszűnt.

A gyökér és a fiatal levél összehasonlítása azt mutatja, hogy a tenyészidőszak elején és végén (áprilisban és októberben) nem volt szignifikáns különbség a két szerv kolonizáltsága

között, míg májusban és augusztusban a gyökér kolonizáltsága szignifikánsan magasabb volt a fiatal levélénél.

A szár és a fiatal levél kolonizáltsága nagyjából megegyezett a tenyészidőszak folyamán, egyedül májusban volt a fiatal levél kolonizáltsága szignifikánsan alacsonyabb a szárénál.

Gazdaságilag fontos még megvizsgálunk a kocsány, a fiatal- és érett termésfal kolonizáltságának összefüggéseit, mivel ezek adják a paprika gazdasági értelemben vett termését. Ezekből a szervekből csak augusztusban és októberben vettünk mintát, és megállapítható, hogy ezen szervek kolonizáltsága között mindkét mintavételkor szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők. Októberben az érett termésfal kolonizáltsága szignifikánsan magasabb volt a fiatal termésfalénál. A terméskocsány kolonizáltsága a fiatal és az idős termésfalénál is szignifikánsan magasabb volt augusztusban és októberben is.

További lényegi megfigyelés, hogy a mag csak 3,57%-ban volt kolonizált, drámaian eltérve ezzel minden más vizsgált szervtől

5.2. A gombák különböző morfológiai csoportjainak elterjedtsége

A kísérlet során nem csupán az volt a célunk, hogy megállapítsuk a paprikanövények endofita gomba általi kolonizáltságának mértékét, hanem azt is szeretnénk volna kideríteni, hogy milyen nemzetségek/fajok és milyen gyakoriságban fordulnak elő közöttük. Ennek érdekében a kiválasztott törzseket először morfológiai csoportokba rendeztük, és az októberi mintavételezéskor megvizsgáltuk az egyes morfológiai csoportok elterjedtségét is. Eredményeink alapján Bärnkopf András az egyes csoportokból kiválasztott jellemző izolátumok rendszertani hovatartozását is meghatározta az ITS-szekvenciák alapján (Bärnkopf, 2013). Eredményeit a 4. ábra, illetve a 7. és 8. táblázat magában foglalja.

A 7. táblázat az augusztusi, míg a 8. táblázat az októberi mintavételezéskor kitenyészett endofita gombákból létrehozott morfológiai csoportok összefoglalását mutatja. Az első oszlopban az egyes morfológiai csoportok laboratóriumban használt jelölése található. A kiválasztott morfológiai csoportokból egyes törzseket Neda Haddadrafshi az izolálást követően monospórásiított, illetve monohifásított, ezeknek az egyes morfológiai csoportokból előállított törzsek laboratóriumi számát tartalmazza a 'Csoportba tartozó izolált minták' oszlop. Egyes morfológiai csoportokból nem készült izolátum, ezeknél értelemszerűen nem szerepel a szám. Az izolált törzsekből Bärnkopf András a reprezentatív kiválasztottakat ITS alapú szekvenciaanalízissel nemzetség, egyes törzseknél faj szinten is beazonosította, ennek

eredménye látható az utolsó oszlopban. Az októberi mintavételezéskor az egyes morfológiai csoportok elterjedtségének százalékos megoszlását is felmértük, ezt is tartalmazza a táblázat.

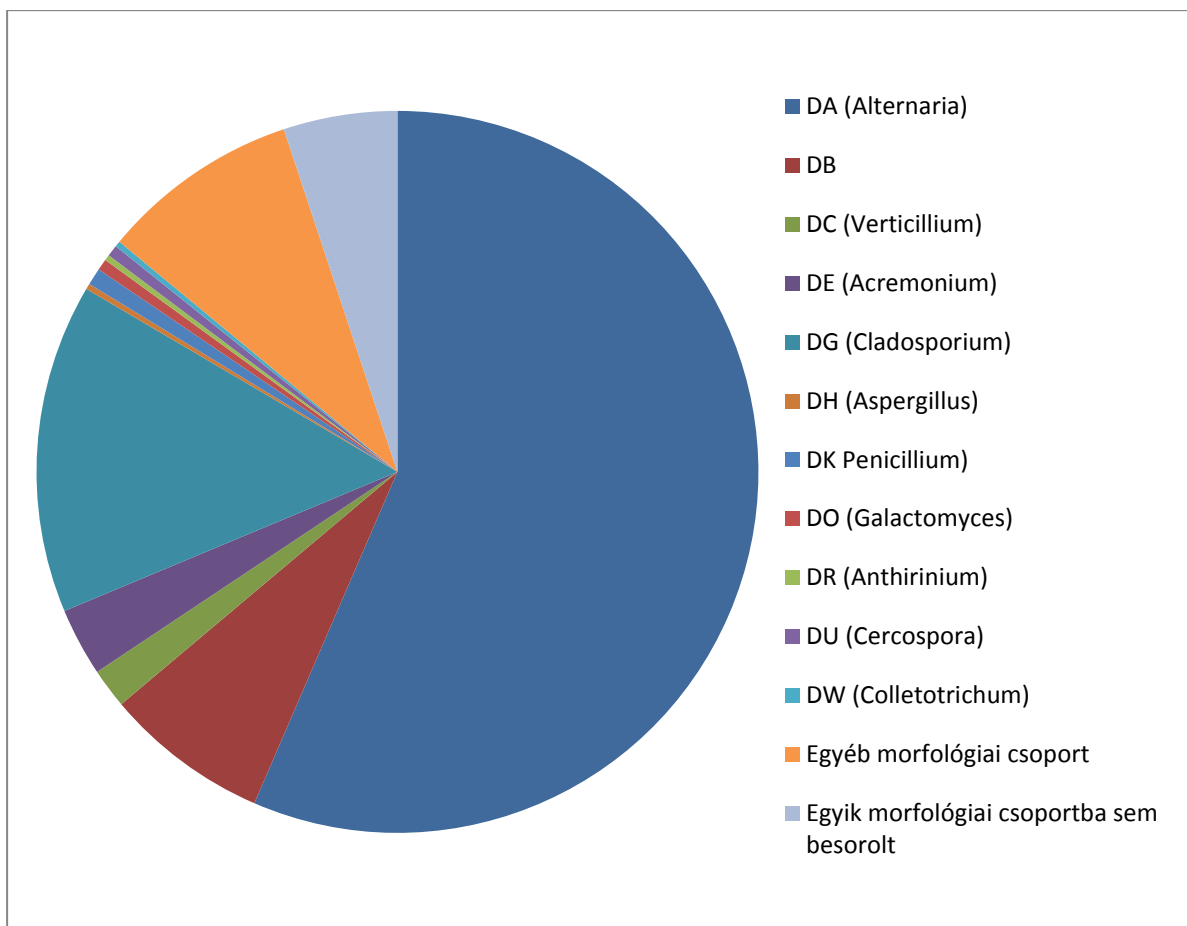
7.táblázat: Az augusztusi mintákból kialakított morfológiai csoportok

Morfológiai csoportok (Augusztus)	A csoportba tartozó izolált minták	Nemzetség
A	34, 55, 57, 58	<i>Acremonium, Sarocladium strictum</i>
B	35, 36, 41, 49, 56	<i>Lewia infectoria, Alternaria tenuissima</i>
C	37, 59	<i>Cladosporium</i>
D	-	-
E	39	-
F	51, 52	-
G	-	-
H	29, 43	<i>Colletotrichum</i>
I	44	-
J	-	-
K	31	<i>Fusarium nematophilum</i>
L	-	-
M	-	-
N	64	<i>Pyrenochaeta</i>
O	-	-
P	45, 65	<i>Chaetomium</i>
Q	-	-
R	-	-
S	32	-
T	53	-
U	61	-
V	38	<i>Penicillium steckii</i>
W	33	<i>Lewia infectoria</i>
X	-	-
Y	63	<i>Sarocladium strictum</i>
Z	62	<i>Chaetomium</i>
AA	60	<i>Myrothecium</i>
AB	46, 50	<i>Aspergillus</i>
AC	40	<i>Rhizopycnis vagum</i>
AD	42	<i>Fusarium</i>
AE	28	<i>Xylaria</i>

8.táblázat:Az októberi mintákból kialakított morfológiai csoportok

Morfológiai csoportok (Október)	%	A csoportba tartotó izolált minták	Nemzetség
DA	56,489	67, 85, 73, 91, 96, 97	<i>Alternaria</i>
DB	7,379	69	-
DC	1,781	83, 86	<i>Verticillium</i>
DD	0,763	78	-
DE	3,053	87	<i>Acremonium</i>
DF	0,509	70	-
DG	14,758	75, 94	<i>Cladosporium</i>
DH	0,254	68	<i>Aspergillus</i>
DI	1,272	-	-
DJ	0,509	-	-
DK	0,763	71, 76, 84	<i>Penicillium</i>
DL	0,509	88	-
DM	1,018	79 a,b	-
DN	0,254	-	-
DO	0,509	89	<i>Galactomyces</i>
DP	0,254	77	-
DQ	0,254	74	-
DR	0,254	93	<i>Anthrinium</i>
DS	0,254	95	-
DT	1,272	81 a,b	-
DU	0,509	90	<i>Cercospora</i>
DV	0,254	98	-
DW	0,254	92	<i>Colletotrichum</i>
DX	0,254	80	-
DY	0,254	72	-
DZ	0,254	-	-
EA	0,254	-	-
EB	0,509	-	-
EC	0,254	-	-
Egyik csoportba sem besorolt	5,096	-	-

A meghatározó (tehát ITS régió alapján beazonosított, vagy gyakori előfordulását) morfológiai csoportok októberben mért eloszlását a 4. ábra mutatja.



4. ábra Az egyes morfológiai csoportok elterjedtsége az októberi mintában

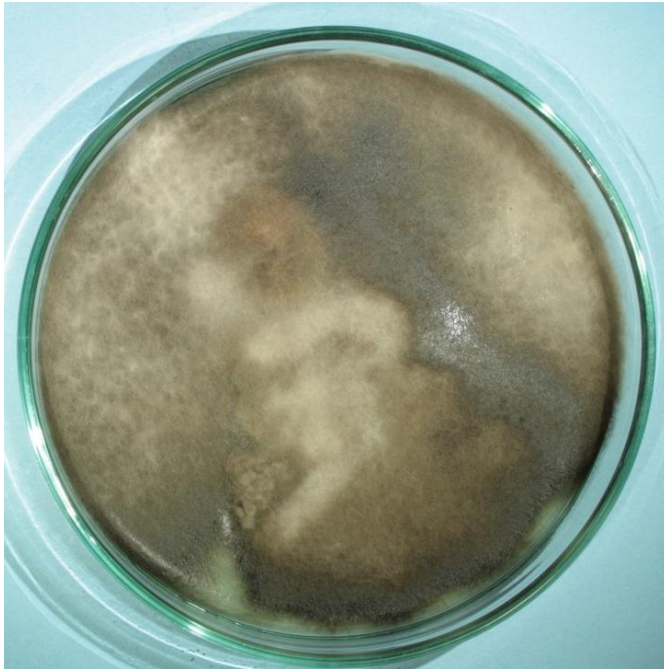
A 4. ábrán az egyes morfológiai csoportok megoszlása látható az októberi mintákból kitenyészett gombatelepek esetében. Az ábrán a morfológiai csoportok a laboratóriumban használt jelölésükkel szerepelnek, a szekvenciaanalízissel beazonosított csoportoknál a nemzetségnevet is megadtuk.

Az októberi mintavételezés során 29 morfológiai csoportot különítettünk el. A legnagyobb csoport több mint 50%-os részesedéssel a potenciális növénypatogén *Alternaria* nemzetség volt. Emellett jelentősebb mennyiségben fordult elő a *Cladosporium*, az *Acremonium* és a *Verticillium* nemzetség is. Az összes többi nemzetség nagyjából egyforma arányban, kis mennyiségben fordult elő a növényegyedekben.

A kitenyésző telepek 5%-át nem soroltuk be egyik morfológiai csoportba sem, ezek tipikusan csak egyszer, pontszerűen megjelenő gombatörzsek.

A vizsgálat során néhány nemzetség adatait külön is értékeltük, ezeket az alábbiakban részletezem. A morfológiai csoportok jellemzését Bóné (2009) alapján végeztem, figyelembe véve a telep növekedési erélyét, növekedési habitusát, színét, állagát, hifaszerkezetét, cseppképzését és sporulálását.

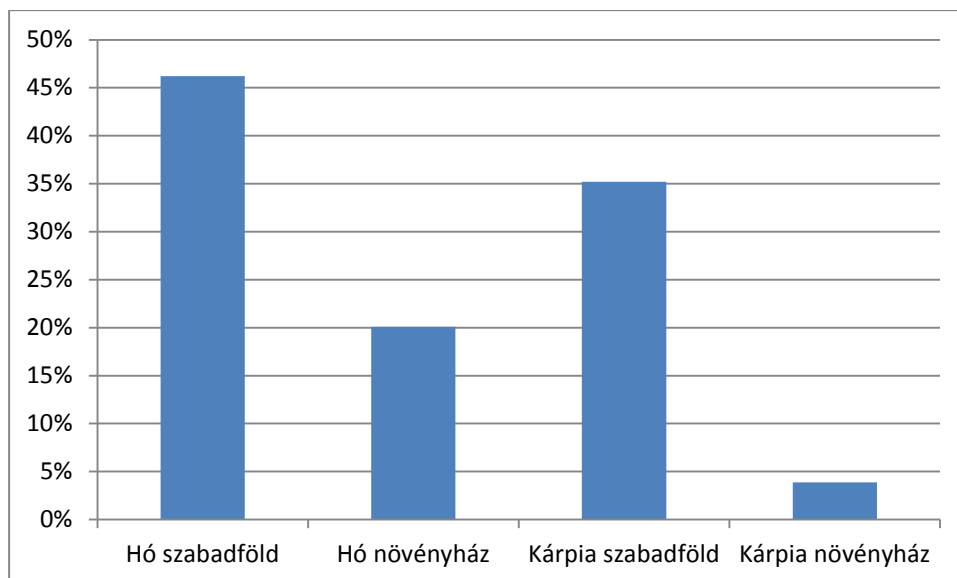
5.2.1. Az *Alternaria* nemzetség eloszlása a különböző termőhelyeken, fajtákban és szervekben az októberi mintavétel esetében



5. ábra- *Alternaria* sp.-be (DA morfológiai csoport) tartozó No. 91. telep fényképe

Mint az az előző fejezetben már látható volt, az *Alternaria* nemzetség (DA morfológiai csoport) volt messze a legelterjedtebb a kitenyészett izolátumok között, ezért annak elterjedését részletesen is analizáltuk.

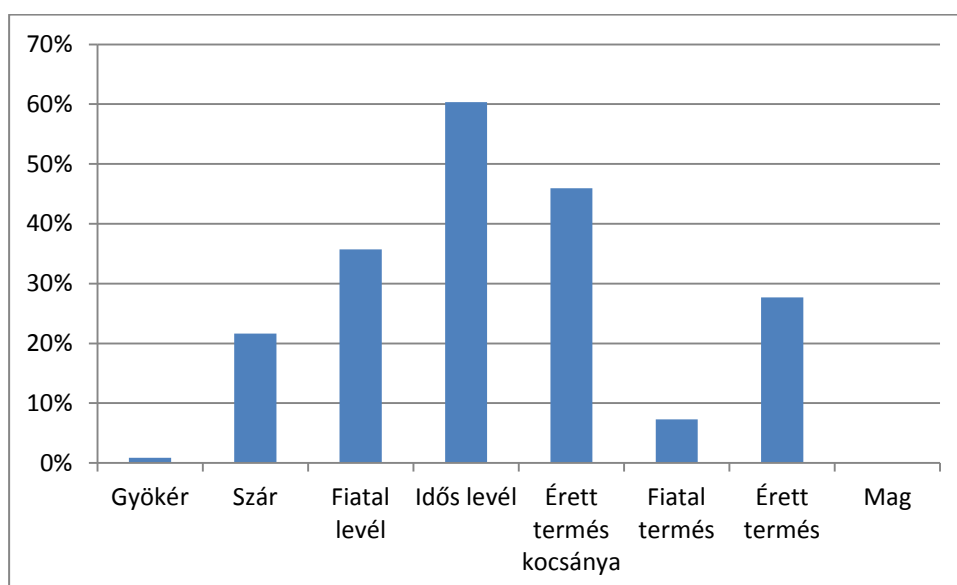
Az *Alternaria* nemzetség PDA táptalajon nagyon gyorsan tenyészik. A gombatelep a táptalajra oltást követően 12 óra elteltével már láthatóan növekszik, 5 nap után eléri a 4cm-es átmérőt, 10 nap után pedig teljesen elborítja a 10cm átmérőjű táptalajt. A telep növekedési alakja körkörös vagy szabálytalan. A nemzetség hifái elkülöníthetők, a telep bolyhos felületű, sok léghifával, szürke színű, nem sporulál. A hifaszálak vastagsága közepes, cseppek nem voltak megfigyelhetők (ld. 5. ábra).



6. ábra : Az *Alternaria* nemzetség (DA morfológiai csoport) gyakorisága a termőhelyeken és a fajtákban az októberi mintákban

A 6. ábrán jól látható, hogy az *Alternaria* nemzetség mindkét termőhelyen és mindkét fajtában előfordult, de elterjedtsége szabadföldön sokkal magasabb volt, mint növényházban.

Érdemes megjegyezni, hogy bár általánosan igaz, hogy októberben a 'Hó F1' fajtánál szignifikánsan magasabb volt a kitenyészthető gombatelepek száma, mint a 'Kárpia F1'-nél, ez a különbség különösen megmutatkozott az *Alternaria* nemzetség esetében, ahol a 'Hó F1'-ből nyertük ki a törzsek 62%-át.

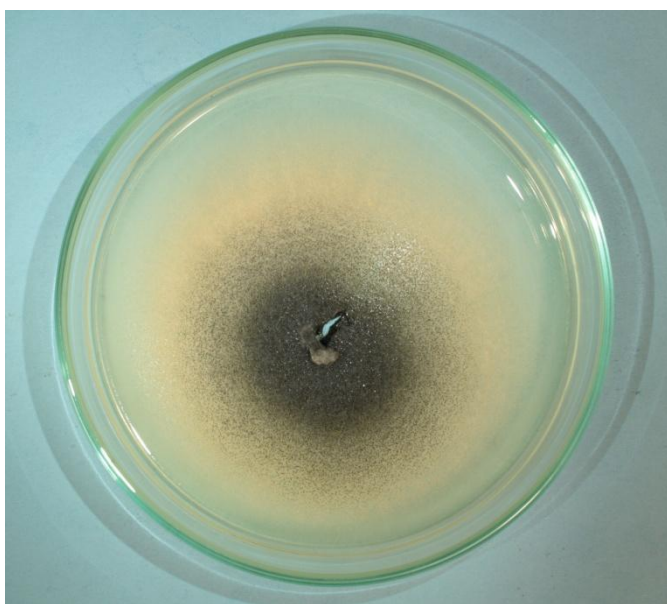


7. ábra Az *Alternaria* nemzetség (DA morfológiai csoport) gyakorisága a különböző szervekben az októberi mintában

A 7. ábráról leolvasható, hogy az *Alternaria* nemzetség tagjai a mag kivételével minden szervben megtalálhatóak voltak, legmagasabb arányban az idős levelekben és a terméskocsányban (ez utóbbi a bogyó fertőződése szempontjából fontos).

A gyökérben és a fiatal termésben az *Alternaria* nemzetség előfordulása kimondottan alacsony volt, az idős termésben már ehhez képest szignifikánsan megnőtt.

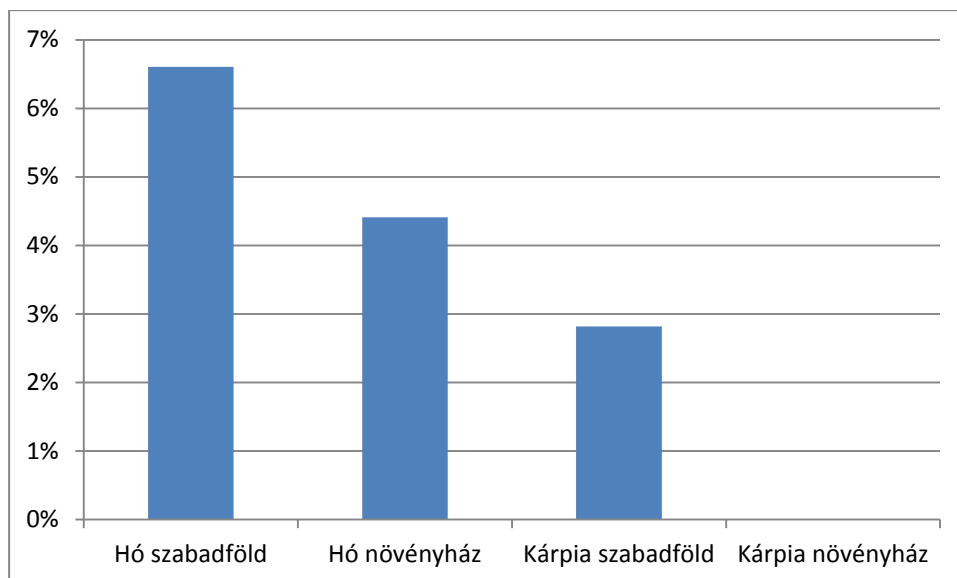
5.2.2. A 'DB' morfológiai csoport eloszlása a különböző termőhelyeken, fajtákban és szervekben az októberi mintavétel esetében



8. ábra: A 'DB' morfológiai csoportba tartozó No. 69. számú gombatelepről készült fénykép

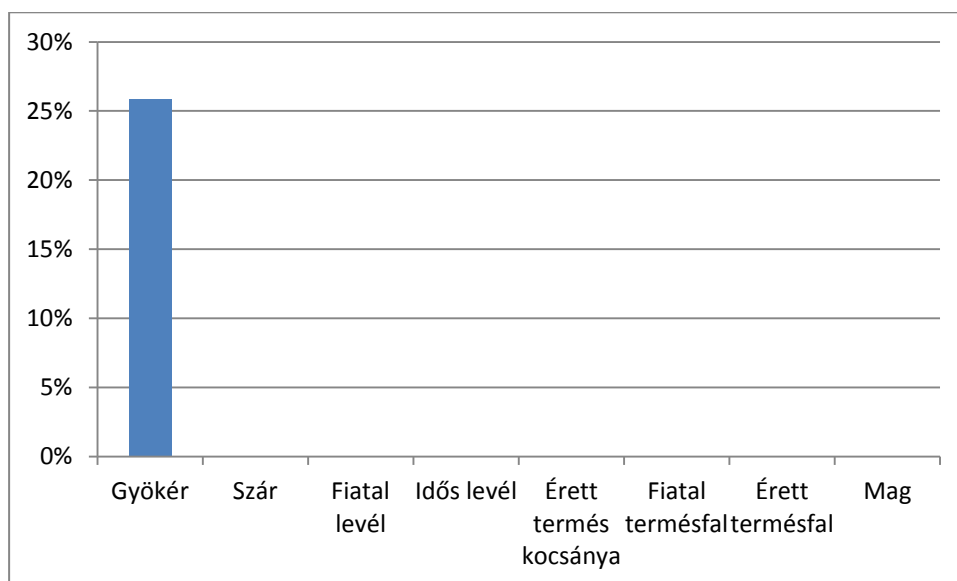
A 'DB' morfológiai csoport viszonylag nagy arányban fordult elő a növényekben, és érdekes megoszlása eltért a többi törzsetől, ezért részletesen is jellemeztük.

A morfológiai csoport PDA táptalajon közepes növekedési intenzitású. Növekedése a táptalajra oltást követő harmadik napon vált láthatóvá. A telep növekedése körkörös, szegélye egyenes. Egy hét után a telep átmérője 1,5, két hét után 4 cm volt. A teljes 10 cm átmérőjű petricsészét 4 hét elteltével borította be. A telep kezdetben egyöntetűen halvány narancssárga volt, opálos, szabad szemmel is elkülöníthető hifákkal. A telep felületén fehér színű léghifák fejlődtek. A táptalajra oltást követően egy hét elteltével a telep közepe fekete színűen sporulálni kezdett. A sporuláló képletek egyre gyorsabban terjedtek a telepen, 5 hét elteltével az egész csészét koromfekete, sporuláló gombaképletek borították. A telep képe a 8 ábrán látható.



9. ábra: A 'DB' morfológiai csoport gyakorisága a termőhelyeken és a fajtákban az októberi mintákban

A 9. ábrán jól látható, hogy a morfológiai csoportot a 'Kárpia F1' fajtában csak szabadföldön, ott is csak kis mennyiségben tudtuk detektálni, tehát a 'Hó F1' erre a morfológiai csoportra is sokkal fogékonyabb. A 'Hó F1' fajta esetében a gyakoriság szignifikánsan magasabbnak adódott szabadföldön, mint növényházban.

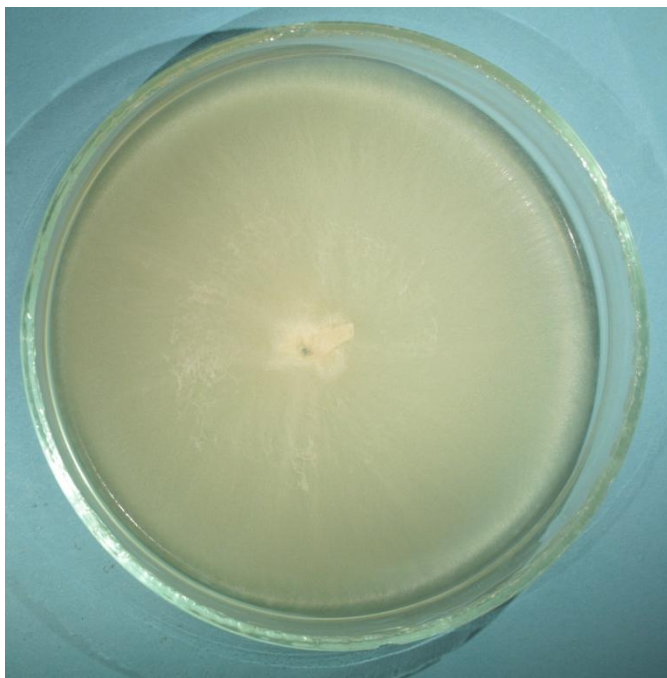


10. ábra A 'DB' morfológiai csoport gyakorisága a különböző szervekben az októberi mintákban

A 10. ábrán látható a morfológiai csoport további érdekessége, nevezetesen az, hogy csak gyökérből tudtuk detektálni. Valószínűleg tehát egy gyökérspecifikus törzsről van szó, ami növényházban szintén ritkább, mint szabadföldi körülmények között. A kísérlet során a morfológiai csoport nem került szekvenciaanalízissel beazonosításra, de ennek elvégzése,

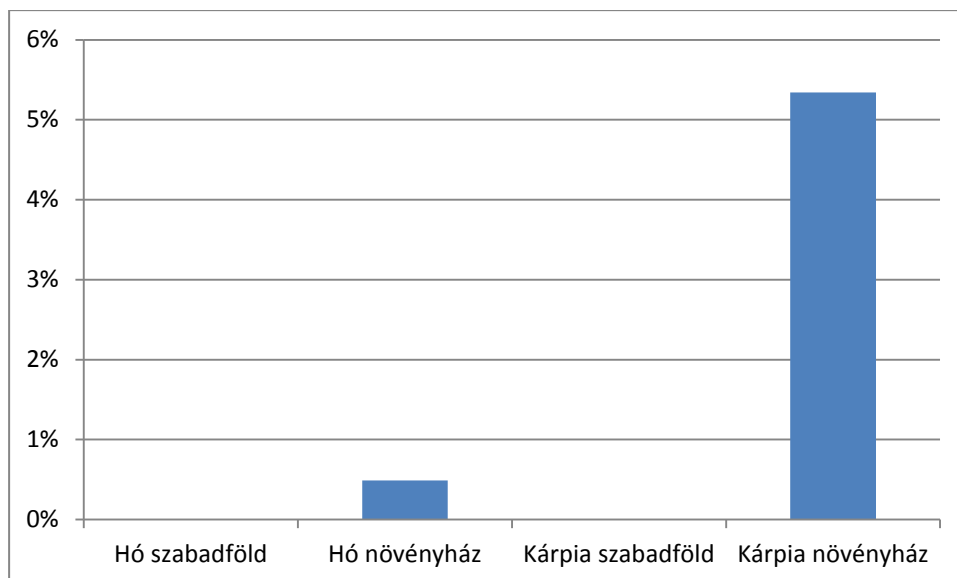
illetve a törzs növény életében betöltött jelentőségének vizsgálata ajánlható a jövőre nézve, mivel egy viszonylag gyakori előfordulása és gyökérspecifikus nemzetségről van szó.

5.2.3. Az *Acremonium* nemzetség előfordulása a különböző termőhelyeken és fajtákban az októberi mintavétel esetében



11.ábra: - *Acremonium* sp.-be (DE morfológiai csoport) tartozó No. 87. telep fényképe

Az *Acremonium* nemzetség (DE morfológiai csoport), kezdetben közepes, később nagy növekedési intenzitású. A telep 7 nap után 3 cm átmérőjű, 3 hét alatt növi be az egész 10 cm átmérőjű táptalajt. A telep körkörös növekedésű, lapos. Fiatal korában hajlamos a hifaszálak csomósodására, ezek az idősebb telep közepén is láthatók maradnak. Két hét elteltével a telep külső felületén sugárirányban vékonyszálú, zsírfényű hifák fejlődnek, ezek már nem csomósodnak. A telep nem hozott spórákat, és cseppeket sem figyeltünk meg (lsd.: 11 ábra).

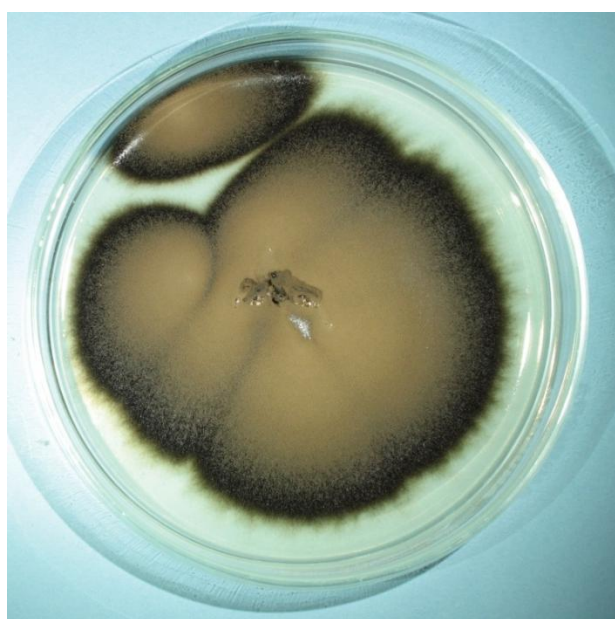


12. ábra: Az *Acremonium* nemzetség (DE morfológiai csoport) gyakorisága az októberi mintákban

A 12. ábrán látható, hogy a nemzetséget csak növényházi körülmények között sikerült detektálnunk, és fertőzöttsége az eddig tapasztalt általános trendtől eltérve a 'Kárpia F1' fajtában szignifikánsan magasabb volt, mint a 'Hó F1' fajtában.

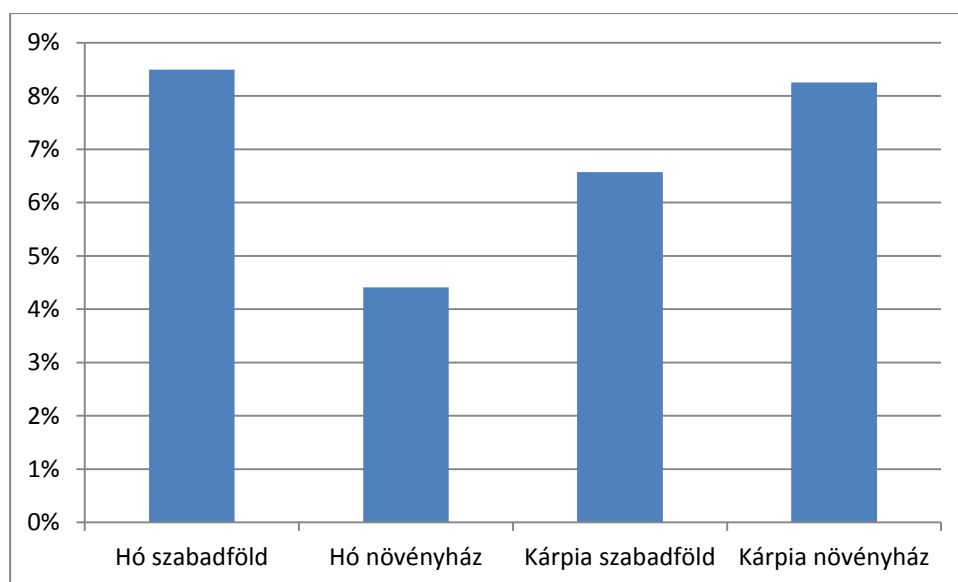
A nemzetség eloszlására az egyes szervekben az alacsony mintaszám miatt nem végeztünk vizsgálatot, azonban azt érdemes itt megemlíteni, hogy magból csak ezt a nemzetséget sikerült detektálnunk.

5.2.4. A *Cladosporium* nemzetség eloszlása a különböző termőhelyeken és fajtákban az októberi mintavétel esetében



13. ábra: - *Cladosporium* sp.-be (DG morfológiai csoport) tartozó No. 75. telep fényképe

A telep PDA táptalajon közepes-lassú fejlődésű, az 5 cm-es átmérőt csak 3 hét elteltével érte el. A telep növekedése körkörös, széle hullámos. A hifaszálak színe feketés, a telep már egészen fiatalon barnán sporulált, a spórákkal a Petri-csészén belül szaporodott is. Csomósodásra nem hajlamos, viszont cseppek megfigyelhetőek voltak (13 ábra).



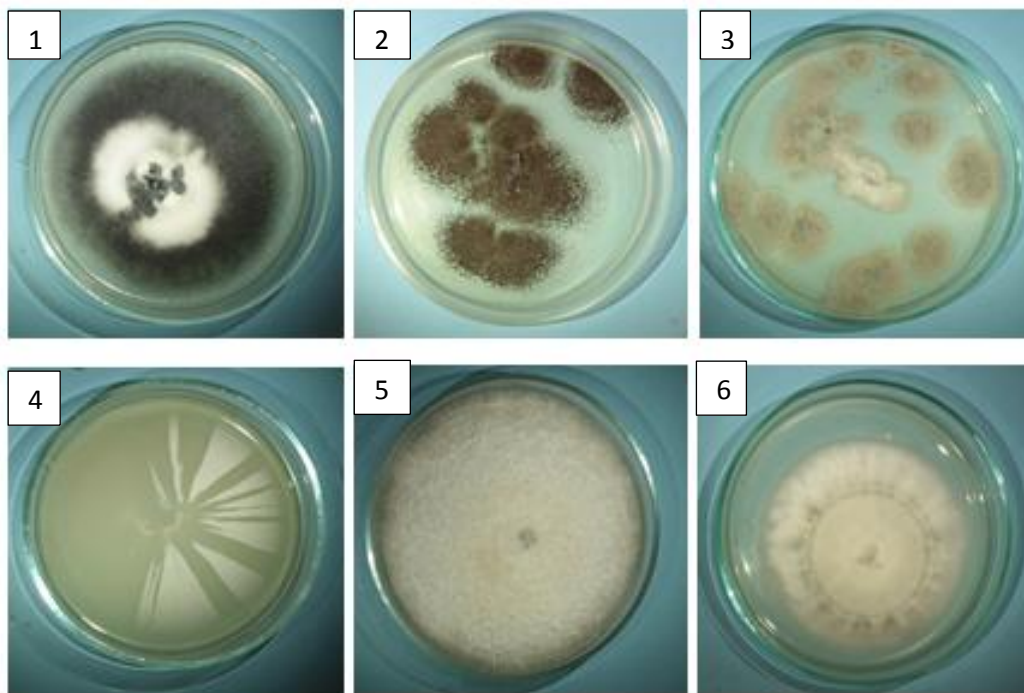
14. ábra: A *Cladosporium* nemzetség (DG morfológiai csoport) gyakorisága a különböző szervezetekben az októberi mintában

A 14. ábráról leolvasható a nemzetség elterjedése az egyes fajtákban és termőhelyeken. A szabadföldön és a növényházban nevelkedett növények között csak a 'Hó F1' fajta esetében mutatható ki szignifikáns különbség a szabadföldi egyedek javára. Bár a 'Kárpia F1' esetén a szabadföldi egyedek kolonizáltsága alacsonyabb, mint a növényháziaké, ez a különbség statisztikailag nem tekinthető szignifikánsnak. A két fajta közötti különbség se a szabadföldi, se a növényházi minták esetén nem tekinthető szignifikánsnak.

A nemzetség eloszlására az egyes szervezetekben az alacsony mintaszám miatt nem végeztünk vizsgálatot.

5.2.5. Egyéb beazonosított morfológiai csoportok

A következőkben a többi, Bärnkopf András által ITS alapú szekvenciaanalízissel beazonosított morfológiai csoportot szeretném röviden bemutatni. A morfológiai csoportok fényképe a 15. ábrán látható.



15. ábra: 1: *Verticillium* sp. (DC, No. 86); 2: *Aspergillus* sp. (DH, No. 68); 3: *Penicillium* sp. (DK, No. 84); 4: *Galactomyces* sp. (DO, No. 89); 5: *Anthirinium* sp. (DR, No. 93); 6: *Cercospora* sp. (DU, No. 90)

Verticillium sp. (DC):

Közepes növekedési erélyű, közepén fehér, csomós; a szélén fekete, gyapjas micéliummal, sok léghifával. A telep körkörösén vagy szabálytalan alakban fejlődik, a telep széle fonalas. Cseppeket nem tapasztaltunk (lsd.15/1. ábra)

Aspergillus sp. (DH):

Gyenge növekedési erélyű, hifái nem láthatók, csak koromfekete sporuláló képletei, melyekkel a táptalajon újabb telepeket hoz létre (lsd. 15/2. ábra).

Penicillium sp. (DK):

Csak a fiatal telepnél láthatók törtfehér színű hifák, a telep szabálytalan alakban növekszik. Későbbiekben sárgásbarna, sporuláló képleteivel terjed (lsd. 15/3. ábra).

Galactomyces sp. (DO):

Erős növekedési erélyű, körkörös növekedésű, a telep széle fonalas. Hifaszálai sugárirányúak, vékonyak, a telep opálos zsírfényű. Helyenként tejfehér sporuláló képletek figyelhetők meg. Léghifákat és cseppeket nem fejleszt (lsd. 15/4. ábra).

Anthirinium sp. (DR):

Nagyon erőteljes növekedésű, a táptalajt két hét elteltével már teljesen beborította. A telep vastag, a táptalaj felszínétől elemelkedő, bolyhos, törtfehér színű. Gyakran megfigyelhető cseppképzés (lsd. 15/5. ábra).

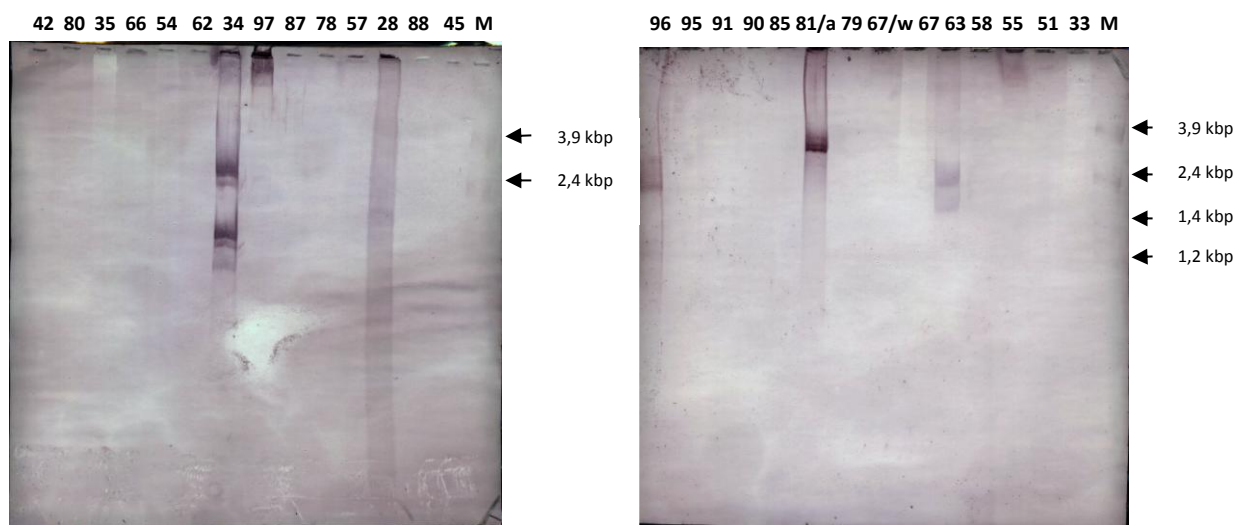
Cercospora sp. (DU):

Gyenge-közepes növekedési erélyű, körkörös telepet képez fonalas szegéllyel, a telepen koncentrikus mintázottság figyelhető meg. A telep színe szürkés- fehéres, nem sporulál és nem képez cseppeket (lsd. 15/6. ábra).

5.3. A dsRNS tartalmú mikovírusok detektálásának eredménye

Az előző fejezetekben bemutattam a növényben élő endofita gombák elterjedtségét és morfológiájuk sokszínűségét. Kísérletünk célja volt a növényekben élő endofita gombákat kolonizáló vírusok felmérése is. Ezen mikovírusok leggyakoribb örökítőanyaga a duplaszálú RNS, ezért 28 reprezentatív kiválasztott gombatörzs nukleinsavkivonatát teszteltük dsRNS-specifikus immunoblottal.

A kiválasztott gombatörzsek nagytömegű felszaporítása, a nukleinsav kivonása és az immunoblott folyamatának leírása az Anyagok és módszerek fejezetben olvasható részletesen.



16.ábra: A dsRNS immunoblott membánjainak scanképe

A 16. ábrán a dsRNS- specifikus immunoblott eredményét láthatjuk. Összesen 28 reprezentatív kiválasztott gombatörzset vizsgáltunk. A törzseket aszerint választottuk ki, hogy minél több morfológiai csoportot tesztelni tudjunk. A blottmembrán képén az egyes törzsekből nyert monospórástított és monohifásított izolátumok laboratóriumi száma látható, ez alapján a 7. illetve 8. táblázatból visszakeresve beazonosíthatók.

A vizsgált 28 törzs közül a 28, 97, 34, 63, 81/a és 96-os számúak bizonyultak pozitívnak, azaz ezeknél a törzseknél valószínűsíthető dsRNS-mikovírus (ok) jelenléte. A 6 pozitív izolátum közül ötöt Bärnkopf Andrásnak már sikerült molekuláris módszerekkel beazonosítania. Eszerint a 28. számú a *Xylaria* (AE morfológiai csoport), a 34-es az *Acremonium* (A illetve DE morfológiai csoport), a 96-os és 97-es számú pedig az *Alternaria* nemzetségbe (B illetve DA morfológiai csoport) tartozik. A 63. számú minta faj szinten is azonosított: *Sarocladium strictum* (Y morfológiai csoport). Az immunobloton negatív minták közül a 35, a 85 és a 91 az *Alternariák* morfológiai csoportjába tartozott (B, illetve DA). Ebből a nemzetségből tehát sikerült dsRNS tartalmú, és dsRNS-mentes törzseket is detektálnunk. Más ismert nemzetségbe tartozó dsRNS-negatív mintáink: 42 (AD morfológiai csoport, *Fusarium* sp.), 45 (P morfológiai csoport, *Chaetomium* sp.) és 90 (DU morfológiai csoport, *Cercospora* sp.).

A dsRNS pozitív minták számbavételén túl a dsRNS-ek számának és molekulahosszának meghatározásával, ill. parciális szekvenciák meghatározásával előzetes következtetéseket lehet levonni az egyes törzsekben található vírusok milyenségéről. Ez a munka még nem zárult le, saját kísérleteim során csak a méretre vonatkozó információt nyertem ki. Az immunoblottos vizsgálathoz markerként a reovirus Dearing törzs genomi RNS-ét használtuk, a detektált dsRNS molekulák hosszát ehhez az ismert molekulahosszúságú markerhez viszonyítottuk (Joklik, 1981). A 34. számú minta legalább öt különböző molekulahosszúságú dsRNS-t tartalmazott. A két hosszabb RNS molekulahossza egy kevéssel meghaladja a 2,4 kilobázispárt.

A 97. számú minta dsRNS-e rendkívül nagy molekulatömegű, ezért a használt markerhez nem viszonyítható. A 28. minta bár egyértelműen dsRNS pozitív, de benne nehézkes konkrét molekulatömegű fragmentumokat észlelni. Egyedüli határozottabban kivehető dsRNS-ének molekulahossza valamivel rövidebb 2,4 kilobázispárnál.

A 96. minta esetében három jól elkülöníthető molekulatömegű dsRNS fragmentum látható. A két hosszabb fragmentum molekulahossza nagyjából 2,4 kbp, illetve 2,4 és 3,9 kbp közé tehető, míg a rövidebb fragmentum molekulahossza 1,2 kbp körüli. A 81/a mintában egy jól látható dsRNS molekula volt detektálható, molekulahossza 2,4 és 3,9 kilobázispár közé tehető. A 63. mintában két különböző molekulahosszúságú dsRNS-t azonosítottunk, a hosszabb nagyjából 2,4 kbp hosszúságú, a rövidebb kicsivel hosszabb 1,4 kbp-nál.

6. DISZKUSSZIÓ

6.1.A növények endofita gombák általi kolonizáltságának értékelése

Mind szabadföldön, mind növényházban termesztett paprika esetében igazolást nyert az a hipotézisünk, miszerint a szabadföldön nevelt paprikanövényeknek magasabb az endofita gomba általi kolonizáltságuk, mint a növényházban nevelt egyedeké. A két termőhely között nagyjából kétszeres a kolonizáltság aránya. Ennek okai összetettek, a különböző termesztéstechnológián alapulnak.

A növényházi közetgyapotos termesztésnél a termesztőközeget minden kultúra után cserélik, a növényházakat az új kultúra beültetése előtt fertőtlenítik. Ezzel az előző növényállományból származó gombák áttelepülését gyakorlatilag megakadályozzák a következő kultúrára. Ezzel szemben szabadföldi körülmények között az endofita gombáknak lehetőségük van a talajban és az elhalt növényi részekben fennmaradni, és így a következő növényállományt közvetlenül megfertőzni. Szabadföldön ez ellen csak korlátozott védekezési lehetőségek állnak fenn: talajfertőtlenítés és a vetésforgó betartása.

Fontos különbség még, hogy bár mindkét termőhelyen törekedtek a termesztés során a növény termesztési optimumait lehetőleg jobban biztosítani, de ehhez a növényházban sokkal jobb lehetőségek adóttak. A közetgyapoton hidrokultúrában termesztett növények tápanyagigénye sokkal pontosabban kielégíthető, mint a szabadföldi csepegtetőcsöves öntözésnél, emellett a növényházban kevesebb abiotikus stresszel találkozik a növény: kisebb a légköri aszály, a napégés és a túl alacsony éjszakai hőmérséklet káros hatása, ennek következtében erősebb a növény vigora, így jobban ellenáll a gombafertőzéseknek is. A növényházakban hatékonyabb a rovarvektorok elleni védekezés is, ami szintén gátolhatja az endofita gombák gyors elterjedését.

Látható, hogy a két fajta között is van különbség a kolonizáltságban, ez azonban csak a szabadföldi körülmények között nevezhető szignifikánsnak. Megállapítható tehát, hogy szabadföldön a kúpos típusú 'Hó F1' fogékonyabb az endofita gombák általi kolonizálódásra, mint a kápia típusú 'Kárpia F1'.

Megfigyelhető, hogy a növényegyedek kolonizációs gyakorisága a tenyészidőszak folyamán változik, de ez a változás csak május és augusztus, illetve augusztus és október között volt szignifikáns növekedés. Ennek oka vélhetően a növény életciklusában keresendő.

Áprilisban a fejlődő palánták még viszonylag alacsony kolonizáltságot mutattak, ez a fiatal, jó erőben lévő növényegyedek és a steril palántaházi körülmények eredménye.

Májusban még az áprilisinál is alacsonyabb kolonizáltsági értékeket láthatunk, bár ez a statisztikai értékelés szerint nem tekinthető szignifikáns különbségnek. Fő oka - a hatékonyan végzett palántanevelés és növényvédelem mellett - az lehetett, hogy a palánták az intenzív növekedési időszakban gyorsabban fejlődtek, mint a bennük élő endofita gombák, így a fiatal növényi szövetek még jelentős mértékben mentesek voltak a gombakolonizációtól.

A kiültetést követően az endofita kolonizáltság erősen növekedett egészen a tenyészidőszak végéig. Ennek okai a megváltozott, a növény számára a palántaházinál kedvezőtlenebb körülmények, illetve az, hogy a növények juvenilis fázisukból áttértek az adult fázisba, így energiáikat az intenzív hajtásnövekedés helyett már a termések kifejllesztésére és beérlelésére fordították, és az endofita gombák könnyebben tért hódíthattak maguknak a szövetekben.

Októberben a fertőzöttség mértékét tovább növelhette az egyre hűvösebb és párásabb időjárás és a megvilágítás csökkenése, mivel a termesztési körülmények ebben az időszakban a trópusokról származó melegigényes paprika optimumától egyre jobban eltértek.

Jól látható, hogy a kolonizáltság az áprilisi nagyjából 25%-os átlagból októberre 45%-ra emelkedett, azaz szinte megduplázódott a tenyészidőszak folyamán.

Az egyes szervek kolonizáltságát megfigyelve tendenciaként itt is megfigyelhető, hogy az egyes szervek kolonizáltsága a tenyészidőszak folyamán fokozatosan növekedett, azonban nem egyforma mértékben, illetve ettől a trendtől való eltérések is megfigyelhetők.

A gyökér kolonizáltsága folyamatos szignifikáns növekedést mutatott augusztusig, októberben azonban visszacsökkent nagyjából a májusi szintre. Jól látszik, hogy a gyökér egyike a növény legmagasabb arányban kolonizált szerveinek, ez is jól mutatja, hogy milyen fontos szerepe van a termesztőközegnek az endofita gombák terjesztésében. A szár kolonizáltsága viszonylag alacsony maradt a tenyészidőszakban, azonban októberben hirtelen megugrott.

A fiatal levelek adatainál jól megfigyelhető a májusi, statisztikailag bizonyított visszaesés, ami szintén azt a megfigyelésünket támasztja alá, hogy a gyorsan fejlődő növényi szövetekbe a gombák nem képesek azonnal betelepülni, csak később kolonizálják azokat.

Az idős levelek kolonizáltsága nagyon magas volt, és októberre enyhe emelkedést mutatott. Ennek fő oka az lehet, hogy a növény légcserenyílásain keresztül - melyek a levelek fonákán működnek - viszonylag könnyen képesek az endofita gombák terjedni, főleg nedves levélfelület esetén.

A vizsgálat véleményünk szerint érdekes eredménye, hogy míg a terméskocsány kolonizáltsága nagyon magas volt, addig a fiatal és idős termésfal kolonizáltsága alacsony

maradt. Ez a termések eltarthatósága szempontjából lehet jelentős, mert azt sugallja, hogy a paprika bogyóját támadó gombás betegségek a terméskocsányból kerülnek át a termésfalba. Ez jól megfigyelhető például a paradicsomalkatú paprikák *Alternaria sp.* okozta szürke magházrothadásánál, amikor a bogyó rothadása jól láthatóan a terméskocsány felől indul.

A magok endofita gomba általi kolonizáltsága rendkívül alacsony, szinte elhanyagolható volt. Ebből arra lehet következtetni, hogy a paprikamag- legalábbis a kitenyészthető endofiták esetében- nem adja át endofitáit a következő nemzedékre, hanem azok a környezetből kerülnek be az utódokba. Ennek a kórokozók szempontjából is jelentősége van, hiszen a paprikát üzemi termesztésben elsősorban generatív úton, maggal szaporítják. Ha a magok egy külső csávázáson átesnek, ami elpusztítja a felületükön található kórokozókat gyakorlatilag kizárható a mesterségesen, PDA táptalajon kitenyészthető endofita gombák vetőmaggal történő átadásának esélye az egyes nemzedékek között a növényházakban.

6.2. Az egyes morfológiai csoportok elterjedtségének értékelése

Alternaria (DA): az *Alternaria* nemzetség mindkét termőhelyen és mindkét fajtában előfordult, és ez képviselte az előforduló endofiták több mint felét. Jól látható, hogy elterjedtsége szabadföldön sokkal magasabb volt, mint növényházban. A két paprikafajtában való előfordulás mértékében nagyobb különbséget figyeltünk meg, mint a többi nemzetségnél, de itt is a 'Hó F1' fajtában volt nagyobb a gyakoriság, közel 62% fertőzöttséggel. A gyökérben és a fiatal termésben az *Alternaria* nemzetség előfordulása kimondottan alacsony volt, az idős termésben már lényegesen nőtt.

DB: A morfológiai csoportot a 'Kárpia F1' fajtában csak szabadföldön, ott is csak kis mennyiségben tudtuk detektálni, tehát a 'Hó F1' erre a morfológiai csoportra is sokkal fogékonyabbnak bizonyult. A morfológiai csoport igazi érdekessége, hogy ezt a csoportot csak gyökérből detektáltuk. Valószínűleg egy gyökérspecifikus törzsről van szó, ami növényházban szintén ritkább, mint szabadföldi körülmények között. A kísérlet során a morfológiai csoport nem került szekvenciaanalízissel beazonosításra, de ennek elvégzése, illetve a törzs növény életében betöltött jelentőségének vizsgálata ajánlható a jövőre nézve, mivel egy viszonylag gyakori előfordulású, és gyökérspecifikus nemzetségről van szó.

Acremonium (DE): csak növényházi körülmények között sikerült detektálnunk, és a 'Kárpia F1' fajtában szignifikánsan magasabb gyakorisággal mint a 'Hó F1-ben'; erre a törzsre tehát ez a fajta fogékonyabb. A nemzetség további érdekessége, hogy magból csak ezt sikerült detektálnunk, tehát ennek a nemzetségnek a vetőmaggal való terjedése elképzelhető.

Kísérleteinkkel a paprika endofita gombáinak vizsgálata természetesen még nem zárult le, és a bemutatott eredmények nyomán továbbhaladva remélhetőleg a gyakorlatban is hasznosítható ismeretekhez fog vezetni.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérletünkben két hibrid paprikafajta ('Hó F1', 'Kárpia F1') szabadföldi és növényházi állományában a tenyészidőszak során négy alkalommal vizsgáltuk a PDA táptalajra kitenyészthető fonalas endofita gombák elterjedését, összehasonlítva az egyes szervekből izolálható telepgyakoriságot. A kitenyésztett gombatörzseket morfológiai csoportokba osztottuk, és az októberi mintavételkor felmértük az egyes morfológiai csoportok gyakoriságát a fajtára, termesztési helyre és növényi szervekre vonatkozóan.

Az endofita gombák gyakran élnek együtt mikovírusokkal. Reprezentatívan kiválasztott gombatörzsekből a duplaszálú RNS örökítőanyagú mikovírusok jelenlétét dsRNS specifikus immunoblottolással vizsgáltuk.

Eredményeink azt mutatják, hogy az idős szövetek kolonizációs rátája rendszerint meghaladja a fiatal szövetekéit. A szabadföldön fejlődött egyedek endofita gyakorisága is jelentősen magasabb volt az üvegházi paprikáénál. A 'Hó F1' és 'Kárpia F1' hibridek kolonizáltságában a tenyészidőszak második felében tapasztaltunk jelentős eltérést. Az egyes szervek kolonizáltsága szignifikánsan eltérő, legmagasabb arányban kolonizáltak az idős levél, a terméskocsány és a gyökér, míg a legalacsonyabb arányban kolonizált a mag. A kimutatott morfológiai gombacsoportok száma meghaladja a 60-at. Az üvegházból és szabadföldről izolált gombacsoportok között van átfedés, így például *Alternaria*-szerű gombákat mindkét esetben találtunk. Bizonyos típusokat kizárólag üvegházból, másokat csak szabadföldről mutattunk ki. Egy morfológiai csoportot kizárólag gyökérből izoláltunk, míg mások minden növényi szervben előfordultak.

A mikovírusokra vizsgált 28 törzsből 6 törzsben sikerült a dsRNS jelenlétét detektálni. Ezek a törzsek a *Alternaria*, *Xylaria*, *Acremonium* és *Sarocladium* nemzetségbe tartoznak. Az egyes törzsek különböző számú és különböző molekulahosszúságú dsRNS- fragmentumokat tartalmaztak.

8.IRODALOMJEGYZÉK

1. Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., Kustar T. A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* (3) 267-274.
2. Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America* 100, 15649-15654.
3. Bacon, C.W. and White, J.F. 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
4. Balázs S. (szerk.) 2000. *A zöldségajtatás kézikönyve*. Budapest. Mezőgazda Kiadó
5. Bärnkopf A. 2013. *A paprikában (Capsicum annum L.) előforduló endofita gombák izolálása és azonosítása molekuláris módszerekkel*. Szakdolgozat. Budapest. Budapesti Corvinus Egyetem, Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék
6. Bóné László. 2009. *Agaricus blazei MURILL törzsek micéliumnövekedésének vizsgálata*. Budapest. Budapesti Corvinus Egyetem Zöldség- és Gombatermesztési Tanszék
7. Borvendég M., Dávid J., Jámor B., Kurucz G., Szabó P. 2001. *Általános biológia*. Kaposvár. Dávid Kiadó
8. Botella, L., Diez, J. 2010. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*. 47, 9-18.
9. Chu, Y. M., Jeon, J.J., Yea, S.J., Kim, Y.H., Yun, S.H., Lee, Y.W., Kim, K.H. 2002. Double-Stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied Environmental Microbiology* 68 (5), 2529-2534.
10. Feldman, T.S., Morsy, M. R.; Roossinck, M.J.. 2012. Are communities of microbial symbionts more diverse than communities of macrobial hosts? *Fungal Biology* 116 (4), 465-477.
11. Ghabrial, S.A., Suzuki, N. 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 353–384.

12. Giordano, L., Gonthier, P., Varese, G.C., Miserere, L., Nicolotti, G. 2009. Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris*) trees in the Alps. *Fungal Diversity*
13. Glits M., Péntzes B., Petrányi I. 2007. Általános növényvédelmi ismeretek. Budapest. Nemzeti Agrárszaktanácsadási, Képzési és Vidékfejlesztési Intézet
14. Hernawati, H., Wiyono, S., Santoso, S. 2011. Leaf endophytic fungi of chili (*Capsicum annuum*) and their role in the protection against *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Biodiversitas* 12 (4), 187-191.
15. Hyde, K.D. and Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33, 163-173.
16. Joklik, W.K. 1981. Structure and function of the reovirus genome. *Microbiological Reviews* 45, 483-501.
17. Khan, A. L., Shinwari, Z. K., Kim, Y-H., Waqas, M., Hamayun, M, Kamran, M., Lee, I-J. 2012. Role of endophyte *Chaetomium globosum* LK4 in growth of *Capsicum annuum* by production of gibberellins and indole acid. *Pak. J. Bot.* 44 (5), 1601-1607.
18. Kim, J:C: Cho, K. Y., and Sung, N. D. 2006. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology* 44, 332–337.
19. Lingfei, L., Yang A., Zhao Z. 2005. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 54 (3), 367-373.
20. Lukács N. (szerk.) Növényi biotechnológiai egyetemi jegyzet. 2013. Budapest. Budapesti Corvinus Egyetem, Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék
21. Maan, S., Rao, S. Maan, N.S., Anthony, S.J.. 2007. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *Journal of Virological Methods* 143 (2), 132-139.
22. Mártonffy B. (szerk) 1999. Paprika. Budapest. Mezőgazda kiadó
23. Mertens P. 2004. The dsRNA viruses. *Virus Recherche* 13 (3)
24. Muhammar M. 1997. Fungi associated with wilt disease of capsicum in Sindh, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 29 (2) 217-222.

25. Pearson, M.N., Beever, R.E., Boine, B., Arthur, K. 2009. Mycovirus of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 10, 11.
26. Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves* (eds) Andrews, J.H. and Hirano, S.S. Springer-Verlag, New York, New York, USA, 179-197.
27. Redman, R.S., Dunigan, D.D., Rodriguez, R.J. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151 (3), 705-716.
28. Rocha, A.C.S., Garcia, D., Uetanabaro, A.P.T., Carneiro, R.T.O., Araújo, I.S., Mattos, C.R.R.; Góes-Neto, A. 2010. Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47, 75-84.
29. Schulz, B., Boyle, C. 2005. The endophyte continuum. *Mycological Research*. 109, 661-686.
30. Somos A. 1981. A paprika. Budapest. Akadémiai Kiadó.
31. Steiner H. 1994. Hasznos élő szervezetek a kertben. Budapest. Ulmer Kiadó
32. Véték G., Nagy G. 2011. Kártevők és kórokozók a kertben. Budapest. Cser Kiadó
33. Yu, H.J., Lim, D., Lee, H.S. 2003. Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. *Virology*. 314, 9-15.
34. Zatykó L. (szerk.) 1993. Paprika. Budapest. Mezőgazda Kiadó