

Molekuláris biológiai vizsgálatok a Kárpát-medencéből származó *Cryphonectria parasitica* izolátumokon

Irinyi László – Görcsös Gábor – Radócz László

Debreceni Egyetem, Agrár-és Gazdálkodástudományok Centruma, Növényvédelmi Intézet
irinyil@yahoo.fr

ÖSSZEFOGLALÁS

A *Cryphonectria parasitica* a szelídgesztenye (*Castanea spp.*) egyik legfontosabb kórokozója Európában és Magyarországon. Munkánk során 14, a Kárpát-medencéből izolált *Cryphonectria parasitica* izolátum diverzitását vizsgáltuk molekuláris markerrel. Választásunk a translációs elongációs faktor (*EF-1 α*) fehérjét kódoló *tefl* génre esett. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a *tefl* gén, más fajokkal ellentétben, nem alkalmas a fajon belüli különbségek (diverzitás) vizsgálatára a *C. parasitica* fajnál. A továbbiakban a magyarországi és a Kárpát-medencéből származó populációk vizsgálatára egyéb molekuláris markerek alkalmazása szükséges, mint pl. a mikroszatellitek.

SUMMARY

Cryphonectria parasitica, the casual agent of chestnut blight, is one of the most important fungal pathogens of chestnut (*Castanea spp.*) in Europe and Hungary. In this study we analyzed the diversity of 14 *Cryphonectria parasitica* parasitica strains isolated from different location of Carpathian-Basin. For the analyses we used the partial sequences of the translation elongation coding gene, *tefl*. Our results showed that the *tefl* gene, contrary to other fungal species, is not suitable for the molecular analyses of *C. parasitica*. In the future, for the molecular studies of *C. parasitica*, we need to use other molecular markers like microsatellites.

Kulcsszavak: *Cryphonectria parasitica*, filogenetikai elemzés, translációs elongációs faktor

Keywords: *Cryphonectria parasitica*, phylogenic analysis, translation elongation factor

BEVEZETÉS

A Bükkfafélék (*Fagaceae*) családjába tartozó európai szelídgesztenye (*Castanea sativa*) kedvelt dísz- és héjas gyümölcsfánk, mely elsősorban a savanyú, jó vízellátottságú, káliumban gazdag talajt kedveli. Hazánkban a Dél-Dunántúlon a Mecsekben, az Északi-középhegységben, az Alpoknál, a Dunakanyarban és a Zalai dombság területén fordul elő. Magas kálium és keményítő tartalmú termését püré, méz és befőtt készítéséhez is használják, ezenkívül egyes területeken (pl. Olaszország, Svájc hegyvidéki területei) kenyeret is sütnék lisztjéből. A *Cryphonectria parasitica*, mely a szelídgesztenye egyik legfontosabb kórokozója, a gesztenyén kívül a Bükkfafélék családjába tartozó egyéb fajokat is veszélyeztet, így a tölgyeket és a bükköt is. A gomba Kelet Ázsiából, valószínűleg Japánból lett behurcolva a XIX. sz. végén és a XX. század elején az Egyesült Államokon keresztül Európába.

Vizsgálatunk során a Kárpát-medencéből (Magyarországról és Ukrajnából) származó *Cryphonectria parasitica* izolátumok diverzitását vizsgáltuk molekuláris markerrel. A „translation elongation factor 1 subunit alpha” (*EF-1 α*) fehérje a sejten belül a citoszólban található (Moldave, 1985). A fehérjét kódoló *tefl* gén minden élő szervezetben megtalálható, és az más szekvenciákkal szemben nagy előnye, hogy a gén csak egy kópiában van jelen a genomban (Baldauf és Doolittle, 1997). A fajok közötti és fajon belüli rendszertani kapcsolatok felderítésére egyaránt alkalmas, mint azt Roger *et al.* (1999) különböző fajoknál (pl. *Mucor racemosus*, *Podospora anserina*), illetve Druzhinina és Kubicek (2005) *Trichoderma* fajoknál bizonyították. Filogenetikai vizsgálatunkhoz a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó fragmentumát választottuk (1. ábra).

1. ábra: A *tefl* gén sematikus vázlata, valamint a PCR-ben használt primerek helyzete (Druzhinina és Kubicek, 2005 nyomán)

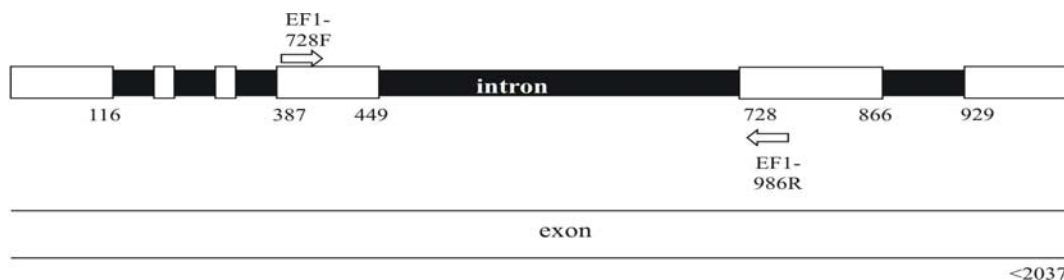


Figure 1: Schematic structure of *tefl* gene and location of primers for phylogenetic analyses

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatunk során 8 Magyarországról és 6 Ukrajnából származó *Cryphonectria parasitica* izolátumnak, valamint további 2 görög izolátumnak (1. táblázat) a *tefl* régióját vizsgáltuk. A vizsgálatok során a magyarországi és ukrainai izolátumok mellett génbanki adatbázisban megtalálható (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) *Cryphonectria parasitica* izolátumok *tefl* régióját is bevontuk az elemzésbe (2. táblázat).

1. táblázat

A vizsgálatba bevont *C. parasitica* izolátumok listája

Izolátum kód (1)	Izolálás helye (2)
B1	Nagymaros (Kóspallagi utca)
C1	Nagymaros (Fehérhegy 1)
J2	Nagymaros (Őz utca)
R2	Nagymaros (Első völgy)
E2	Nagymaros (Őz utca)
N2	Nagymaros (Első völgy)
MV/16	Nagymaros (Első völgy)
MV1/4	Nagymaros (Első völgy)
Bob1-3	Bobovyshe (Ukrajna)
Bob2-2T	Bobovyshe (Ukrajna)
Bob2-4T	Bobovyshe (Ukrajna)
Bob3-3	Bobovyshe (Ukrajna)
RO4	Rostovjatica (Ukrajna)
S1	Serednje (Ukrajna)
P5-2	Görögország
ME48-2	Görögország

Table 1: *Cryphonectria parasitica* strains involved in the phylogenetic analysis
Code of isolates (1), location of isolation (2)

2. táblázat

A *tefl* fragmentumok alapján készült filogenetikai törzsfá készítésébe bevont izolátumok listája, valamint *tefl* szekvenciájuk hozzáférési száma

Fajnév (1)	Izolátum kód (2)	GenBank hozzáférési szám (3)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	CMW10427	AY308953
<i>Cryphonectria parasitica</i>	CMW10431	AY308954

Table 2: Strains involved in the phylogenetic analyses and the accession number of their *tefl* fragments
Species (1), code of isolates(2), accession number at GenBank (3)

DNS-izolálás

Az izolátumokat 50 ml malátakivonat-tápotdatban tenyésztettük 48 órán keresztül, 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban, sötétben, rázatva (125 rpm). A sejteket dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben fagyasztva tártuk fel, majd genomi DNS-t izoláltunk. A DNS-izolálását a NucleoSpin II (Macherey-Nagel, 740770) alkalmazásával végeztük a gyári protokollt követve.

Polimeráz-lánreakción (PCR) alapuló vizsgálat

A PCR-t 50 µl térfogatban végeztük, amely a következő összetevőket tartalmazta: 25 µl 2X PCR Master Mix (Fermentas, K0171), 2 µl genomi DNS (0,5–1 µg), 2–2 µl forward és reverse primer (10 pmol/µl), 19 µl steril, nukleázmentes víz (Fermentas, #R0581). A PCR körülményei az egyes fragmentumok felszaporítása során a következők voltak:

Az *tefl*-fragmentum felszaporításához a következő primerpárt használtuk: EF1-728F: 5'- CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG -3' 20 bp; az EF1-986R: 5'- TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC -3' 20 bp (Druzhinina és Kubicek, 2005). A reakció körülményeit az alábbiak szerint állítottuk be: első lépésként kezdeti denaturálás történt 95 °C-on, 3 percen át, amit 5 cikluson keresztül további denaturálás követett 95 °C-on, 1 percig, majd az annelláció 59 °C-on, 1 percig és végül a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen át. Ezt követte 25 cikluson keresztül a denaturálás 95 °C-on, 1 percig, majd az annelláció 59 °C-on, 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen keresztül. Végül egy 15 perces polimerizáció következett 72 °C-on. A PCR-t az MWG Biotech Inc. Primus 25 (Milton Keynes, UK) típusú készülékével végeztük.

A PCR-termék tisztítása és koncentrációja

A PCR termékek tisztítását a Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281) termékkel végeztük.

DNS-szekvenálás

A felszaporított és tisztított PCR-termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany cég végezte térítéses megbízással. Az általuk alkalmazott szekvenálás a Sanger-féle módszeren alapszik (Sanger *et al.*, 1977), és az ABI cég által fejlesztett gépekkel végzik. A szekvenálás megbízhatóságát az ISO nemzetközi minőségbiztosítási szabvány (DIN EN ISO 9001:2000) garantálja.

Filogenetikai analízisek

A különböző elemzéseket egy Intel Pentium 4 CPU 2,4 GHz teljesítményű és 1 GB RAM memóriájú számítógépen végeztük. A szekvenciákat a ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997) program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol szükséges volt. Ezt követően a filogenetikai analíziseket a Paup*4.0b (Swofford, 2002) program alkalmazásával végeztük el.

Parsimony analízis

A Parsimony típusú filogenetikai elemzést a Paup*4.0b programmal végeztük. A keresés során „branch swapping” típusú heurisztikus, Tree Bisection and Reconnection (TBR) stratégiájú újrendezést (TBR) alkalmaztunk. A TBR az jelenti, hogy a törzsfát két részre bontják, amelyeket majd ismét párosítanak egy újabb elágazáson keresztül. A folyamat az összes lehetséges elágazást számításba veszi, majd kiválasztja közülük a legvalószínűbbet. Az elemzés során minden egyes karaktert azonos súllyal vettünk figyelembe, az összerendezésben szereplő kihagyásokat (gap-eket) pedig hiányzó adatként kezeltünk. A törzsfá stabilitását bootstrap analízissel ellenőriztük 1000 ismétlést alkalmazva. A törzsfák megrajzolásához a TreeView (Page, 1966) programot használtuk.

Eredmények

A DNS-izolálását a NucleoSpin II (Macherey-Nagel, 740770) alkalmazásával végeztük a gyári protokollt követve, melynek eredményeként átlagban 100 ng/μl koncentrációjú DNS-oldat keletkezett.

A genomi DNS izolációját követően a PCR során a primerpárokkal, egy 350 bp hosszúságú *tef1* fragmentum szaporodott fel mindegyik izolátum esetében (2. ábra).

2. ábra: A PCR során felszaporított *tef1* szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés)

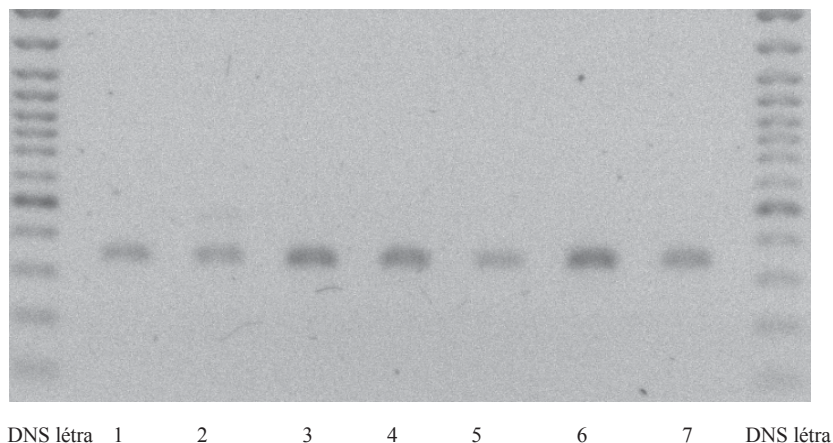


Figure 2: *tef1* fragments amplified by PCR in 1 % agarose gel stained with ethidium bromide (EtBr)

A szekvenciákat a ClustalX program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol az – nyilvánvaló hibák miatt – szükséges volt. Az alábbiakban a *Cryphonectria* izolátumok *tef1* szekvenciák összerendezésének egy-egy részlete látható (3. ábra).

3. ábra: Az *tef1* szekvenciák rendezésének egy részlete

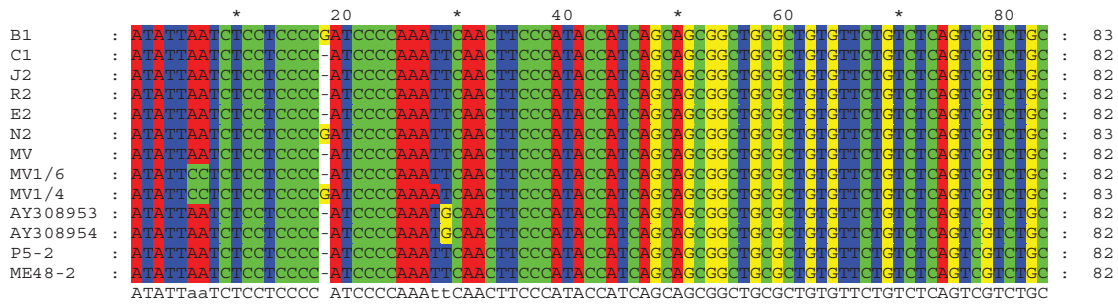


Figure 3: A part of the alignment of *tef1* sequences

A Parsimony elemzés során, a PAUP*4.0b program 318 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 310 karaktert konstansnak, 6 karaktert informatívnak tekintett, és csak 2 karaktert becsült nem-informatívnak. Az elemzés során készült törzsfán is (4. ábra) jól látható, hogy az egyes izolátumok között nagyon csekély a különbség mutatkozik, és emiatt a különböző területekről származó izolátumok nem különülnek el egymástól.

4. ábra: Az *tef1* szekvenciák Parsimony elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az elágazás valószínűségét jelölik, százalékban, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptunk.

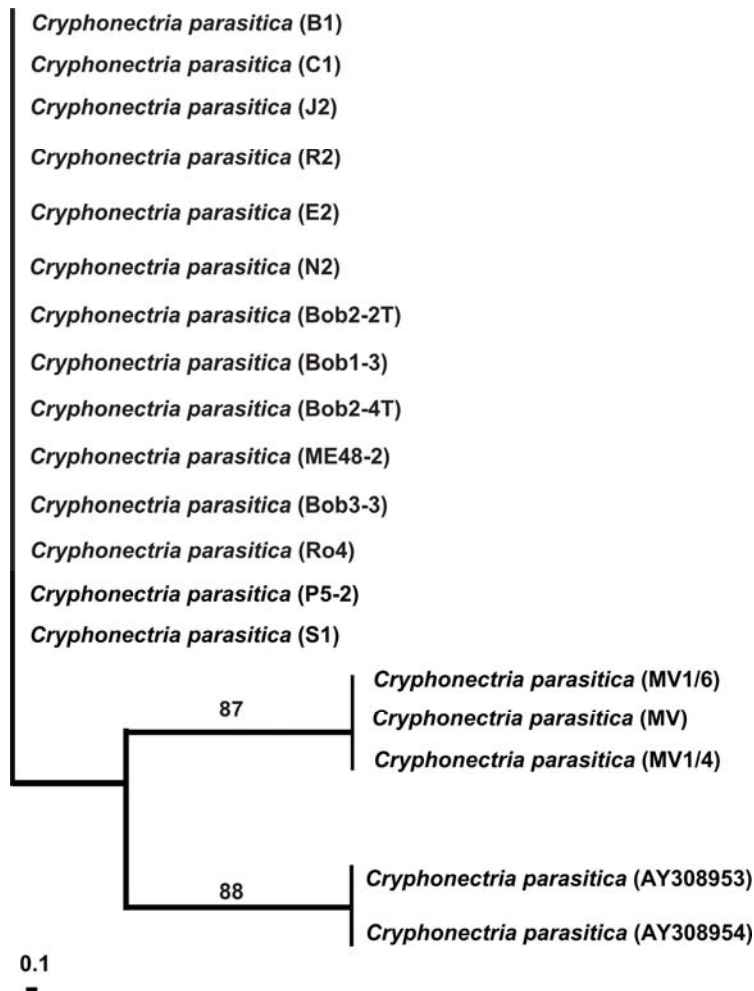


Figure 4: Phylogenetic relationships of *Cryphonectria parasitica* isolates inferred by Parsimony analysis of *tef1* sequences. The numbers above the lines represent the bootstrap (bootstrap=1000) values

KÖVETKEZTETÉSEK

A Parsimony elemzés során figyelembe vett informatív karakterek alacsony száma megerősíti, hogy a *tef1* régió, más fajokkal ellentétben nem alkalmas a fajon belüli különbségek (diverzitás) vizsgálatára a *C. parasitica* fajnál. Ennek egyik oka lehet, hogy az izolátumok relatíve közeli földrajzi távolságból származnak, valamint az tény, hogy a *C. parasitica* gomba azonos helyről lett behurcolva Európába. Magyarországi és Kárpát-medencéből származó populációk vizsgálatára egyéb molekuláris markerek alkalmazása szükséges. Ilyen marker lehet a mikroszatellit, melynek alkalmazására már végeztek kísérleteket többek között Franciaországban (Breuillin *et al.*, 2006).

IRODALOM

- Baldauf, S. L.-Doolittle, W. F. (1997): Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12007-12012.
- Breuillin, F.-Dutech, C.-Robin, C. (2006): Genetic Diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. *Mycological Research*, 110: 288-296.
- Druzhinina, I.-Kubicek, C. P. (2005): Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species cluster? *Journal of Zhejiang University Science* 6B, 100-112.
- Moldave, K. (1985): Eukaryotic protein synthesis. *Annual review of biochemistry*, 54: 1109-1149.
- Nicholas, K. B.-Nicholas, Jr. H. B.-Deerfield II, D. W. I. (1997): GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew news* 4, 14.
- Page, R. D. M. (1996): TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Roger, A. J.-Sandblom, O.-Doolittle, W. F.-Philippe, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryots. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 218-233.
- Swofford, D. L. (2002): PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thompson, J. D.-Gibson, T. J.-Plewnia, F.-Jeanmougin, F.-Higgins, D. G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.