



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Növényvédelmi Intézet

**Növényorvos mesterképzési
szak**

Import citrusféléken előforduló kórokozók vizsgálata

Belső konzulens: Szendrei Lilla

PhD-hallgató, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék

Belső konzulens: Dr. Tóth Annamária

egyetemi adjunktus, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék

Belső konzulens: Dr. Petrőczy Marietta

egyetemi docens, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék

Készítette: Muhari Bence

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzés	6
2	Irodalmi áttekintés	7
2.1	A kórokozók rendszertani besorolása	7
2.1.1	A <i>Penicillium</i> fajok rendszertani besorolása	7
2.1.2	A <i>Colletotrichum</i> fajok rendszertani besorolása	7
2.1.3	Az <i>Alternaria</i> fajok rendszertani besorolása	7
2.1.4	A <i>Fusarium</i> fajok rendszertani besorolása	7
2.2	A kórokozók földrajzi elterjedése.....	8
2.3	A kórokozók gazdasági jelentősége	8
2.4	A kórokozók gazdanövényköre	9
2.4.1	A <i>Penicillium</i> fajok gazdanövényköre	9
2.4.2	A <i>Colletotrichum</i> fajok gazdanövényköre.....	9
2.4.3	Az <i>Alternaria</i> fajok gazdanövényköre	9
2.4.4	A <i>Fusarium</i> fajok gazdanövényköre	10
2.5	A kórokozók által okozott tünetek.....	10
2.5.1	A <i>Penicillium</i> fajok által okozott tünetek citrusféléken	10
2.5.2	A <i>Colletotrichum</i> fajok által okozott tünetek citrusféléken	11
2.5.3	Az <i>Alternaria</i> fajok által okozott tünetek citrusféléken	11
2.5.4	A <i>Fusarium</i> fajok által okozott tünetek citrusféléken	12
2.6	A kórokozók morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei	13
2.6.1	A <i>Penicillium</i> fajok morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei	13
2.6.2	A <i>Colletotrichum</i> fajok morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei.....	13
2.6.3	Az <i>Alternaria</i> fajok morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei	14
2.6.4	A <i>Fusarium</i> fajok morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei	15
2.7	A kórokozók biológiája	16

2.7.1	A <i>Penicillium</i> fajok biológiája.....	16
2.7.2	A <i>Colletotrichum</i> fajok biológiája.....	16
2.7.3	Az <i>Alternaria</i> fajok biológiája.....	17
2.7.4	A <i>Fusarium</i> fajok biológiája	17
2.8	A kórokozók elleni védekezés	17
3	Anyag és módszer	18
3.1	A vizsgálat helye és ideje	18
3.2	A vizsgálat anyaga.....	18
3.2.1	A vizsgált gyümölcsök	18
3.2.2	A felhasznált eszközök	19
3.2.3	Táptalaj, indítószekvenciák	20
3.3	A vizsgálat módszere	20
3.3.1	A növényi részek gyűjtése.....	20
3.3.2	Tünetek jellemzése	20
3.3.3	A kórokozók izolálása táptalajon, tiszta tenyészetek fenntartása.....	20
3.3.4	Morfológiai vizsgálatok.....	21
3.3.5	Patogenitási teszt	21
3.3.6	Molekuláris azonosítás	21
4	Eredmények	23
4.1	<i>Penicillium</i> spp. okozta tünetek.....	23
4.1.1	Citromon megfigyelt tünetek.....	23
4.1.2	Mandarinon megfigyelt tünetek	24
4.1.3	Grapefruiton megfigyelt tünetek	24
4.2	<i>Alternaria</i> spp. okozta tünetek.....	24
4.2.1	Citromon megfigyelt tünetek.....	24
4.2.2	Grapefruiton megfigyelt tünetek	25
4.3	<i>Colletotrichum</i> spp. okozta tünetek	25

4.3.1	Citromon megfigyelt tünetek.....	25
4.3.2	Lime-on megfigyelt tünetek	26
4.4	<i>Fusarium</i> spp. okozta tünetek.....	26
4.4.1	Citromon megfigyelt tünetek.....	26
4.4.2	Lime-on megfigyelt tünetek	26
4.5	Morfológiai tulajdonságok és tenyészbélyegek.....	27
4.6	<i>Penicillium</i> spp. morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegek	28
4.6.1	Citromról izolált <i>Penicillium</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	28
4.7	Mandarinról izolált <i>Penicillium</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	29
4.7.1	Grapefruitról izolált <i>Penicillium</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	30
4.8	Az <i>Alternaria</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	30
4.8.1	Citromról izolált <i>Alternaria</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	30
4.8.2	Grapefruitról izolált <i>Alternaria</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	30
4.9	<i>Colletotrichum</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	31
4.9.1	Citromról izolált <i>Colletotrichum</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	31
4.9.2	Lime-ről izolált <i>Colletotrichum</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	32
4.10	<i>Fusarium</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	32
4.10.1	Citromról izolált <i>Fusarium</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	32
4.10.2	Lime-ről izolált <i>Fusarium</i> spp. tenyészbélyegek és morfológiai tulajdonságai	32
4.11	Patogenitási teszt.....	33

4.12	A kórokozók azonosítása molekuláris módszerekkel	34
4.12.1	Azonosítás az ITS régió alapján	34
5	Következtetések	39
6	Összefoglalás	42
7	Irodalomjegyzék	43

1 Bevezetés és célkitűzés

A citrusfélék a világ legnagyobb felületen termesztett gyümölcssei, hiszen világszerte több, mint hétmillió hektáron termesztik, így a tíz legfontosabb növény közé tartoznak a teljes gyümölcsstermesztés tekintetében és értéküket tekintve első helyen állnak a nemzetközi gyümölcskereskedelemben (Khanchouch *et al.*, 2017).

A „citrusfélék” kifejezés a nemzetség fajainak és hibridjeinek komplexét jelöli. A leggyakrabban termesztett fajok a *Citrus reticulata* (mandarin), *Citrus sinensis* (édes narancs), *Citrus limon* (citrom), *Citrus aurantifolia* (lime), *Citrus grandis* (pomelo) és *Citrus paradisi* (grapefruit) (Wu *et al.*, 2018). Bár a citrusfélék Kelet-Ázsiában őshonosok, a citrustermesztés a trópusi, szubtrópusi és mediterrán éghajlati övezetekben is elterjedt, jelenleg Kína, Brazília, az Európai Unió és az Egyesült Államok a vezető termesztoők a nemzetközi frisspiacon (Bhatta, 2022; Lombardo *et al.*, 2023). A citrusfélék fontos forrásai a magas antioxidáns hatással rendelkező bioaktív vegyületeknek, mint például a C-vitaminnak, a hidroxifahéjsavnak és flavonoidoknak (Khanchouch *et al.*, 2017). Ennek köszönhetően főleg a téli időszakban kedvelt gyümölcsaink közé tartoznak.

A globális klímaváltozás okozta felmelegedés hatásait hazánkban is érezzük. Ma már számos mediterrán eredetű kultúra, mint a füge vagy a datolyaszilva termesztésére van hazai példa. Nagyon népszerű gyümölcsök a citrusfélék is a házi kiskertekben, de az is előfordulhat, hogy a boltok polcain magyar citrommal találkozunk, hiszen Lajosmizsén már fólia borítású termesztoő berendezésben is zajlik a termesztés. A bio élelmiszerek iránti növekvő igény pedig tovább fokozza a hazai termesztési kedvet. Azonban a hazai fogyasztókat természetesen egyelőre a friss citrusfélékkel az import látja el nagy mennyiségben. A világ minden tájáról érkeznek gyümölcsök és velük együtt kórokozók is. A nemzetközi szakirodalom alapján számos gombafaj fertőzheti a citrusféléket, köztük sok olyan is, melyeknek csak a szállítás és raktározás alatt alakulnak ki tünetaik.

Munkánk során célul tűztük ki felmérni egyes citrusfélék (bio- és konvencionális termesztésből származó) fertőzöttségét. A kórokozók klasszikus és molekuláris módszerekkel végzett azonosításán túl célul tűztük ki a fajok rokonsági kapcsolatainak vizsgálatát, valamint megtudni, hogy van-e közöttük a hazánkban is termesztett növényekre veszélyt jelentő kórokozó.

2 Irodalmi áttekintés

A nemzetközi szakirodalom alapján a postharvest kórokozók közül a *Penicillium* nemzetség (Marcet *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2020; Kanashiro *et al.*, 2020), az *Alternaria* nemzetség (Timmer *et al.*, 2003; Vitale *et al.*, 2021), a *Colletotrichum* nemzetség (Kaur *et al.*, 2007; Crous *et al.*, 2016; Guarnaccia *et al.*, 2017), a *Fusarium* nemzetség (Sandoval *et al.*, 2018; Jae *et al.*, 2000; Hasan *et al.*, 2023) és a *Geotrichum* nemzetség (Gusella *et al.*, 2021; Guerline *et al.*, 2022; Paes *et al.*, 2022) fajaival találkozhatunk leggyakrabban a citrusféléken.

2.1 A kórokozók rendszertani besorolása

2.1.1 A *Penicillium* fajok rendszertani besorolása

A *Penicillium* nemzetség rendszertanilag az *Aspergillaceae* családkhoz tartozik, mely az *Ascomycota* törzs, *Eurotiomycetes* osztály, *Eurotiales* rend tagja. A családba tartozó 1062 leírt faj túlnyomó többsége az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetséghez sorolható (Sayers *et al.*, 2009).

A citrusfélék zöldpenészenek kórokozóját, a *Penicillium digitatum*-ot, Saccardo írta le 1881-ben. A kórokozó jelenleg elfogadott tudományos neve *P. digitatum* Sacc. (MycoBank1, 2023).

A *Penicillium italicum*-ot, a citrusfélék kékpenészt okozó gombát Wehmer írta le 1894-ben. A jelenleg elfogadott tudományos neve a *P. italicum* Wehmer (MycoBank2, 2023).

2.1.2 A *Colletotrichum* fajok rendszertani besorolása

A *Colletotrichum* fajok az *Ascomycota* törzs, *Sordariomycetes* osztály, *Glomerellales* rend, *Glomerellaceae* család, *Colletotrichum* nemzetségébe tartoznak (NCBI1, 2023). A *Colletotrichum* fajokat jelenleg 14 fajkomplexbbe sorolják, melyekhez több mint 220 faj tartozik (Wikee *et al.*, 2011).

2.1.3 Az *Alternaria* fajok rendszertani besorolása

Az *Alternaria* fajok az *Ascomycota* törzs, *Dothideomycetes* osztály, *Pleosporales* rend, *Pleosporaceae* család, *Alternaria* nemzetségébe tartoznak (NCBI2, 2023).

2.1.4 A *Fusarium* fajok rendszertani besorolása

A *Fusarium* fajok az *Ascomycota* törzs, *Sordariomycetes* osztály, *Hypocreales* rend, *Nectriaceae* család *Fusarium* nemzetségbe tartoznak (NCBI3, 2023).

2.2 A kórokozók földrajzi elterjedése

A *Penicillium* nemzetséghez több mint 300 faj tartozik, melynek tagjai mindenütt elterjedtek a Földön (Mingshuang *et al.*, 2021). A nemzetség két, a citrustermesztésben meghatározó kórokozója közül a *P. italicum* a világ minden citrustermesztő régiójában elterjedt, de kevésbé, mint a *P. digitatum* (Brown és Eckert, 1988).

Az *Alternaria* gombanemzetség tagjai széles körben elterjedtek, a nemzetséghez számos szaprofita és növénypatogén faj is tartozik, amelyek a gabonafélék, gyümölcsök és zöldségek betakarítás előtti és utáni állapotromlását idézik elő. A kórokozó okozta betegség a citrusfélék esetében a mediterrán éghajlatú vidékeken jelentős. Európát tekintve Spanyolországban, Olaszországban és Görögországban is írtak le *Alternaria* spp. okozta gyümölcsrothadást (Garganese *et al.*, 2016).

A *Colletotrichum* fajok közül citrusféléken a *C. gloeosporioides* fajkomplex (*C. fruticola*, *C. gloeosporioides*, *C. helleniense*); *C. boninense* fajkomplex (*C. boninenese*, *C. catinaense*, *C. constrictum*, *C. karstii*) és *C. acutatum* fajkomplex (*C. acutatum*, *C. simmondsii*, *C. johnstonii*, *C. godetiae*) tagjai Ausztráliában, Ázsia, Afrika, Európa és Amerika citrustermő vidékein gyümölcsökön okoznak antraknózist (Damm *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Riolo *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021).

A *Fusarium* nemzetség fajai, melyek citrusfélék száraz gyökérrothadását (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. semitectum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*) (Jaouad *et al.*, 2020) és gyümölcsrothadását okozzák, világszerte elterjedtek a faiskolákban és ültetvényekben egyaránt (Khouja *et al.*, 2008; Zakaria, 2023).

2.3 A kórokozók gazdasági jelentősége

A citrusfélék esetében előforduló veszteség közel 50%-a köthető a betakarítás utáni kórokozókhoz, közülük is a *P. digitatum* okozza a betakarítás utáni összes veszteség 90%-át (Marcet *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2019; Cheng *et al.*, 2020).

A *Penicillium*, az *Aspergillus* és *Alternaria* nemzetségekbe tartozó gombák által termelt egyes másodlagos anyagcseretermékek toxikusak, ezeket a szakirodalom mikotoxinoknak nevezi. A mikotoxinok az állatok és az emberek számára jelentős egészségügyi kockázattal bírnak, károsíthatják a különböző szerveket, a hormonháztartás zavarát okozhatják, illetve ismert a mutagén hatásuk is (Coulombe, 1993; Drusch és Ragab, 2003).

P. digitatum esetében termogén alkaloidokat, köztük triptoquialanin A-t és triptoquialanin C-t mutattak ki a kórokozóval fertőzött citrusfélékben (Costa *et al.*, 2019). Az

Alternaria alternata törzsei a mikotoxinok kémiai változatos csoportját termelik, beleértve az alternariolt (AOH), az alternariol-monometil-étert (AME), a tenuazonsavat (TEA), az altenuént (ALT) és az altertoxinokat (AT). *Alternaria*-toxinokat (AOH, AME, TEA és néhány esetben AT és ALT) mutattak ki kutatók különböző gyümölcsökben, köztük a narancsban, citromban és mandarinban is (Scott, 2001).

A *Colletotrichum* nemzetség fajai a növénypatogén gombák egyik legfontosabb nemzetsége, világszerte számos haszonnövény betegségéért felelősek, így tíz évvel ezelőtt már felkerültek a világ 10 legfontosabb növénypatogén gombájának listájára (Dean *et al.*, 2012). A legtöbb termesztett növény fogékony a *Colletotrichum* nemzetség egy vagy akár több fájára is. A nemzetség egyes tagjai nagymértékű kárt tudnak okozni citrusfélékben betakarítás előtt és után is, látens jelenlétük miatt (Kaur *et al.*, 2007; Crous *et al.*, 2016; Guarnaccia *et al.*, 2017).

2.4 A kórokozók gazdanövényköre

2.4.1 A *Penicillium* fajok gazdanövényköre

A *Penicillium* nemzetséghez tartozó fajok többek között képesek fertőzni a cukorrépát, kukoricát, kávé, dinnyét, paradicsomot, almát, a *Prunus* és *Pyrus* fajokat, búzát és a szőlőt is (Palou, 2014). A *P. digitatum* a citrusfélék egyik legjelentősebb kórokozója igen szűk gazdanövénykörrel rendelkezik, mivel a citrusféléken kívül nem fertőz más friss gyümölcsöt vagy zöldséget természetes körülmények között (López-Pérez *et al.*, 2011). A gomba leginkább az érett citrusféléket betegíti meg (Julca *et al.*, 2015).

2.4.2 A *Colletotrichum* fajok gazdanövényköre

A nemzetség legfontosabb gazdanövényei között szerepelnek a csonthéjasok (pl. meggy, cseresznye, szilva), a szőlő, az almatermésűek (pl. alma, körte), zöldség-növények (pl. paprika, paradicsom, tojásgyümölcs), fás és lágyszárú dísznövények (pl. juhar fajok, fenyő fajok). Egyes fajok fertőzik a trópusi és mediterrán gyümölcsöket is, mint a citrusféléket, mangót vagy akár a kávé. A *Colletotrichum* fajok közül citrusféléken a *C. gloeosporioides* fajkomplex, *C. acutatum* és a *Colletotrichum boninense* fajkomplex tagjai is okoznak antraknózist (Dean *et al.*, 2012; EPPO, 2023).

2.4.3 Az *Alternaria* fajok gazdanövényköre

Az *Alternaria* fajok széles gazdanövénykörrel rendelkeznek, fertőzik a gabonaféléket, dísznövényeket, zöldségeket. Jelentős tárolási betegségeit okozzák olyan gyümölcsöknek, mint az alma és citrusfélék (Thomma, 2003).

2.4.4 A *Fusarium* fajok gazdanövényköre

A *Fusarium* fajok számos növényt, köztük trópusi gyümölcsöket is képesek fertőzni, mint az avokádó, ananász, mangó, papaya (Zakaria, 2023). A *Fusarium oxysporum* gazdanövényköre magában foglalja a kétszikűeket (pl. bab, dinnye, szegfű, gyapot, szója, paradicsom, citrusfélék) és az egyszikűeket (pl. gabonafélék, banán, orchidea, pálma) de vízi növényeken (pl. lótusz), valamint gyomokon vagy élősködő növényeken (seprűrépa és boszorkányfű) is előfordul (Edel-Hermann és Lecomte, 2019). A *Fusarium verticillioides* gazdanövényei a gabonafélék mellett a citrusfélék, a banán és az ananász is (Pitt, 2014).

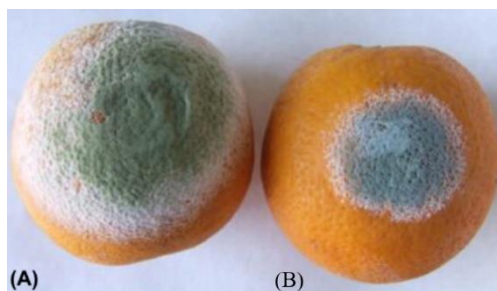
2.5 A kórokozók által okozott tünetek

2.5.1 A *Penicillium* fajok által okozott tünetek citrusféléken

A *P. digitatum* és *P. italicum* fertőződés esetén kezdetben a gyümölcs epidermisze elszíneződik, vízzel átitatott, puha lesz (Konstantinos *et al.*, 2019). A foltban megjelenik a gomba fehér színű micéliuma, amely elkezd terjedni a gyümölcs felületén, míg be nem borítja (Snowdon, 1990; Costa *et al.*, 2019).

A *P. italicum* okozta fertőzés esetén – amely a kékpenészes rothadás néven ismert – a fehér micélium egyre mélyebre hatol a szövetekbe, majd a termés felszínén megjelenik a kék, kékes-zöld színű konídiumtartó gyp (1/B. ábra). A sporuláló konídiumtartókat egy nagyon keskeny, fehér micélium sáv veszi körül (Louw és Korsten, 2015).

A *P. digitatum* esetében, amely citrusfélék a zöldpenészes rothadását okozza, a konídiumtartó gyp olajzöld színű (1/A. ábra) és szélesebb, fehér, nem sporuláló micélium sáv figyelhető meg körülötte, melyet rothadó héj határol. Idővel a gyümölcs teljes felületét beborítja a konídiumtartó gyp (Snowdon, 1990; Palou, 2014). Ezt követi a termés zsugorodása, ami *P. digitatum* esetén mumifikálódott formához vezet, míg a *P. italicum* esetében a mumifikálódott forma ragadós masszává válik (Konstantinos *et al.*, 2019).



1. ábra *Penicillium digitatum* (A) és *Penicillium italicum* (B) okozta gyümölcsrothadás (Forrás: Palou, 2014)

2.5.2 A *Colletotrichum* fajok által okozott tünetek citrusféléken

A gyümölcsökön besüppedű, vízzel átítatott, kerek vagy ovális alakú, barnától feketéig terjedő színű foltok keletkeznek (**2. ábra**), melyekben megjelenhet a rózsaszínű vagy lazacszínű konídium massa is (Guargaccia *et al.*, 2017; Martínez-Blay *et al.*, 2020). Jelentős tünet még a leveleken megjelenő világosbarna foltok, amelyek többé-kevésbé kör alakúak. A betegség előrehaladtával a levelek elszáradnak, majd lehullanak (Agostini *et al.*, 1992; Aiello *et al.*, 2014). A fentiek mellett a *Colletotrichum* fajok okozhatnak korai gyümölchullást is (Lima *et al.*, 2011; Guarnaccia *et al.*, 2017).



2. ábra *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* által okozott tünetek

(Forrás: Guarnaccia *et al.*, 2017)

2.5.3 Az *Alternaria* fajok által okozott tünetek citrusféléken

A citrusfélék alternáriás foltosságát okozó *A. alternata sensu lato* kórokozó hatására apró, a barnától a feketéig terjedő foltok képződnek a fiatal leveleken és gyümölcsökön. A foltok idővel összeolvadhatnak (Whiteside *et al.*, 1988; Akimitsu *et al.*, 2003). A citrusfélék feketerothadását okozó *A. alternata f. sp. citri* tünete a gyümölcsökön a kocsány felől jelenik meg. A fekete elszíneződés, mely a kórokozó micéliumától sötét színű, a belső szövetekben gyorsan terjed (**3. ábra**) (Katoh *et al.*, 2006). A tünetek idővel megjelennek a gyümölcs epidermiszén is, szintén a kocsány felől, nagy kiterjedésű barna színű, rothadó folt formájában (Garganese *et al.*, 2016). A fertőzött gyümölcsök gyakran élénkebb színűek a fertőzésre válaszul keletkező etilén miatt (Katoh *et al.*, 2007).



3. ábra *Alternaria alternata* f. sp. citri okozta gyümölcsrothadás (Forrás: Ohtani *et al.*, 2009)

2.5.4 A *Fusarium* fajok által okozott tünetek citrusféléken

A *Fusarium* fajok, köztük a *Fusarium verticillioides* a citrusfélék gyümölcsének epidermiszén barna színű elváltozásokat okoznak (Zakaria, 2023). A fertőzés helyén a gyümölcs héja kissé besüpped (4. ábra). A kisebb foltok idővel összeolvadhatnak és párás körülmények közt megjelenhet bennük a gomba micéliuma (Jae *et al.*, 2000).

Súlyos fertőzés esetén a gyümölcs belső szöveteiben is megjelenik a gomba, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. sambucini*, *F. equiseti* fajok esetében eltérő, fehér bézs vagy rózsaszínű micéliuma (Whiteside *et al.*, 1988). A fertőzés sok esetben a gyümölcskocsány felől indul ki (Fogliata *et al.*, 2013; Anam *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2023).



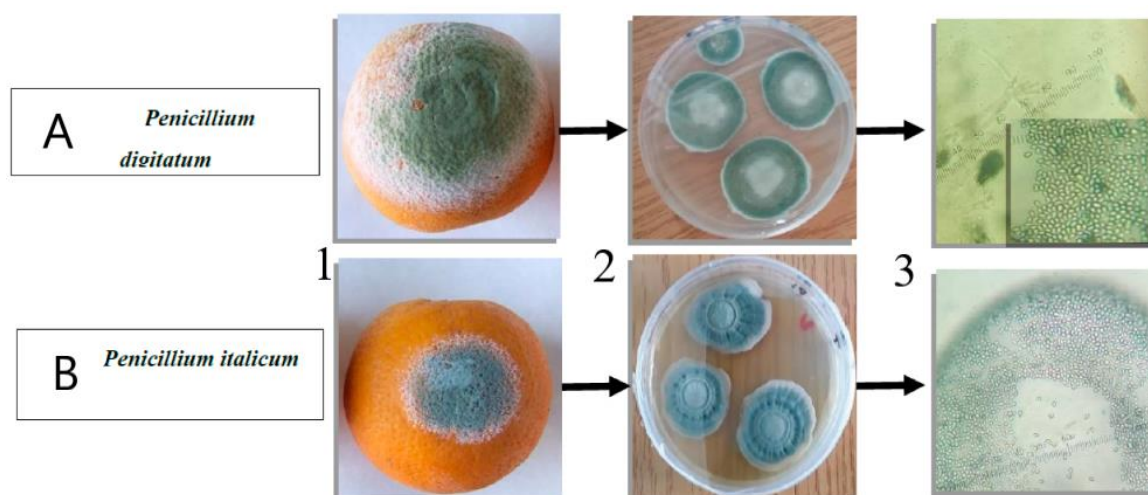
4. ábra *Fusarium concentricum* fajjal fertőzött mandarin gyümölcs
(Forrás: Hasan *et al.*, 2023)

2.6 A kórokozók morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei

2.6.1 A *Penicillium* fajok morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei

A *P. italicum* és *digitatum* tenyészetek gyorsan növekednek malátakivonat-agaron (MEA) és burgonya-dextróz-agaron (PDA) egyaránt. A tenyészetek színi oldala kékes-zöldes, néha fehér árnyalatú, a fonáki oldala pedig krémsárga színű (5. ábra). A telepek textúrája bársonyos, váladékcseppek nélkül. A konídiumtartók a micéliumból erednek, szabálytalanul elágazóak (Palou, 2014; Tahiri *et al.*, 2022).

P. digitatum konídiumai sima falúak, többnyire ovális vagy henger alakúak (5. ábra, A3-as kép), átlagosan 6-8(-15) µm méretűek. *P. italicum* konídiumai többnyire gömb alakúak (5. ábra, B3-as kép) és átlagosan 3-5 µm nagyságúak (Pitt és Hocking, 2009; Tahiri *et al.*, 2022).

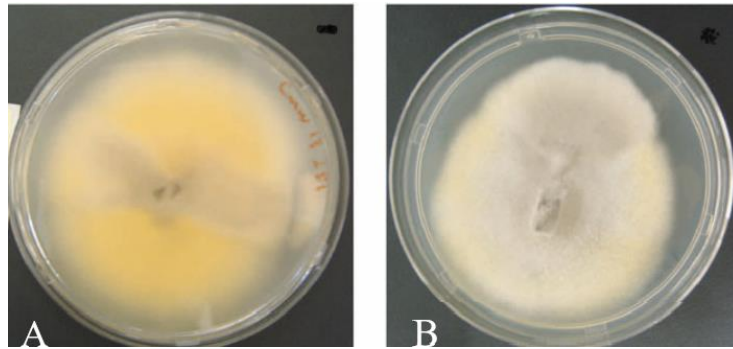


5. ábra *P. digitatum* (A) és *P. italicum* (B) tünete narancson (1), tenyészet (2) és konídiumai (3) (Tahiri *et al.*, 2022)

2.6.2 A *Colletotrichum* fajok morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei

Burgonya-dextróz agaron (PDA) a *Colletotrichum* spp. tenyészetének alapszíne a világosszürkétől a sárgásbarnán át a krémszínűig változhat. Egyes esetekben a tenyészetekben rózsaszínes árnyalat is megjelenhet (Tóth, 2017). Azonban a tenyészetek morfológiája nem elegendő határozóbélyeg a nemzetségen belüli fajkomplexek határozására (Hiremath *et al.*, 1993).

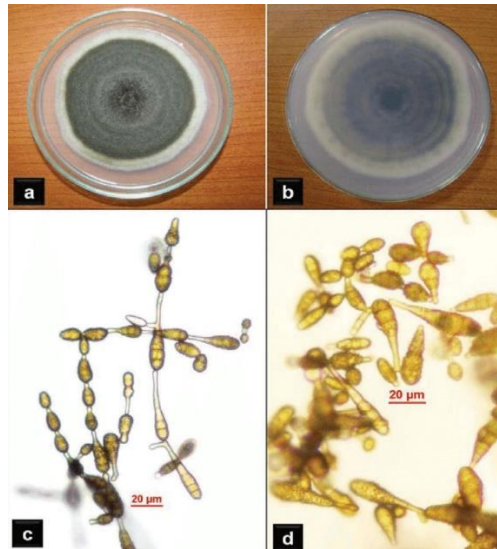
A *C. lupini* kórokozó tenyésztete kör alakú, ép szegélyű, fehéres-szürke színű légmicéliummal. A fonáki oldala narancssárga árnyalatú, a leoltási pont körül sötétebb színű **(6. ábra)** (Lotter és Berger, 2005; Damm *et al.*, 2012; Alkemade *et al.*, 2021). A kórokozó konídiuma egysejtű, hialin, sima felületű, jellemzően hengeres. A *C. lupini* konídiumok átlagos mérete 7-21,5 μm x 3,5-7 μm között változik (Nirenberg *et al.*, 2002; Talgo *et al.*, 2007; Damm *et al.*, 2012). A növekedés napi üteme 6,2 mm (Alkemade *et al.*, 2021).



6. ábra A *Colletotrichum lupini* tenyésztete PDA táptalajon, színi (B) és fonáki oldala (A) (Lotter és Berger, 2005)

2.6.3 Az *Alternaria* fajok morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei

Alternaria alternata sensu lato kórokozót PDA táptalajon (25 ± 1 °C) inkubálva, a tiszta tenyészetek gyors növekedésűek, szabálytalan alakúak, olívazöld színűek, a szegélyük kivilágosodó **(7. ábra)**. A konídiumok tojásdadok, horizontálisan és függőlegesen szeptáltak, 1-6 és 0-2 sejtfallal tagoltak, átlagosan 16–46 μm × 4–16 μm méretűek (Wang *et al.*, 2010; Woudenberg *et al.*, 2015; Moosa *et al.*, 2021).

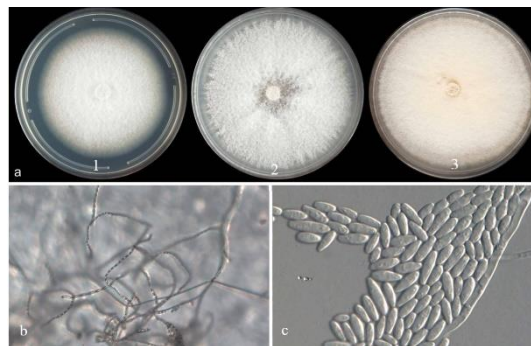


7. ábra *Alternaria alternata* kórokozó tenyészetek (A) színi és (B) fonáki oldala, (C, D) konídiumok mikroszkópos képe (Forrás: Kumar *et al.*, 2018)

2.6.4 A *Fusarium* fajok morfológiai tulajdonságai és tenészbélyegei

A *Fusarium* fajok tenészein PDA táptalajon bőséges, általában krémfehér színű légmicélium látható, illetve a tenészetekben gyakran lilásbarna pigmentáció figyelhető meg. A *F. verticillioides* (8. ábra) makrokonídiumai hialinok, orsó alakúak, általában 5 szeptummal rendelkeznek, méretük $13-15\ \mu\text{m} \times 3-4\ \mu\text{m}$ és $27-29\ \mu\text{m} \times 4-5\ \mu\text{m}$ között változik, a mikrokonídiumok mérete pedig $3-4\ \mu\text{m} \times 1-2\ \mu\text{m}$ és $9-10\ \mu\text{m} \times 1-3\ \mu\text{m}$ között változik, színük hialin, alakjuk ovális (Pitt, 2014).

Hasan *et al.* (2020) által mandarinról izolált *Fusarium concentricum* faj tenészei PDA táptalajon fehéres színűek voltak, bennük klamidospórákat és makrokonídiumokat figyeltek meg, alakjuk ovális, szeptummal nem rendelkeztek (Hasan *et al.*, 2020).



8. ábra A *Fusarium verticillioides* 7 napos tenésze PDA táptalajon izolálva. A tenészetek (A) fényen (1) és sötétben nevelve (2,3), illetve a konídium láncokról (B) és a konídiumokról (C) készült mikroszkópos képek (Forrás: Yilmaz *et al.*, 2021).

2.7 A kórokozók biológiája

2.7.1 A *Penicillium* fajok biológiája

Nekrotróf kórokozóként a *P. digitatum* és *P. italicum* különféle mechanikai sérülésekből és környezeti tényezőkből, köztük hidegtől, égéstől, szélről, jégesőtől és rovaroktól származó sebeken keresztül fertőzi meg a citrusfélék gyümölcsét (Droby *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2017). A faj citrusfélékhez kötötten fordul elő (Frivad és Samson, 2004; Jonas *et al.*, 2019). A fertőzött gyümölcsökön termelt spórák nagy mennyiségben a levegőben terjednek, és könnyen megfertőzhetik a környező gyümölcsöket bármely szállítási és tárolási szakaszban, a betakarítás előtt vagy után. A betegség várható kifejlődésének súlyossága általában függ a sebeken megtelepedett kórokozó spórák mennyiségétől, a termés érettségétől (az érett gyümölcsök nagyon fogékonyak) és a kórokozók fertőzéséhez optimális környezeti feltételektől (hőmérséklet: 20-25°C) (Konstantinos *et al.*, 2019). A citrusfélék *P. digitatum*-mal történő mesterséges fertőzése után a gomba fejlődésének mértéke a citrus fajtól is függ. A *Citrus paradisi* érett termése érzékenyebb erre a kórokozóra, mint a *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus clementina* (Ortuno *et al.*, 2011). A *P. italicum* fejlődése lassabb, viszont jobban ellenáll a hidegnek, szemben a *P. digitatum*-mal (Whiteside *et al.*, 1988).

Louw és Korsten, (2015) vizsgálatai alapján *P. italicum* jelentősen nagyobb elhalást okozott normál szobahőmérsékleten tárolt citromon ($33,9 \text{ mm} \pm 11 \text{ mm}$), és kisebb mértékűt ($19,9 \pm 11 \text{ mm}$) hűtött tárolóban ($86,4 \pm 4,5\%$ relatív páratartalomban). A kórokozó növekedési sebessége gyümölcsön 4,8 mm/nap normál és 1,4 mm/nap hűtött körülmények között. A *P. italicum* által okozott fertőzések a károsodás első jeleit hűtött körülmények között 12-13 nap elteltével, míg normál környezeti körülmények között 2-3 nap után mutat.

2.7.2 A *Colletotrichum* fajok biológiája

Biológiájukat tekintve a *Colletotrichum* nemzetség tagjai hemibiotróf, illetve nekrotróf kórokozók. A gomba elsősorban a növények sérült vagy legyengült szöveteibe hatol be. Ott a konídiumok kicsíráznak, az appresszóriumok lehetővé teszik a gomba számára, hogy közvetlenül behatoljon a gazdaszervezet kutikulájába és az epidermisz sejtfalába. Kialakulnak az acervuluszok, a gomba szaporítóképletei, melyekből a távozó konídiumok, viszonylag rövid idő alatt terjedhetnek el az esőcseppek vagy esőztető öntözés révén más egészséges növényre, megfertőzve azt. A fertőzés szöveti nekrozist eredményez. Az elhalt növényi maradványok az elsődleges fertőzési források (Dean *et al.*, 2012; Ajay, 2014).

2.7.3 Az *Alternaria* fajok biológiája

Az *Alternaria* nemzetségbe tartozó fajok konídiumai légmozgással terjednek, majd a fiatal, fogékony gyümölcsök vagy levelek felületén gyorsan kicsíráznak, és akár már azelőtt toxintermelésbe kezhetnek, mielőtt behatolnának a szövetekbe, közvetlenül az epidermiszen vagy a sztómákon keresztül (Akimitsu *et al.*, 2003).

2.7.4 A *Fusarium* fajok biológiája

A *Fusarium* fajok többsége talajlakó. Kórokozóként a föld feletti és a föld alatti növényi részeket fertőzik (Summerell *et al.*, 2003). A *Fusarium* fajok konídiumai levegővel, esőcseppekkel és öntözővízzel terjedhetnek. Az egyes fajok klamidospórái hosszú ideig megmaradhatnak a talajban és az elhalt növényi szövetekben (Smith, 2007). A legtöbb faj hemibiotróf, a fertőzés korai szakaszában a kórokozó növekedése és fejlődése a növénytől függ, majd nekrotrof életmódot folytat, mely során elpusztítja a gazdanövényt (Lin *et al.*, 2013). Egyes fajok közvetlenül megfertőzhetik a növényeket, és vannak olyan fajok, amelyek sebeken keresztül fertőznek. A fertőzés következtében citrusféléken szállítószöveti, gyökér és szárelhalást, gyümölcsrothadást figyelhetünk meg (Zakaria, 2023).

2.8 A kórokozók elleni védekezés

A betakarításkori és utáni biotikus és abiotikus stresszfaktor, mint például a szedés, csomagolás, tárolás, szállítás és raktározás, fokozott mechanikai sérüléseket eredményezhet, ami a gyümölcsöket fertőző kórokozók megjelenését eredményezheti. Általában a citrusfélék betakarítás utáni gyümölcsrothadásának aránya 10-30% körül van, bár súlyos fertőzés esetén akár 50%-ra is emelkedhet (Youssef és Hussien, 2020; Strano *et al.*, 2022). Az eltarthatóságot növelő kezelések nélkül, a gyümölcsök gombás rothadásából eredő vesztesége a becslések szerint elérheti a 90%-ot (Bhatta, 2022). Jelenleg a védekezésre használt leggyakoribb fungicidek a szterin-demetiláz inhibitorok (DMI), mint az imazalil, pirimetanil, fludioxonil és tiabendazol (El-Otmani *et al.*, 2011; Tahiri *et al.*, 2022).

3 Anyag és módszer

3.1 A vizsgálat helye és ideje

A gyümölcsök, melyeket gyűjtöttünk kórokozó gomba által okozott betegségekre utaló tüneteket mutattak (9. ábra). A patogének azonosításához szükséges vizsgálatokat a Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszékének a laboratóriumában végeztünk 2022. februárja és decembere között.



9. ábra *Penicillium* spp. okozta gyümölcsrothadás (Fotó: Szendrei, 2022)

3.2 A vizsgálat anyaga

3.2.1 A vizsgált gyümölcsök

A gombás tüneteket mutató citrusfélék gyümölcssei hazai szupermarketekből, zöldség-gyümölcs kiskereskedelemből, piacokról származtak. Összesen 20 izolátummal dolgoztam, melyek adatait az 1. táblázatban összesítettem.

1. táblázat A vizsgált minták és az azokról származó izolátumok jellemző adatai

Izolátum kódja	Gazda-növény	Növényvédőszer, mellyel kezelték a gyümölcs felületét	Izolátum kódja	Gazda-növény	Növényvédőszer, mellyel kezelték a gyümölcs felületét
CI01	Mandarin	Imazalil	CI11	Citrom	Bio
CI02	Lime	Imazalil, Pyrimethanil	CI12	Lime	Imazalil
CI03	Mandarin	Imazalil, Thiabendazol	CI14	Citrom	Bio
CI04	Citrom	Imazalil	CI15	Mandarin	Imazalil, Pyrimethanil
CI05	Citrom	Imazalil, Thiabendazol	CI16	Mandarin	Imazalil, Thiabendazol
CI06	Grapefruit	Imazalil, Thiabendazol	CI19	Citrom	Bio
CI07	Citrom	Bio	CI20	Mandarin	Imazalil, Thiabendazol
CI08	Mandarin	Imazalil, Pyrimethanil	CI22	Citrom	Bio
CI09	Citrom	Bio	CI23	Lime	Imazalil
CI10	Citrom	Imazalil	CI24	Grapefruit	Imazalil, Pyrimethanil

3.2.2 A felhasznált eszközök

A vizsgálatainkhoz a Tanszék laboratóriumában található általános fém-, porcelán-, üveg- és műanyag eszközöket használtunk (lándzsatű, bonctű, 7 mm-es gyökérfűrő, dörzsmozsár, tárgylemez, lombik, mikrocentrifuga csövek stb.). A tenyészeteket 85 mm-es műanyag Petri-csészékben tartottuk fenn.

A kórokozókat minden esetben a gyümölcs belső szövetéből Thermo Scientific MSC 1.2 lamináris fülke alatt izoláltuk. A tenyészeteket Sanyo MLR-351 fitotronban inkubáltuk. A fertőzött növényi részek és a szaporítóképletek vizsgálata során Leica MZ6 sztereomikroszkópot és Nikon Eclipse 50i kutatómikroszkópot használtunk. A mikroszkópos felvételeket QImaging MicroPublisher 5.0 RTV kamerával készítettük.

A polimeráz láncreakciókat Applied Biosystems 9700 típusú PCR készülékben végeztük. Használtunk továbbá Thermolyne Maxi Mix Plus vortex készüléket, Minispin Eppendorf asztali centrifugát, és UniEquip, Univapo 100 ECH vákuum koncentrátort.

3.2.3 Táptalaj, indítószekvenciák

A kórokozókat burgonya dextróz agar (Potato dextrose agar, PDA, BioLab Zrt.) táptalajon izoláltuk. A tiszta tenyészetek előállításához és az izolátumok fenntartásához (jellemzéshez, patogenitási teszthez, molekuláris azonosításhoz) szintén PDA táptalajt használtunk.

A molekuláris azonosításhoz univerzális indítószekvenciákat használtunk, melyek a kórokozók 18S rRNS gén egy részét, az ITS1 régiót, az 5,8S rRNS gént, az ITS2 régiót és a 28S rRNS kódoló gén egy részét amplifikálják. ITS1 primer: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3', ITS4 primer: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. A PCR vizsgálathoz DreamTaq DNS polimeráz enzimet használtunk. A kalmodulin gén vizsgálatához a CA_CAL1: 5'-TGAGTACAAGGAGGCCTTCTCCC-3', CA_CAL2: 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGACGAACTC -3' primerpárt használtuk.

A PCR termékeket szekvencia meghatározás előtt High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche) tisztítottuk.

3.3 A vizsgálat módszere

3.3.1 A növényi részek gyűjtése

A gombás tüneteket mutató citrusfélék gyümölcsei hazai szupermarketekből, zöldség-gyümölcs kiskereskedelemből, piacokról származtak. A megvásárolt gyümölcsöket papírzacskóba helyeztük és a laborba szállításig 4 °C-on tároltuk.

3.3.2 Tünetek jellemzése

A fertőzött gyümölcsökön megjelenő fő- és kísérőtüneteket szabad szemmel, illetve sztereomikroszkóp alatt tanulmányoztuk: feljegyeztük a foltok jellemző morfológiai tulajdonságait.

3.3.3 A kórokozók izolálása táptalajon, tiszta tenyészetek fenntartása

A kórokozókat minden esetben a gyümölcs belső szövetéből izoláltuk az egészséges és beteg rész határáról. A Petri-csészéket parafilmmel lezártuk, majd 24 °C-n, sötétben inkubáltuk.

A növekedésnek indult tenyészetek széléből micéliumkorongokat metszettünk ki és helyeztünk át steril táptajra (**10. ábra**), így létrehoztuk a tiszta tenyészeteket. Az izolátumok növekedési ütemének kiszámításához 4 naponta mértük a tenyészetek átmérőjét. A tenyészetek fenntartása érdekében a már ismertetett módszerrel 4 hetente a kórokozót új agarlemezre áttoltottuk.



10. ábra Tiszta tenyészetek létrehozása steril fülke alatt (Fotó: Szendrei, 2022)

3.3.4 Morfológiai vizsgálatok

A morfológiai bélyegek közül vizsgáltuk a konídiumok keletkezésének helyét, módját, a konídiumok sejtszámát, színét, méretét és alakját. A részletes morfológiai jellemzéshez steril lándzsát segítségével konídiumokat emeltünk le a fertőzött növényi részekről, majd áthelyeztük azokat tárgylemezre és citoplaszt mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A fent említett tulajdonságokon túl 50-50 konídium hosszúságát és szélességét határoztuk meg. Vizsgáltuk még a tiszta tenyészetek általános morfológiai jellemzőit: a tenyészetek alakját, színét, mintázottságát, felszínét, növekedési ütemét és a szaporító képletek képződését.

3.3.5 Patogenitási teszt

A patogenitási tesztekhez az egészséges, kezeletlen héjú (vagy biológiai termesztésből származó), gyümölcsöket alkohollal fertőtlenítettük lamináris fülke alatt. A gyümölcsöket 2 percre a 70%-os etanolba, majd ismét 2 percre steril vízbe helyeztük, ezután leszártottuk a nedvességet a gyümölcsök felületéről. A gyümölcsöket steril üvegekbe, steril üveggyöngyökre helyeztük, alájuk steril vizet öntöttünk, majd a kórokozó 14 napos tenyészetéből származó 5 mm-es micélium korongokkal inokuláltuk a gyümölcsök egy részét.

3.3.6 Molekuláris azonosítás

Nukleinsav kivonás

A kórokozók fiatal, 1 hetes tenyészeiből DNS-t nyertünk ki a molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez. A tenyészetekből lamináris fülkében micéliumot emeltünk le, majd dörzsmozgásban kvarchomok segítségével eldörzsöltük azokat. 700 µl CTAB puffert (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM TRIS-HCL pH: 8; 0,2% 2-ME) adtunk hozzá, és tovább homogenizáltuk a mintákat. Az elegyet mikrocentrifuga csövekbe töltöttük, majd 40 percig 65 °C-os hőmérsékleten asztali termosztátban inkubáltuk.

A szennyeződések és egyéb anyagok (pl. fehérjék) eltávolításához a mikrocentrifuga csövekbe szerves oldószert – 700 µl izoamilalkoholos-kloroformot (1:24) – pipettáztunk, amelyet kézi rázás után, vortex segítségével kevertünk össze, majd 10 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, asztali centrifugával 13400 forulat/perc (maximum) fordulatszámon. A mikrocentrifuga csövek felső részén lévő, puffert tartalmazó vizes fázist tiszta csövekbe pipettáztuk, majd hozzáadtunk térfogatarányosan izoamilalkoholos-kloroformot, majd ismét vortexeltük a mintákat, melyeket ezt követően újabb 10 percig centrifugáltunk, szintén maximum fordulatszámon. A felső fázist ismét tiszta csövekbe pipettáztuk és hozzáadtunk 600 µl izopropanolt, amellyel a nukleinsavakat denaturáltuk. A következő centrifugálás (5 perc) után leöntöttük a felülúszót és a pelletet 5 perces centrifugálás során 70%-os etanollal mostuk. Az etanolt leöntöttük, lecsepegtettük, majd az pelletet 10 percig vákuum szárítóban szárítottuk, ezt követően 30 µl RNase-t tartalmazó TE-oldatban oldottuk vissza. A kivont örökítőanyagot mélyhűtőben tároltuk -20 °C-on.

PCR (Polimeráz-láncreakció, polymerase chain reaction) vizsgálat

A PCR során az ITS régiót amplifikáltuk, melyhez az ITS1 és ITS4 primerpárokat használtuk. A kalmodulin gén vizsgálatához a CA_CAL1 - CA_CAL2 primerpárt használtuk.

A vizsgálatához az alábbiakat mértük össze 40 µl végtérfogatra reakciónként: 20µl Thermo Scientific Master Mix (2X) (MgCl₂ 20mM, dNTPS 5mM, DreamTaq puffer, DreamTaq polimeráz enzim 5 u/µl), 2-2 µl ITS1, ITS4 primer (20 pmol/µl), 4 µl DNS és 12 µl steril víz.

Egy ciklus a polimeráz láncreakció során három lépésből állt: denaturáció 94 °C, 30 mp (komplementer szálak elválasztása), annealáció 55 °C (ITS), 59 °C (kalmodulin), 30 mp (indítószekvenciák kötődése) és elongáció 72 °C, 120 mp (láncosszabbítás). Az elsődleges denaturációt (94 °C, 5 perc) 35 ciklus követte. A reakció a befejező láncosszabbítással (72 °C, 10 perc) zárult. A PCR eredményét Eco Safe festéket (Eco Safe Nucleic Acid Staining Solution, Biocenter) tartalmazó 1%-os agarózgélben gélelektroforézissel ellenőriztük.

A nukleotid szekvencia meghatározása

A PCR termékeket a PCR High Purification Kittel (Roche, Németország) tisztítottuk ki a gyártó utasításai szerint. A célszekvenciát a BaseClear B.V. (Leiden, Hollandia) céghez küldtük közvetlen szekvencia meghatározásra. A szekvenciák szerkesztéséhez, illetve összehasonlításához CLC Sequence Viewer 7 (CLC Bio) programot használtunk. A kórokozók azonosításához az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázist, illetve annak BLAST programját használtuk fel.

4 Eredmények

4.1 *Penicillium* spp. okozta tünetek

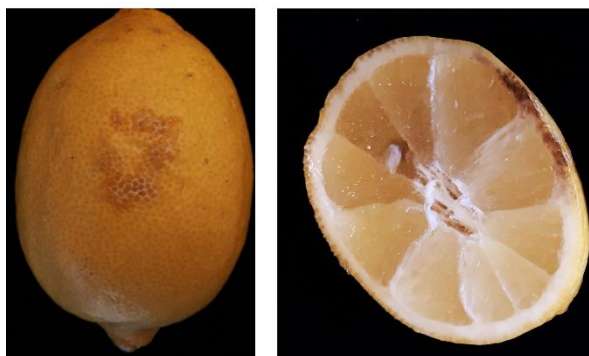
4.1.1 Citromon megfigyelt tünetek

Egyes esetekben (CI05, CI07 izolátumok) a kocsánnyal ellentétes oldal felől kiinduló, nagy kiterjedésű micéliumbevonatot figyeltünk meg, melyet kékes színű sporuláció követett. A gyümölcs héja matt volt és enyhén elszíntelenedett a micéliummal bevont felület körül. Felvágva a gyümölcsöt a belső szövetben enyhe barnulást, illetve rothadást figyeltünk meg a micéliummal bevont terület felől, ahogy az a **11. ábrán** látható.



11. ábra CI05-ös izolátum okozta tünetek citromon (Fotó: Muhari, 2022)

Egyes gyümölcsök esetén a gomba micéliuma a gyümölcs epidermiszének teljes felületét beborította már a vizsgálatok kezdetekor (CI11), melyen nagy mennyiségű, kékes-zöld színű konídiumtartó gypet figyeltünk meg. A gyümölcs belső szöveteiben rothadás alakult ki ebben az esetben is. Az egyik minta esetében a gyümölcs epidermiszén 2-4 cm átmérőjű, beszáradt, kör alakú foltot figyeltünk meg (CI14), melyben megjelent a gomba micéliuma (**12. ábra**). A gyümölcs epidermisze matt volt, a folt körül enyhén elszíntelenedett. A gyümölcsöt felvágva a folt alatt a gyümölcs héjának barnulását tapasztaltuk.



12. ábra CI14-es izolátum okozta tünetek citromon (Fotó: Muhari, 2022)

4.1.2 Mandarinon megfigyelt tünetek

Mandarin esetében a fertőzött gyümölcs epidermisze matt volt, a kocsány felőli részétől kiindulva, nagy kiterjedésű micéliummal bevont felületet figyeltünk meg, melyben kékes színű sporuláció alakult ki (CI01, CI08, CI20 izolátumok). A gyümölcsök belső szövege rothadt, egy esetben a kékes színű sporulációt a belső szövetekben is megfigyeltük (CI08).

Nagy kiterjedésű, vizenyős rothadás is megjelent a gyümölcs epidermiszén a gomba micéliumával együtt (CI03-as, CI16-os izolátumok). A gomba zöldes színnel sporulált a rothadó foltban (CI03-as izolátum). Felvágva, szintén feljegyeztük a belső szövetek rothadását.

Egy esetben a héjon néhány milliméteres világosbarna, kissé besüppedő foltokra lettünk figyelmesek. A gyümölcsöt felvágva a foltok alatt a gyümölcs héja barnult, alatta pedig a gyümölcs szövege rothadt volt (CI15-ös izolátum) (13. ábra).



13. ábra CI15-ös izolátum okozta tünetek mandarinon (Fotó: Muhari, 2022)

4.1.3 Grapefruiton megfigyelt tünetek

A grapefruit gyümölcs epidermiszén nagy felületen fehér színű micélium bevonat alakult ki. A gyümölcs epidermisze mattá vált és elszíntelenedett a micéliummal borított terület körül. A gyümölcs belső szövetében rothadás alakult ki (CI06-os izolátum).

4.2 *Alternaria* spp. okozta tünetek

4.2.1 Citromon megfigyelt tünetek

A kocsány felőli részen barnult, és rothadt a gyümölcsök epidermisze. A gyümölcsöket felvágva a belső szövetekben is rothadást tapasztaltunk, illetve megjelent benne a gomba sötétbarna színű micéliuma is (CI04, CI22) (14. ábra).



14. ábra CI22-es izolátum okozta tünetek citromon (Fotó: Muhari, 2022)

4.2.2 Grapefruiton megfigyelt tünetek

A gyümölcs felületén egy, nagyjából 3 cm átmérőjű kör alakú foltot figyeltünk meg, mely körül a gyümölcs héja enyhén megpuhult. A gyümölcs belső szövetében a kocsány körül, a folt alatt rothadást tapasztaltuk, melyben azonosítottuk a kórokozó sötét színű micéliumát (CI24) (15. ábra).



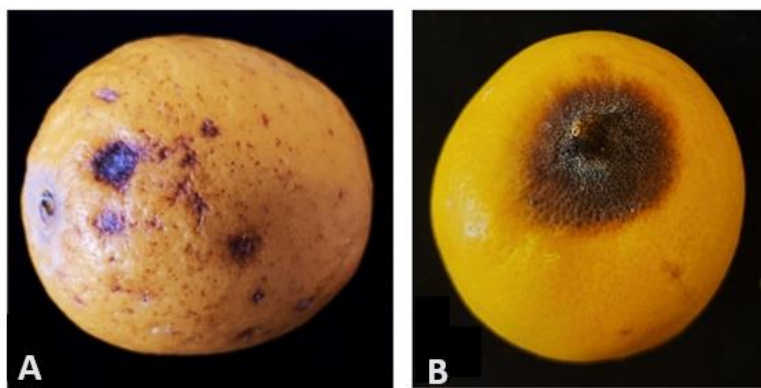
15. ábra CI24-es izolátum okozta tünetek grapefruiton (Fotó: Muhari, 2022)

4.3 *Colletotrichum* spp. okozta tünetek

4.3.1 Citromon megfigyelt tünetek

A *Colletotrichum* fajok okozta tünetek (16. A ábra) esetében a gyümölcs epidermiszén több, pár milliméterestől a centiméteres átmérőig terjedő, besüppedő, barna színű foltokat tapasztaltunk. A gyümölcs belső szöve a foltok alatt barnult és rothadt (CI09-es izolátum).

Más esetben a gyümölcs kocsánya felől nagy kiterjedésű, sötét barna, besüppedő foltot figyeltünk meg (16. B ábra). A foltban megjelent a gomba micéliuma. A gyümölcs belső szövetében a kocsány körül rothadás alakult ki (CI19-es izolátum).



16. ábra A: CI09-es izolátum okozta tünetek, B: CI19-es izolátum okozta tünetek citromon
(Fotó: Muhari, 2022)

4.3.2 Lime-on megfigyelt tünetek

Az érett gyümölcs epidermiszén különböző átmérőjű, egybeolvadó, kerek, barna színű foltokat figyeltünk meg, melyekben megjelent a gomba micéliuma. A gyümölcsszövet barnult, rothadt volt (CI23-as izolátum).

4.4 *Fusarium* spp. okozta tünetek

4.4.1 Citromon megfigyelt tünetek

A gyümölcs felületén 0,5-1 cm átmérőjű sötétbarna enyhén besüppedő foltokat tapasztaltunk, a foltok közepén fehér színű micélium jelent meg. A gyümölcs belső szövetében a héj a foltok alatt elvékonyodott, illetve enyhe barnulást tapasztaltunk (CI10-es izolátum).

4.4.2 Lime-on megfigyelt tünetek

A gyümölcsökön világosbarna foltokat figyeltünk meg (**17. ábra**). A foltok alatt szintén megfigyeltük a gyümölcs héjának elvékonyodását és barnulását, illetve a szövetek rothadását (CI02, CI12 izolátumok).



17. ábra CI02-es izolátum okozta tünetek lime-on (Fotó: Muhari, 2022)

4.5 Morfológiai tulajdonságok és tenyészbélyegek

Az izolátumok konídiumainak paramétereit a 2. számú táblázat tartalmazza.

2. táblázat A kórokozók konídiumainak mérete

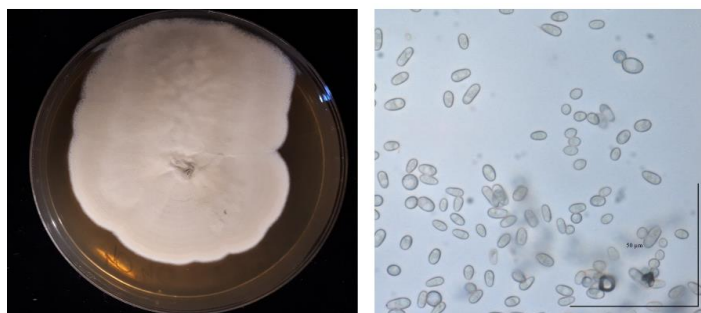
Izolátum	Hosszúság [μm]			Szélesség [μm]		
	Minimum	Maximum	Átlag	Minimum	Maximum	Átlag
CI01	2,2	4,4	2,9	2,0	4,8	2,8
CI02 mikrokonídium makrokonídium	10,1	14,2	12,6	2,1	4,2	3,0
	22,3	30,1	26,6	3,2	4,9	4,1
CI03	2,8	5,6	3,5	1,3	3,4	2,3
CI04	10,0	29,6	17,2	4,5	12,5	8,9
CI05	4,7	9,5	7,1	2,3	5,3	3,5
CI06	3,1	12,6	5,9	2,5	6,0	3,2
CI07	3,2	9,3	5,0	2,5	5,4	3,8
CI08	2,5	4,5	3,2	1,7	3,0	2,2
CI09	11,5	19,4	16,0	3,3	5,7	4,8
CI10 mikrokonídium makrokonídium	5,6	12,1	7,5	1,5	2,6	2,1
	25,9	60,2	40,5	2,6	4,0	3,2
CI11	1,9	3,7	2,7	1,9	3,3	2,6
CI12 mikrokonídium makrokonídium	3,0	11,7	6,2	1,6	4,1	2,7
	23,2	30,3	25,8	3,0	4,2	3,6
CI14	1,7	3,4	2,5	1,5	3,0	2,4
CI15	1,1	2,8	2,1	1,5	2,8	2,0
CI16	2,2	4,5	3,2	2,0	4,2	3,0
CI19	12,0	17,6	15,3	3,7	6,1	5,0
CI20	2,2	3,7	3,1	1,5	3,2	2,3
CI22	8,8	26,1	16,9	5,8	13,0	9,3
CI23	9,5	19,9	13,2	2,5	4,4	3,4
CI24	8,2	26,7	16,7	6,1	13,5	9,6

Magyarázat a 2. táblázathoz: A táblázatban kék színnel a *Penicillium*, sárga színnel az *Alternaria*, piros színnel a *Colletotrichum*, zöld színnel a *Fusarium* fajokat jelöltük.

4.6 *Penicillium* spp. morfológiai tulajdonságai és tenyészbélyegei

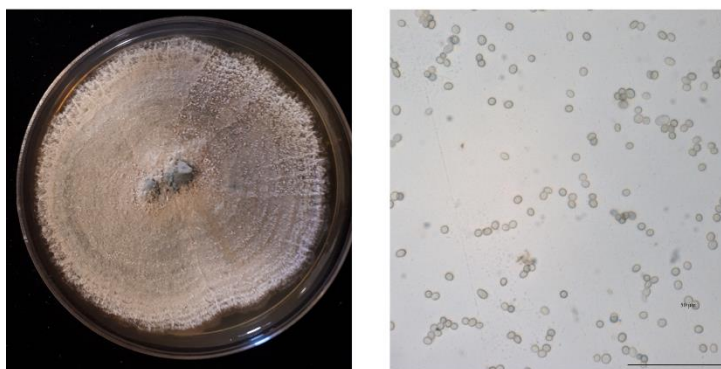
4.6.1 Citromról izolált *Penicillium* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

A CI05-ös és CI07-es izolátum tenyésztete viszonylag lassan (20 nap alatt) nőtte be a táptalaj felszínét. A tenyészet krémféhér színű, szabálytalan alakú, ép szegélyű és bársonyos textúrájú volt. A konídiumok egysejtűek, kissé ovális alakúak, paramétereiket tekintve átlagosan $3,8 \times 5 \mu\text{m}$ a CI07-es izolátum esetében, a CI05-ös izolátumnál, kissé nagyobb, $3,4 \times 7,1 \mu\text{m}$ nagyságúak voltak (**18. ábra**).



18. ábra A CI05-ös izolátum tenyésztete és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

A CI11-es izolátum tenyésztete szabálytalan kör alakú volt, viszonylag gyorsabban 17 nap alatt nőtte be a táptalaj felszínét. A tenyészet enyhén kékes-zöld színű volt, megfigyeltünk benne zónázottságot. A konídiumok egysejtűek, gömb alakúak, méretüket tekintve átlagosan $2,6 \times 2,7 \mu\text{m}$ nagyságúak voltak (**19. ábra**).

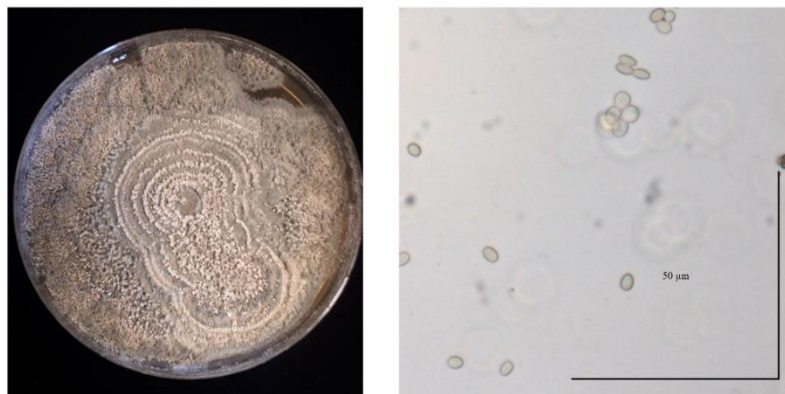


19. ábra A CI11-es izolátum tenyésztete és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

A CI14-es izolátum tenyészbélyegeiben megegyezett a CI11-es izolátummal, viszont lassabban növekedett annál, nagyjából 1 hónap alatt nőtte be a táptalaj felszínét. Az egysejtű, gömb alakú konídiumok mérete átlagosan $2,3 \times 2,5 \mu\text{m}$ nagyságú volt.

4.7 Mandarinról izolált *Penicillium* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

A CI01-es, CI03-as (**20. ábra**), CI08-as izolátumok tenyészetei a CI11-eshez hasonlóan szabálytalan kör alakúak voltak, viszont annál viszonylag gyorsabban 14 nap alatt nőttek be a táptalaj felszínét. A CI01-es, CI03-as és CI08-as izolátum esetében a tenyészet növekedésének



20. ábra A CI03-as izolátum tenyészet és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

mértéke megegyezett a CI11-es izolátummal. A tenyészet enyhén kékes-zöld színű volt, megfigyeltünk benne zónázottságot. A konídiumok gömb alakúak voltak, méretük átlagosan $2,8 \times 2,9 \mu\text{m}$ nagyságú volt a CI01-es izolátum esetében. Az apró konídiumok egysejtűek, ovális alakúak voltak, méretük átlagosan $2,3 \times 3,5 \mu\text{m}$ nagyságú a CI03-as és $2,2 \times 3,2 \mu\text{m}$ nagyságú volt a CI08-as izolátum esetében.

A CI15-ös izolátum tenyészbélyegeiben megegyezett a CI14-es izolátummal, azonban lassabban növekedett a többi izolátumhoz képest, nagyjából 1 hónap alatt nőtte be a táptalaj felszínét. A konídiumok egysejtűek, gömb alakúak, átlagosan $1,9 \times 2 \mu\text{m}$ nagyságúak voltak.

A CI16-os és CI20-as izolátumok tenyészet 20 nap alatt nőtte be a táptalaj felszínét. A tenyészetek színe fehér, alakjuk szabálytalan, szegélye kissé csipkézett volt (**21. ábra**). A konídiumok egysejtűek, gömb alakúak voltak, nagyságuk átlagosan $3 \times 3,2 \mu\text{m}$ volt CI16-os izolátum és $2,3 \times 3,1 \mu\text{m}$ a CI20-as izolátum esetében.



21. ábra A CI16-os izolátum tenyészet és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

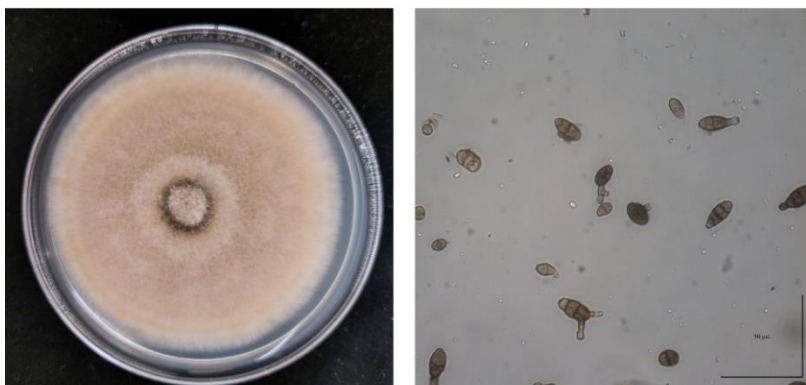
4.7.1 Grapefruitról izolált *Penicillium* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

A CI06-os izolátum tenyésztete viszonylag lassan 20 nap alatt nőtte be a táptalaj felszínét. A tenyészet krémfehér színű, szabálytalan alakú, ép szegélyű és bársonyos textúrájú volt a CI05-ös és CI07-es izolátumhoz hasonlóan. A konídiumok egysejtűek, kissé ovális gömb alakúak, paramétereiket tekintve átlagosan $3,2 \times 5,9 \mu\text{m}$ nagyságúak voltak.

4.8 Az *Alternaria* spp. tenyészbélyegei és morfológia tulajdonságai

4.8.1 Citromról izolált *Alternaria* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

Mindkét izolátum esetében (CI04, CI22) a tenyészet szabályos kör alakú volt és barna színű légmicélimot képzett, illetve a tenyészet növekvő szélé fehér színű volt (22. ábra). A telepek a táptalajt 19 (CI04) és 21 (CI22) nap alatt nőtték be. A konídiumok a nemzetségre jellemzően hosszúkas, bunkó alakúak, kereszt és hosszirányban is tagoltak, valamint barna színűek voltak. A konídiumok mérete átlagosan $15,3\text{--}17,2 \times 8,9\text{--}9,3 \mu\text{m}$ volt.



22. ábra A CI22-es izolátum tenyésztete és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

4.8.2 Grapefruitról izolált *Alternaria* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

A CI24-es izolátum tenyésztete szintén szabályos kör alakú volt, benne barna színű légmicélumot figyeltünk meg, a tenyészet szélé kifehéredett. A kórokozó CI24-es izolátumának konídiumai a citromról izoláltakhoz hasonlóan a nemzetségre jellemzőek voltak. A konídiumok paramétereit a 2. táblázatban találhatók.

4.9 *Colletotrichum* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

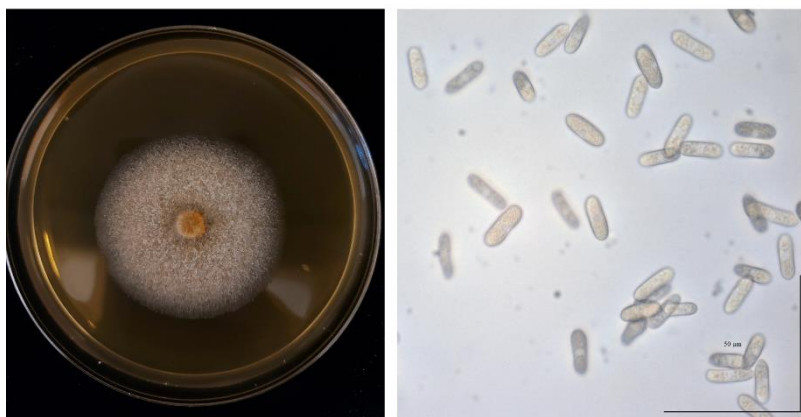
4.9.1 Citromról izolált *Colletotrichum* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

A CI09-es izolátum tenyésze gyors növekedésű volt (11 nap alatt nőtte be a táptalajt), fehér színű légmicéliumot képzett. Már a fiatal tenyészetben tapasztaltuk a nemzetségre jellemző narancssárga színű konídiummassza képződést, mely az egész tenyészet felületén, koncentrikus körökben jött létre (**23. ábra**). Konídiumok egysejtűek, hialinok, henger alakúak voltak, méretük átlagosan $4,8 \times 16 \mu\text{m}$ volt.



23. ábra A CI09-os izolátum tenyésze és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

A CI19 izolátum tenyésze szintén gyors növekedésű volt (12 nap alatt nőtte be a táptalajt), fehér színű légmicéliumot képzett. A CI19-es izolátum esetében csak a leoltási pont körül tapasztaltuk konídiummassza képződését (**24. ábra**). Konídiumok egysejtűek, hialinok, henger alakúak voltak, méretük átlagosan $4,8 \times 16 \mu\text{m}$ volt (**24. ábra**).



24. ábra A CI19-os izolátum tenyésze és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

4.9.2 Lime-ről izolált *Colletotrichum* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

CI23-as izolátum tenyészte szabályos kör alakú, krémfehér színű, szintén gyors növekedésű volt (12 nap alatt nőtte be a táptalajt), benne zónázottságot figyeltünk meg. A konídiumok [13,2x3,4µm] egysejtűek, hialinok, henger alakúak voltak (**25. ábra**).



25. ábra A CI23-as izolátum tenyészte és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

4.10 *Fusarium* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

4.10.1 Citromról izolált *Fusarium* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

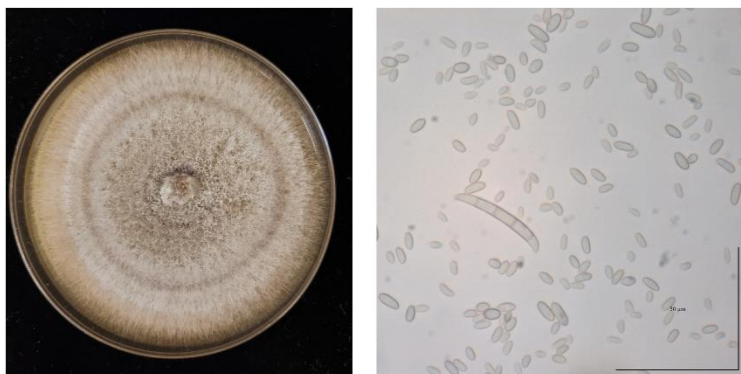
A CI10 izolátum tenyészte gyors növekedésű volt (14 nap alatt nőtte be a táptalaj felszínét), krémfehér színű légmicéliumot képzett. A kórokozó mikrokonídiumai átlagosan 7,5 x 2,1 µm, makrokonídiumai 40,5 x 3,2 µm nagyságúak voltak.

4.10.2 Lime-ről izolált *Fusarium* spp. tenyészbélyegei és morfológiai tulajdonságai

A CI02-es izolátum tenyészte gyors növekedésű volt (12 nap alatt nőtte be a táptalaj felszínét), krémfehér színű légmicéliumot képzett. A tenyészetben szintén képződtek a nemzetségre jellemző 2-6 sejtű, sarló alakú makrokonídiumok, illetve egysejtű mikrokonídiumok. A kórokozó mikrokonídiumai átlagosan 12,6 x 3,0 µm, makrokonídiumai 26,6 x 4,1 µm nagyságúak voltak.

A CI12-es izolátum tenyészte lassabb növekedésű volt (20 nap alatt nőtte be a táptalaj felszínét), krémfehér színű légmicéliumot képzett, a tenyészetben zónázottságot figyeltünk meg (**26. ábra**). A tenyészetben a nemzetségre jellemző 2-6 sejtű, sarló alakú makrokonídiumok,

illetve egysejtű mikrokonídiumok képződtek (26. ábra). A kórokozó mikrokonídiumai átlagosan $6,2 \times 2,7 \mu\text{m}$, makrokonídiumai $25,8 \times 3,6 \mu\text{m}$ nagyságúak voltak.



26. ábra A CI12-es izolátum tenyésztete és konídiumai (Fotó: Muhari; Szendrei 2022)

4.11 Patogenitási teszt

Penicillium fajok esetében az inokulálást követően 3 nappal már láthatóak voltak a kórokozó okozta tünetek, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum* fajoknál 7-14 nap elteltével tapasztaltunk elváltozást az inokulált gyümölcsökön (27. ábra). A patogenitási teszt során a Koch posztulátumok minden izolátum esetében teljesültek.



27. ábra A mesterséges fertőzés eredményei a kórokozók patogenitásának igazolására (Fotó: Muhari, Szendrei 2022)

4.12 A kórokozók azonosítása molekuláris módszerekkel

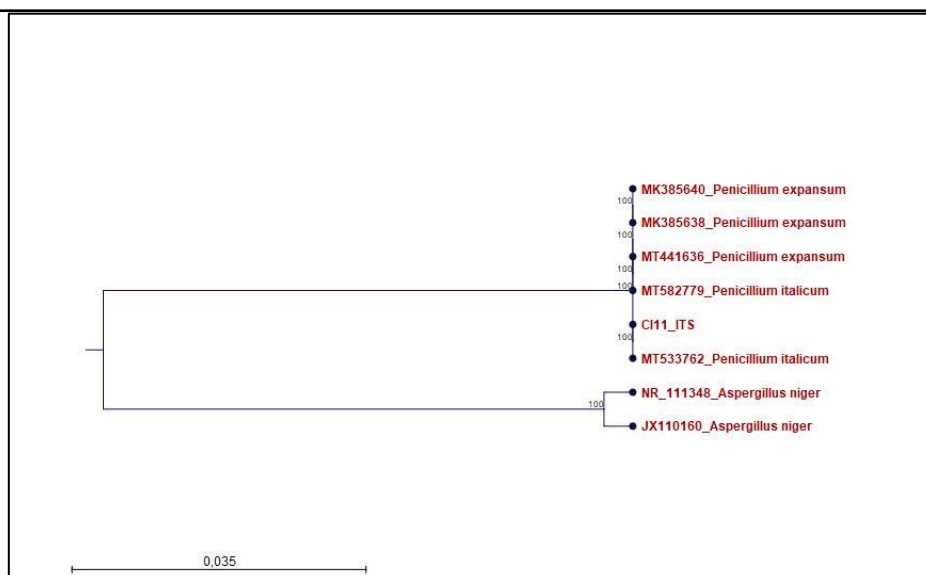
4.12.1 Azonosítás az ITS régió alapján

Molekuláris vizsgálatokhoz olyan tenyészeteket választottunk, melyekről már tenyészbélyeg alapján meghatároztuk a nemzetséget, így a CI11, CI12, CI22, CI23, CI24-es izolátumokat elemeztük. Az ITS régió alapján történő azonosítás során az ITS1 és ITS4 univerzális primerek kb. 600 bázispár hosszúságú szakaszt sokszoroztak meg a polimeráz láncreakcióban.

A nukleotid sorrend összehasonlítás eredményeként a CI11-es izolátum szekvenciája 98,9%-os hasonlóságot mutatott a *Penicillium italicum* és *Penicillium expansum* izolátumok szekvenciáival (28. és 29. ábra). Az *Aspergillus niger* izolátumok csoporton kívüliként másik ágon jól elkülönülnek a *Penicillium* izolátumoktól.

✓	Penicillium italicum strain DUCC5739 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene a...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	1122	MT582779.1
✓	Penicillium italicum isolate UFMGCB 17970 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA g...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	411	MT533762.1
✓	Penicillium expansum isolate 22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer...	Penicillium expa...	492	492	100%	2e-134	98.91%	587	MT441636.1
✓	Penicillium expansum isolate CPe5 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and ...	Penicillium expa...	492	492	100%	2e-134	98.91%	531	MK385640.1
✓	Penicillium expansum isolate CPe3 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and ...	Penicillium expa...	492	492	100%	2e-134	98.91%	532	MK385638.1
✓	Penicillium italicum strain AK37 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	563	MK736929.1
✓	Penicillium italicum strain AK36 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	564	MK736928.1
✓	Penicillium italicum strain AK35 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	569	MK736927.1
✓	Penicillium italicum strain AK33 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	563	MK736925.1
✓	Penicillium italicum strain AK32 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	568	MK736924.1
✓	Penicillium italicum strain AK31 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	565	MK736923.1
✓	Penicillium italicum strain AK30 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	562	MK736922.1
✓	Penicillium italicum strain AK29 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	567	MK736921.1
✓	Penicillium italicum strain AK28 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	565	MK736920.1
✓	Penicillium italicum strain AK24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Penicillium italicum	492	492	100%	2e-134	98.91%	580	MK736916.1

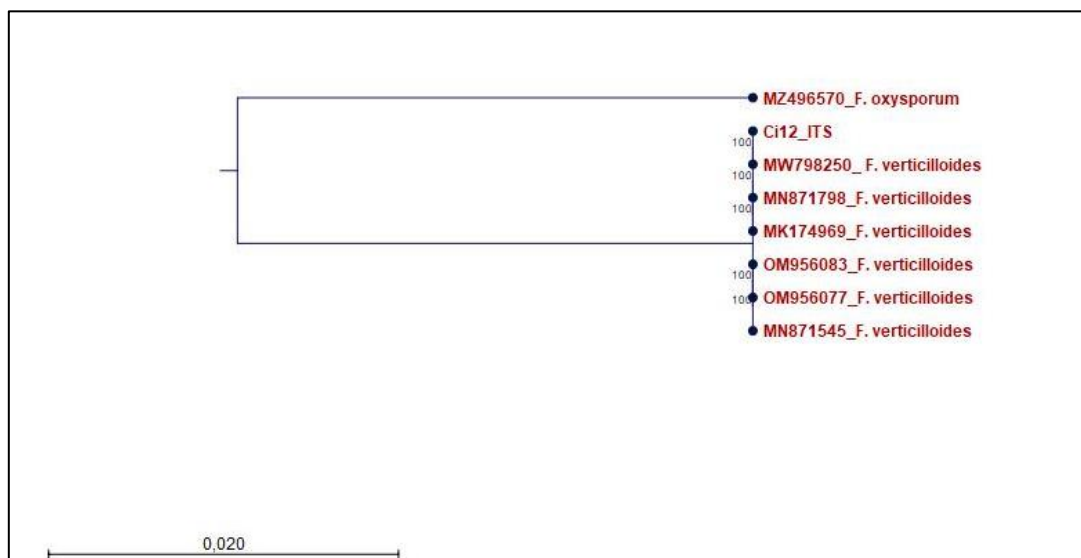
28. ábra Az NCBI adatbázis találatai (legnagyobb egyezés) a CI11-es izolátum azonosítása során



29. ábra A *Penicillium expansum* és *P. italicum* izolátumok dendrogramja az ITS régió szekvenciárészlete alapján

Magyarázat az **29. ábrához**: Az izolátumokat a dendrogramon az NCBI adatbázis hivatkozási számaival és a kórokozó nevekkal tüntettük fel. Csoporton kívüli tagként két *Aspergillus niger* izolátum szekvenciáját használtuk fel az elemzés során. A törzsfán a vízszintes vonalak, ill. azok hossza az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák nukleotid sorrendjének eltérései alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. A törzsfa alatti skála mértéke 1 bázis eltérést jelöl 100 bázisonként.

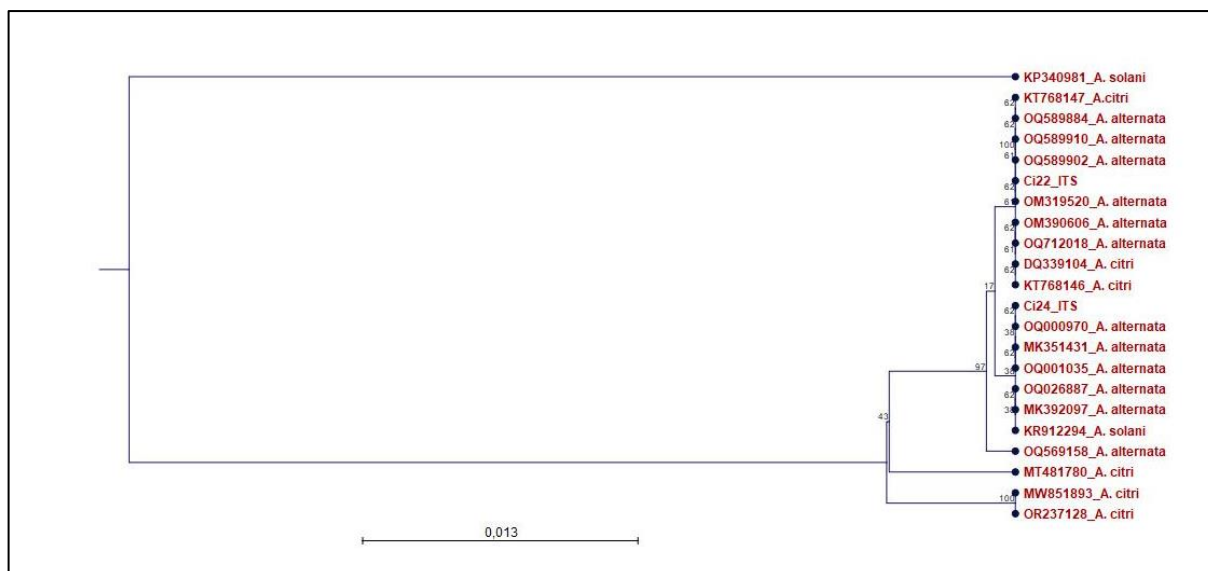
A CI12-es izolátum vizsgált szakasza 99%-os hasonlóságot mutat az adatbázisból származó *Fusarium verticilloides* izolátumokkal és külön ágon helyezkedik el a *F. oxysporum* izolátumtól (**30. ábra**).



30. ábra A *Fusarium verticilloides* izolátumok dendrogramja az ITS régió szekvenciárészlete alapján

Magyarázat a **30. ábrához**: Az izolátumokat a dendrogramon az NCBI adatbázis hivatkozási számaival és a kórokozó nevekkal tüntettük fel. Csoporton kívüli tagként egy *F. oxysporum* izolátum szekvenciát használtuk fel az elemzés során. A törzsfán a vízszintes vonalak, ill. azok hossza az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák nukleotid sorrendjének eltérései alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. A törzsfa alatti skála mértéke 1 bázis eltérést jelöl 100 bázisonként.

A CI22-es és CI24-es izolátumok a vizsgált szakaszon 100%-os azonosságot mutatnak az adatbázisban szereplő *Alternaria alternata* izolátumokkal és jól elkülönülnek az *A. solani* izolátumtól (**31. ábra**). A vizsgálatok során *Alternaria citri* izolátumokat is gyűjtöttünk az elemzéshez. A két kórokozó az ITS régió vizsgálata alapján nem különíthető el egyértelműen.



31. ábra Az *Alternaria citri* és *A. alternata* izolátumok dendrogramja az ITS régió szekvenciárészlete alapján

Magyarázat az **31. ábrához**: Az izolátumokat a dendrogramon az NCBI adatbázis hivatkozási számaival és a kórokozó nevekkkel tüntettük fel. Csoporton kívüli tagként egy *A. solani* izolátum szekvenciát használtuk fel az elemzés során. A törzsfán a vízszintes vonalak, ill. azok hossza az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák nukleotid sorrendjének eltérései alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. A törzsfa alatti skála mértéke 1 bázis eltérést jelöl 100 bázisonként.

A CI23-as izolátum ITS szekvenciárészlete alapján a *Colletotrichum acutatum* fajkomplex tagjaival mutat 97%-os hasonlóságot (**32. ábra**), azonban a *Colletotrichum* fajok fajkomplexen belüli megbízható azonosítása csupán az ITS régió vizsgálatával nem lehetséges.

✓	Colletotrichum abscissum isolate RB197 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Colletotrichum ab...	737	737	97%	0.0	92.56%	7928	MK541030.1
✓	Fungal endophyte isolate 6058 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inter...	fungal endophyte	737	737	97%	0.0	92.56%	634	KR016224.1
✓	Fungal endophyte isolate 3803 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inter...	fungal endophyte	737	737	97%	0.0	92.56%	654	KR015633.1
✓	Glomerella acutata 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), isolate IN2	Colletotrichum ac...	737	737	97%	0.0	92.56%	582	FN566876.1
✓	Glomerella acutata 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), isolate CS-1	Colletotrichum ac...	737	737	97%	0.0	92.56%	554	FN566875.1
✓	Colletotrichum sp. strain YNLC511 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Colletotrichum sp.	732	732	97%	0.0	92.37%	543	MT196320.1
✓	Colletotrichum sp. strain YNLC510 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Colletotrichum sp.	732	732	97%	0.0	92.37%	543	MT196319.1
✓	Colletotrichum scovillei LD242 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete seque...	Colletotrichum sc...	732	732	97%	0.0	92.38%	610	LC488852.1

32. ábra Az NCBI adatbázis találatai a CI23-as izolátum azonosítása során

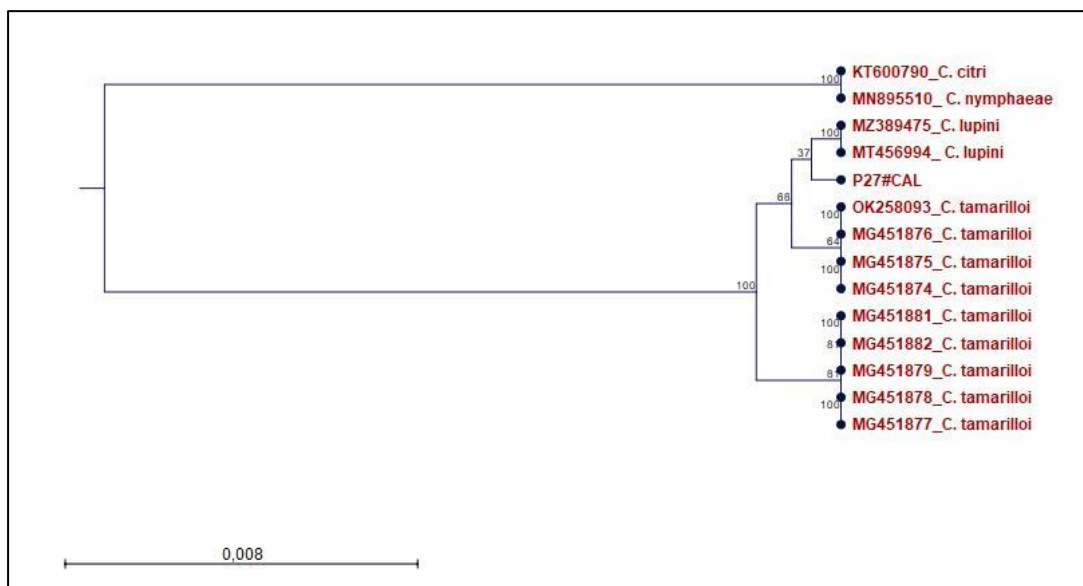
A CI23-as izolátum azonosítása a kalmodulin gén alapján

A CA_CAL_1 és CA_CAL_2 primerek kb. 800 bázispár hosszúságú szakaszt emeletek ki a PCR reakció során. Vizsgálva a CI23-as minta kalmodulin gén részletét és összevetve az adatbázisban szereplő szekvenciákkal 99-100%-os azonosságot mutatott a *Colletotrichum lupini* és *C. tamarilloi* izolátumokkal (33. ábra).

✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Pe-Im-12 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1179	1179	100%	0.0	99.84%	797	MG451876.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Pa-Th-11 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1179	1179	100%	0.0	99.84%	797	MG451875.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Pi-Pi-10 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1179	1179	100%	0.0	99.84%	797	MG451874.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate CH09 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1179	1179	100%	0.0	99.84%	798	OK258093.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Az-Pi-24 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1173	1173	100%	0.0	99.69%	797	MG451882.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Uy-Pi-23 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1173	1173	100%	0.0	99.69%	797	MG451881.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Mi-Pi-22 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1173	1173	100%	0.0	99.69%	797	MG451880.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Quinc-Pi-21 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1173	1173	100%	0.0	99.69%	797	MG451879.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Cu-Pi-20 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1173	1173	100%	0.0	99.69%	797	MG451878.1
✓	Colletotrichum tamarilloi isolate Ch-Pi-19 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum tamarilloi	1173	1173	100%	0.0	99.69%	797	MG451877.1
✓	Colletotrichum lupini strain IMI 504893 chromosome 5, complete sequence	Colletotrichum lupini	1173	1173	100%	0.0	99.69%	6820665	CP019477.1
✓	Colletotrichum lupini isolate Lup5 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum lupini	1173	1173	100%	0.0	99.69%	829	MZ389475.1
✓	Colletotrichum lupini isolate Lup4 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum lupini	1173	1173	100%	0.0	99.69%	829	MZ389474.1
✓	Colletotrichum lupini isolate Lup3 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum lupini	1173	1173	100%	0.0	99.69%	829	MZ389473.1
✓	Colletotrichum lupini isolate Lup2 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum lupini	1173	1173	100%	0.0	99.69%	829	MZ389472.1
✓	Colletotrichum lupini isolate Lup1 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum lupini	1173	1173	100%	0.0	99.69%	829	MZ389471.1
✓	Colletotrichum lupini strain PJ64 calmodulin (CAL) gene, partial cds	Colletotrichum lupini	1173	1173	100%	0.0	99.69%	794	MT456994.1

33. ábra Az NCBI adatbázis találatai a CI23-as izolátum kalmodulin gén azonosítása során

Elkészítve a régió filogenetikai törzsfáját megállapítottuk, hogy a CI23-as izolátum a *C. lupini* szekvenciákkal mutat hasonlóságot (**34. ábra**). A *C. tamarilloi* izolátumok külön ágon helyezkednek el.



34. ábra A CI23-as izolátum dendrogramja az ITS régió szekvenciárészlete alapján.

Magyarázat a **34. ábrához**: Az izolátumokat a dendrogramon az NCBI adatbázis hivatkozási számaival és a kórokozó nevekkkel tüntettük fel. A törzsfán *C. tamarilloi*, *C. nymphaeae*, és *C. citri* izolátumok szekvenciáit használtuk fel az elemzés során. A törzsfán a vízszintes vonalak, ill. azok hossza az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák nukleotid sorrendjének eltérései alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. A törzsfa alatti skála mértéke 1 bázis eltérést jelöl 100 bázisonként.

5 Következtetések

A vizsgálat során *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Fusarium* és *Alternaria* nemzetséghez tartozó gombafajokat izoláltunk importált citrusféléről. A kórokozók kártétele a citrusfélén a külföldi szakirodalmakból ismert (Pitt, 2014; Louw és Korsten, 2015; Vitale *et al.*, 2021).

Penicillium fajok

A vizsgált citrusféléről 11 esetben *Penicillium* fajt azonosítottunk. Kétféle tünettípust figyeltünk meg, melyeket két különböző kórokozó idézhetett elő. Az egyik esetben a kórokozó CI05, CI06, CI07-es izolátumainak micéliumszövedéke nagy felületen vonta be a citrusfélék felszínét, a micélium körül a gyümölcsök héja enyhén rothadt, barnult és matt színűvé vált. Az infekció helyén, kis felületen olajzölden sporuláló micéliumot figyeltünk meg. Ez megegyezik a szakirodalom tünetleírásaival a *P. digitatum* kapcsán (Snowdon, 1990; Costa *et al.*, 2019). A másik esetben a CI01, CI03, CI08, CI11, CI16, CI20 izolátumok kéken sporuláló micéliuma vonta be a gyümölcs felületét. A sporuláló micélium körül a gyümölcsök héja enyhén vízenyős, rothadt volt. A tünetek megfelelnek a szakirodalomban *P. italicum* kórokozóról írtakkal (Palou, 2014; Louw és Korsten, 2015). A kórokozók CI14-es és CI15-ös izolátumai esetében nem tapasztaltuk a fentebb leírt egyik tünettípust sem. Ezen esetekben a gyümölcsök epidermisze matt volt, rajtuk beszáradt foltokat tapasztaltunk és a folt körül enyhén elszíntelenedett a gyümölcsök héja. Ennek oka lehet, hogy a szállítás és tárolás során jelen lévő környezeti feltételek nem kedveztek a kórokozó számára, esetleg a kórokozó virulenciája gyengébb volt.

A CI05, CI06, CI07-es izolátumok tenyészbélyegei megegyeztek a *P. digitatum* fajról leírtakkal (Palou, 2014; Tahiri *et al.*, 2022). A tenyészetek krémfehér színűek, szabálytalan alakúak, ép szegélyűek és bársonyos textúrájúak voltak, kb. 20 nap alatt nőttek be a táptalajt. A konídiumok egysejtűek, enyhén ovális alakúak voltak, méretük átlagosan 3,2-3,8 x 5-7 µm között változott, ez nagyrészt megegyezik Pitt és Hocking (2009) leírásával, az eltérés oka lehet az, hogy tenyészetéből származó konídiumok méretét vizsgáltuk, nem pedig a gyümölcs felületéről. A tünetek és morfológiai bélyegek alapján a kórokozót *Penicillium digitatum*-ként azonosítottuk.

A CI01, CI03, CI08, CI11-es izolátumok tenyésze szabályos kör alakú, zónázott volt, kékes-zöld színű sporulációt figyeltünk meg benne. A konídiumok egysejtűek, gömb alakúak voltak, méretük átlagosan 2,2-2,8 x 2,7-3,5 µm között változott, ez szintén kisebb az átlagos *P. italicum*-ról leírt konídiumméretnél (Pitt és Hocking, 2009), mely oka szintén az lehet, hogy a kórokozó tenyészetéből vizsgáltuk a konídiumok méretét. Az egyéb karakterek megegyeznek a szakirodalomban *P. italicum*-ról leírtakkal (Pitt és Hocking, 2009; Tahiri *et al.*, 2022), így az

említett izolátumokat a tünetek és a morfológiai bélyegek alapján *P. italicum*-ként azonosítottuk (Tahiri *et al.*, 2022). A CI11-es izolátumot a klasszikus mikológiai határozóbélyegeken túl és az ITS genomi régió egy szakaszának alapján is *P. italicum*-ként határoztuk meg.

Alternaria fajok

A vizsgálat során három esetben azonosítottunk *Alternaria* kórokozóval fertőződött citrusfélét. A kórokozó CI04-es és CI22-es izolátuma jellegzetes, kocsány felől induló rothadást okozott. A gyümölcsöket felvágva szintén tapasztaltuk a belső szövetek barnulását és rothadását. Ezek a tünetek megegyeznek az *A. alternata* s. l. okozta tünetekkel a szakirodalom alapján (Katoh *et al.*, 2006; Woudenberg *et al.*, 2015). Mindkét izolátum esetében (CI04, CI22) a tenyészet szabályos kör alakú volt és barna színű légmicélimot képzett, illetve a tenyészet növekvő széle fehér színű volt. A kórokozók konídiumai a nemzetségre jellemzően hosszúak, bunkó alakúak, kereszt és hosszirányban is tagoltak, barna színűek voltak, méretük átlagosan 16,9-17,2 x 8,9-9,3 µm között változott. A tünetek és morfológiai bélyegek alapján mindkét esetben *A. alternata sensu lato* -ként valószínűsítettük a kórokozót, melyet az ITS régió molekuláris vizsgálata is igazolt. A citrusféléken előforduló *Alternaria* fajok kapcsán, még több tisztázandó kérdés maradt. Az *A. alternata* és az *A. citri* az Index Fungorum nemzetközi adatbázis alapján két külön faj, azonban egy 2015-ben megjelent taxonómiai cikkben az *A. citri*-t az *A. alternata* faj szinonimájaként említik és javasolják az *A. alternata* f. sp. *citri* elnevezés használatát (Woudenberg *et al.*, 2015).

A kórokozó CI24-es izolátumának a tünete különbözött a fentebb leírtaktól, ez esetben a gyümölcs héján nagy kiterjedésű foltot tapasztaltunk, mely körül a gyümölcs héja enyhén puhult volt, a gyümölcs belső szövetében, a folt alatt rothadást tapasztaltunk. A kórokozó CI24-es izolátumának tenyészte szintén az *Alternaria* nemzetségre jellemző volt (Wang *et al.*, 2010; Moosa *et al.*, 2021). Ezen tünetek és morfológiai bélyegek alapján az *Alternaria* nemzetség tagjaként határoztuk meg a kórokozó CI24-es izolátumát.

Colletotrichum fajok

A tüneteket mutató citrusféléről három esetben azonosítottunk *Colletotrichum* fajt. A tünetek jellegzetes kör alakú, besüppedő foltokként jelentek meg a gyümölcs héján (CI09, CI23) (Martínez-Blay *et al.*, 2020) vagy a kocsány körül (CI19). A foltok alatt a gyümölcs szöve rothadt, melyet Guargaccia és munkatársai (2017) is említene. A kórokozó CI09 és CI19-es izolátumának tenyészte jellegzetes krémfehér színű, szabályos kör alakban fejlődött, benne mindkét esetben narancssárga konídiummasszát képződött. A konídiumok a *Colletotrichum* nemzetségre jellemzően (Damm *et al.*, 2012), egysejtűek, hialinok voltak,

méretük átlagosan 15-16 x 3,5-5,5 µm között változott. A morfológiai és tenyészbélyegek szerint, Damm és munkatársai (2012) alapján a *C. acutatum* fajkomplex tagjaként azonosítottuk a kórokozó CI09 és CI19-es izolátumát. A fajkomplexeen belüli pontos azonosítására még további vizsgálatokat tartunk szükségesnek. A kórokozó CI23-as izolátumának tenyésztete szabályos kör alakú, krémfehér színű volt, benne zónázottságot figyeltünk meg, konídiummasszát nem képzett a gomba. A kórokozó konídiumai a *Colletotrichum* nemzetségre jellemző (Damm *et al.*, 2012) egysejtűek, hialinok voltak, méretük átlagosan 13,2 x 3,4 µm között változott. A molekuláris vizsgálatok során a kalmodulin gén egy részét vizsgálva megállapítottuk, hogy a CI23-as izolátum a *C. lupini* szekvenciákkal mutat hasonlóságot. A morfológiai bélyegek és két régió molekuláris adatai alapján, Lotter és Berger (2005), illetve Alkemade és munkatársai (2021) munkáit figyelembe véve, *C. lupini*-ként azonosítottuk a kórokozót.

Fusarium fajok

Három esetben a *Fusarium* nemzetség tagjait azonosítottuk citrusféléről, ahogy Pitt (2014) is a jelentős kórokozókként említi őket ezeken a gazdanövényeken. A tünetek mindhárom (CI02, CI10, CI12 izolátum) esetében hasonlóak voltak: a gyümölcs héján elszórtan, 1-2 cm-es barna foltok jelentek meg, melyek alatt a belső szövetek enyhén rothadtak. Hasonló - *Fusarium* faj által okozott - tüneteket Xiao és munkatársai (2023) is leírtak citrusfélék kapcsán. A kórokozók tenyészbélyegei a szakirodalom alapján szintén a *Fusarium* nemzetségre utaltak (Kunta *et al.*, 2015). A kórokozó CI12-es izolátumát a molekuláris vizsgálatok során az ITS genomi régió egy szakasza alapján *F. verticillioides*-ként határoztuk meg. A *F. verticillioides* a *F. fujikuroi* fajkomplex tagjaként ismert, mely a fajkomplexeen belül egyedülálló módon kukoricán kívül számos más gazdanövényvel is rendelkezik, mint az ananász vagy a borsó (Jabłońska *et al.*, 2020).

A vizsgálatunk során izolált *C. acutatum* fajkomplex tagjai, vagy az *A. aletrnata*, illetve a *F. verticillioides* polifág kórokozókként ismertek (Damm *et al.*, 2012; Pitt, 2014; Woudenberg *et al.*, 2015), így akár veszélyt jelenthetnek a hazánkban is termesztett növényekre, pl. új rasszok megjelenésével is. Az áltatunk izolált kórokozók közül, a *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* fajok toxintermelése is igazolt a citrusfélék kapcsán (Pitt, 2014; Costa *et al.*, 2019; Scott, 2001), így fontosnak tartjuk felhívni a figyelmet, bizonyos tünetek esetén semmiképpen ne használjuk fel a beteg citromokat.

6 Összefoglalás

A citrusfélék közé tartozó gyümölcsök a világ minden táján közkedveltek, pozitív táplálkozástani hatásuk széles körben bizonyított. A citrusfélék termesztési körzete ugyan hőmérsékleti korlátba ütközik, de nemzetközi kereskedelemben így is a top 10-ben szerepelnek volumenben. Számos kórokozójuk ismert, melyek csökkentik a gyümölcsök pulton tarthatóságának idejét.

Vizsgálatunkban felvételeztük, mely kórokozók érkeznek hazánkba az importált citrusfélékkel együtt. A vizsgált citrusfélék mindig mutattak tüneteket, kisebb-nagyobb, beszáradt vagy akár rothadó foltokat a gyümölcs héján. A kórokozókat minden esetben a gyümölcs belső szövetéből izoláltuk PDA táptalajon. A Koch-posztulátumot követve bebizonyítottuk a kórokozók megbetegítőképességét, valamint egyes kórokozók esetében nem csak klasszikus mikológiai meghatározást, hanem molekuláris azonosítást is végeztünk.

A szakirodalomból már ismert gombafajokat, a *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Fusarium* és *Alternaria* nemzetség tagjait azonosítottuk a vizsgálat során. Legtöbb esetben *Penicillium italicum* és *P. digitatum* kórokozót határoztunk meg a fertőzött citrusfélékről. A *Colletotrichum* nemzetség közül a *C. acutatum* fajkomplexbbe tartozó fajokat izoláltunk a hazánkba importált citrusfélékről. Azonosítottunk *Alternaria* nemzetségbe tartozó patogéneket is, melyek ismert mikotoxintermelők. Továbbá *Fusarium* fajokat is, melyek közül a molekulárisan is meghatározott *F. verticillioides* hazánkban a kukorica csőpenészesedését okozza, de a szakirodalomból ismert trópusi növények, köztük a citrusfélék kórokozójaként.

Vizsgálatunk rávilágít arra, hogy az import gyümölcsökkel számos idegenhonos kórokozó kerülhet hazánkba. Egyes kórokozók széles gazdanövénykörrel rendelkeznek, vagy mikotoxinokat is termelhetnek. Vannak olyan növényi kórokozók, amik több rasszal rendelkeznek. Új rasszok importálásával a hazai populáció diverzitása növekedhet, mely könnyebb adaptációhoz is vezethet.

7 Irodalomjegyzék

1. Agostini, J.P., Timmer, L. W., Mitchell, D. J. 1992. Morphological and Pathological Characteristics of Strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series R-02564.
2. Aiello, D., Carrieri, R., Guarnaccia, V., Vitale, A., Lahoz, E., Polizzi, G. 2014. Characterization and Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. Karstii* Causing Preharvest Disease on Citrus sinensis in Italy. Journal of Phytopathology, 163: 168–177.
3. Ajay, K.G. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenicity and Management in India. J Plant Physiol Pathol 2:2.
4. Akimitsu, K., Peever, T.L., Timmer, L.W., 2003. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. Molecular Plant Pathology, 4: 435-446.
5. Alkemade, J.A., Messmer, M.M., Voegelé, R.T. Finckh, M.R., Hohmann, P. 2021. Genetic diversity of *Colletotrichum lupini* and its virulence on white and Andean lupin. Sci Rep 11, 13547.
6. Anam M., Ayaz F., Sajid A.K., Tanvir A., Hafiz M. U. A., Saba S., Muhammad S., Asher M., Sohail A., 2021. First Report of Postharvest *Fusarium* Rot of Mandarin (*Citrus reticulata* ‘Kinnow’) Caused by *Fusarium equiseti* in Pakistan Plant Disease, 105:12, 4170.
7. Bhatta, U.K. 2022. Alternative Management Approaches of Citrus Diseases Caused by *Penicillium digitatum* (Green Mold) and *Penicillium italicum* (Blue Mold). Front. Plant Sci.12:833328.
8. Brown, G.E., Eckert J.W. 1988. Green Mold. Compendium of Citrus disease.St. Paul, USA: American Phytopathological Society.
9. Cheng, Y., Yunlong L., Haohao C., Zhengguo Li. 2020. "Citrus Postharvest Green Mold: Recent Advances in Fungal Pathogenicity and Fruit Resistance" Microorganisms 8, no. 3: 449. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030449>
10. Costa, J.H., Bazioli, J.M., Moraes Pontes, J.G., Fill, T.P. 2019. *Penicillium digitatum* infection mechanism in citrus: what do we know so far?, Fungal Biol., 123 pp. 584-593.
11. Coulombe, J.R.A., 1993. Biological action of mycotoxins. J. Dairy Sci. 76, 880–891.

12. Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Slippers, B.; Wingfield, M.J. 2016. Global Food and Fibre Security Threatened by Current Inefficiencies in Fungal Identification. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371.
13. Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous, P.W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37–113.
14. Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414-430.
15. Droby, S.; Eick, A.; Macarasin, D.; Cohen, L.; Rafael, G.; Stange, R.; McColum, G.; Dudai, N.; Nasser, A., Shapira, R., Wisniewski, M.; 2008. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 386–396.
16. Drusch, S., Ragab, W., 2003. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *J Food Prot.*, 66(8):1514-27. doi: 10.4315/0362-028x-66.8.1514.
17. Edel-Hermann, V., Lecomte, C. 2019. Status of *Fusarium oxysporum* Formae Speciales and Races. *Phytopathology*.109(4):512-530.
18. El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., Zacarías, L. 2011. *Citrus* spp.: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. *Food Science, Technology and Nutrition, Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, Pages 437-516.
19. EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/COLLAC/hosts> (2023.09.01.)
20. Fogliata, G. M., Martínez, C. V., Acosta, M. E., Muñoz, M. L., Ploper L. D., 2013. First Report of *Fusarium* Rot Caused by *Fusarium oxysporum* on Lemon in Tucumán, Argentina. *Plant Disease* 97:7, 989-989.
21. Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 49, 1–174.
22. Garganese F., Schena L., Siciliano I., Prigigallo M.I., Spadaro D., De Grassi A., Ippolito A, Sanzani SM. 2016. Characterization of Citrus-Associated *Alternaria* Species in Mediterranean Areas. *PLoS ONE* 11(9): e0163255.
23. Guarnaccia, V., Groenewald, J. Z., Polizzi, G., Crous, P. W., 2017, High Species Diversity in *Colletotrichum* Associated with Citrus Diseases in Europe. *Persoonia* 32-50. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.02>

24. Guerline A. F., João G. de M. P., Alana K. P., Taícia P. F. 2022. Exploring the Citrus Sour Rot pathogen: biochemical aspects, virulence factors, and strategies for disease management. *Fungal Biology Reviews*, Volume 41, Pages 70-83, <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.03.003>.
25. Gusella, G., Fiorenza, A., Aiello, D., Polizzi, G. 2021. Unusual Styler- End Breakdown and Sour Rot on Key Lime (*Citrus aurantiifolia*) in Pre-Harvest Condition in Italy. *Plants*, 10, 989. <https://doi.org/10.3390/plants10050989>
26. Hasan, M.F., Islam, M.A., Sikdar, B. 2023. First report on molecular identification of *Fusarium* species causing fruit rot of mandarin (*Citrus reticulata*) in Bangladesh. *F1000Research*, 9:1212. (<https://doi.org/10.12688/f1000research.26464.2>)
27. Hiremath, S.V., Hiremath, P.C., Hegde, R.K. 1993. Studies on cultural and growth characters of *Colletotrichum gloeosporioides* A casual agent of shisham blight. *Karnataka J. Agric. Sci.*, 6(1): (30-32)
28. Huang, F., Chen, G.Q., Hou, X., Fu, Y.S., Cai, L., Hyde, K., Li, H. 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity*. 61. [10.1007/s13225-013-0232-y](https://doi.org/10.1007/s13225-013-0232-y).
29. Jabłońska, E., Piątek, K., Wit, M., Mirzwa-Mróz, E., Wakuliński. W. 2020. Molecular diversity of the *Fusarium fujikuroi* species complex from maize. *Eur J Plant Pathol* 158, 859–877. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02121-7>
30. Jae W. H., Seong C. L., Dong H. K., Sang W. K., Kwang S. K. 2000. *Fusarium* Fruit Rot of Citrus in Jeju Island. *Mycobiology*, 28:3, 158-162.
31. Jaouad, M., Moinina, A., Ezrari, S., Lahlali, R. 2020. The key pests and diseases of citrus trees with emphasis on root rot dicssessé-An overview. 1. 149-160.
32. Jonas, H.C., Jaqueline M.B., João G. M., Taícia P. 2019. *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biology*, Volume 123, Issue 8, Pages 584-593.
33. Julca, I., Samir D., Noa S., Marina M., Toni G., 2015. Contrasting Genomic Diversity in Two Closely Related Postharvest Pathogens: *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*, *Genome Biology and Evolution*, 8. kötet, 1. évf., 2-2. 227.
34. Kanashiro, A.M., Akiyama, D.Y., Kupper, K.C., Fill, T.P. 2020. *Penicillium italicum*: An Underexplored Postharvest Pathogen. *Microbiol.* 11:606852.
35. Katoh, H., Isshiki, A., Masunaka, A., Yamamoto, H., Akimitsu, K. 2006. A Virulence-Reducing Mutation in the Postharvest Citrus Pathogen *Alternaria citri*. *Phytopathology*. Sep;96(9):934-40. doi: 10.1094/PHYTO-96-0934. PMID: 18944048.

36. Katoh, H., Ohtani, K., Yamamoto, H., Akimitsu K., 2007. Overexpression of a Gene Encoding a Catabolite Repression Element in *Alternaria citri* Causes Severe Symptoms of Black Rot in Citrus Fruit Phytopathology 97:5, 557-563
37. Kaur, R.; Rewal, H.S.; Sethi, A. 2007. Pre-harvest stem-end rot in citrus cultivars due to *Colletotrichum gloeosporioides*. Eur. J. Hortic. Sci.72, 20–25.
38. Khanchouch, K., Pane, A., Chriki, A. 2017. Major and Emerging Fungal Diseases of Citrus in the Mediterranean Region. Citrus Pathology. Pages 1514-1527.
39. Khouja H.R, Yaseen T., D'onghia A.M., Cherif M., Ippolito A. 2008. Etiological and epidemiological aspects of dry root rot in nurseries and orchards in Tunisia. Proc. Int. Soc. Citriculture 406p.
40. Konstantinos, P., Matthaios, M., Joaquín, H., Hasperué, V.Z. 2019. Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold), Trends in Food Science & Technology, Volume 86, Pages 479-491.
41. Kumar, V., Anal, A., Rai, S., Nath, V. 2018. Leaf, panicle, and fruit blight of litchi (*Litchi chinensis*) caused by *Alternaria alternata* in Bihar state, India. Canadian Journal of Plant Pathology. 40. 84-89.
42. Kunta, M., Salas, B., Gonzales, M., Da G.J. 2015. First report of citrus dry root rot caused by *Fusarium solani* on sour orange rootstock in Texas. Journal of Citrus Pathology, 27974.
43. Lima, W.G., Spósito, M.B., Amorim, L., Fabrício, G., Péricles, F. 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. Eur J Plant Pathol 131, 157–165.
44. Lin, Y.H.; Su, C.C.; Chao, C.P.; Chen, C.Y.; Chang, C.J.; Huang, J.W.; Chang, P.F.L. 2013. A molecular diagnosis method using real-time PCR for quantification and detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. Eur. J. Plant Pathol. 135, 395–405.
45. Lombardo, M., Federica, S, P., Antonino A., Vittoria. C., Gabriella C. 2023. "Assessing Copper-Alternative Products for the Control of Pre- and Postharvest Citrus Anthracnose". Plants 12, no. 4: 904.
46. López-Pérez, M.; Ballester, A. R.; González-Candelas, L., 2011. Disección de factores de patogenicidad del hongo patógeno poscosecha de cítricos '*Penicillium digitatum*. del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)

47. Lotter, H.C., Berger D.K. 2005. Anthracnose of lupins in South Africa is caused by *Colletotrichum lupini* var. *setosum*. Australian Plant Pathology. 34. 385-392.
48. Louw, J.P., a Korsten, L. 2015. Pathogenicity and Host Susceptibility of *Penicillium* spp. on Citrus. Plant Dis. 99, 21–30.
49. Marcet, H.M., Ballester, A.R., Fuente, B., Harries, E., Marcos J.F., González-Candelas L., Gabaldón T. 2012. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. BMC Genomics 13, 646.
50. Martínez-Blay, V., Pérez-Gago, M. B., de la Fuente, B., Carbó, R., Palou, L., 2020. "Edible Coatings Formulated with Antifungal GRAS Salts to Control Citrus Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and Preserve. Postharvest Fruit Quality" Coatings 10, no. 8: 730.
51. Mingshuang, W., Ruoxin, R., Hongye, L. 2021. The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Penicillium digitatum*. Genomics, Volume 113, Issue 2, Pages 439-446.
52. Moosa, A., Farzand, A., Sahi, S.T. Sajid, K., Muhammad A.M., Tanvir, A., Maqsood, A. M., Muhammad, S. 2021. First report of *Alternaria alternata* causing post-harvest brown spot of Citrus reticulata Blanco cv. ‘Kinnow’ in Pakistan. J Plant Pathol 103, 1357–1358.
53. MycoBank1(2023.06.18)
<https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/46622>
54. MycoBank2(2023.06.18)
<https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/18798>
55. NCBI1: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/tree/?taxon=5455>
(2023.08.30)
56. NCBI2: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/tree/?taxon=5598>
(2023.08.30)
57. NCBI3: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/tree/?taxon=5506>
(2023.08.30)
58. Nirenberg, H.I., Feiler, U., Hagedorn, G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini*. Mycologia, 94: 307–320.
59. Ohtani, K., Fukumoto, T., Nishimura, S., Miyamoto, Y., Gomi, K., & Akimitsu, K. 2009. *Alternaria* Pathosystems for Study of Citrus Diseases.
60. Ortuno, A., Díaz, L., Alvarez, N., Porras, I., García-Lidón, A., Del Río, J.A., 2011. Comparative study of flavonoid and scoparone accumulation in different Citrus species

and their susceptibility to *Penicillium digitatum*. Food Chemistry, Volume 125, Issue 1, Pages 232-239.

61. Paes, S.A., Rosado, A.W.C., Reis, A. Pereira, O.L. 2022. Molecular phylogeny and morphological characterization of the aetiological agent of sour rot on fruits and vegetables in Brazil. Plant Pathology, 71, 386–399. <https://doi.org/10.1111/ppa.13473>
62. Palou, L. 2014. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold), Chapter 2 - Editor(s): Silvio Bautista-Baños, Postharvest Decay, Academic Press, Pages 45-102.
63. Peng, L.J., Yang, Y.L., Hyde, K.D. Bahkali. A., Liu, Z. 2012. *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. Cryptogamie Mycologie 33: 267–283
64. Perez, M.F., Ibarreche, J.P., Isas, A.S., Sepulveda, M., Ramallo, J., Dib, J.R. 2017. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. Biol. Control 115, 135–140.
65. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 2009. Fungi and Food Spoilage. 3rd Edition, Springer Dordrecht Heidelberg London New York Cambridge, 519 p. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
66. Pitt, J.I. 2014. Mycotoxins: Fumonisin, Editor(s): Yasmine Motarjemi, Encyclopedia of Food Safety, Academic Press, Pages 299-303.
67. Riolo, M., Aloï, F., Pane, A., Cara, M., Cacciola, S.O. 2021. Twig and Shoot Dieback of Citrus, a New Disease Caused by *Colletotrichum* Species. Cells 2021, 10, 449.
68. Sandoval, D.M., Guarnaccia, V., Polizzi, G., Crous, P.W. 2018. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, Volume 40, June 2018, pp. 1-25(25)
69. Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L.Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D.J., Madden, T.L., Maglott, D.R., Miller, V., Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Sequeira, E., Sherry, S.T., Shumway, M., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T.A., Wagner, L., Yaschenko, E., Ye, J. 2009. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 37:D5–D15.
70. Scott, P.M. 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. J. Am. Oil Chem. Soc., 6, 1809–17.

71. Smith, S.N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathol. Bull.* 16, 97–120.
72. Snowdon, A.L., 1990. *Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. I. General Introduction and Fruits* Wolfe Scientific, London.
73. Strano, M.C.; Altieri, G.; Allegra, M.; Di Renzo, G.C.; Paterna, G.; Matera, A.; Genovese, F. 2022. Postharvest Technologies of Fresh Citrus Fruit: Advances and Recent Developments for the Loss Reduction during Handling and Storage. *Horticulturae*. 8(7):612.
74. Summerell, B.A.; Salleh, B.; Leslie, J.F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.*, 87, 117–128.
75. Tahiri, N.E.H., Saghrouchni, H., Hamamouch, N., Khomsi, M.E., Alzahrani, A., Salamatullah, A.M., Badiaa, L., Lrhorfi, L.A. 2022. Treatment with Glyphosate Induces Tolerance of Citrus Pathogens to Glyphosate and Fungicides but Not to 1,8-Cineole. *Molecules*, 27, 8300.
76. Talgø, V., Aamot, H.U., Strømeng, G.M., Klemsdal, S.S. Stensvand, A. 2007 *Glomerella acutata* on highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Norway. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0509-01-RS
77. Thomma, B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4: 225-236.
78. Timmer, L.W., Peever, T., Solel, Z., Akimitsu, K. 2003. *Alternaria* diseases of citrus - Novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*. 42. 99-112.
79. Tóth A. 2017. Meggyantraknózis: a kórokozó jellemzése, genetikai diverzitása és a növényvédelmi technológia kidolgozása Gödöllő.
80. Vitale, A., Aiello, D., Azzaro, A., Guarnaccia, V., Polizzi, G. 2021. An Eleven-Year Survey on Field Disease Susceptibility of Citrus Accessions to *Colletotrichum* and *Alternaria* Species. *Agriculture*, 11, 536.
81. Wang, W., Dilani D. S., Azin, M., Jacqueline, E., Peter, K.A., Pedro W.C., Paul, W. J. 2021. "*Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Citrus in Australia" *Journal of Fungi* 7, no. 1: 47.
82. Wang, X. F., Li, Z. A., Tang, K. Z., Zhou, C. Y., Yi, L. 2010. First Report of *Alternaria* Brown Spot of Citrus Caused by *Alternaria alternata* in Yunnan Province, China *Plant Disease*. 94:3, 375-375

83. Whiteside, J. O., Garnsey, S. M., Timmer, L. W. 1988. *Compendium of Citrus Disease*. 2nd Edn. Saint Paul: APS Press.
84. Wikee, S.; Udayanga, D.; Crous, P.W.; Chukeatirote, E.; McKenzie, E.H.; Bahkali, A.H.; Dai, D.Q.; Hyde, K.D. 2011. *Phyllosticta*—An overview of current status of species recognition. *Fungal Divers.* 51, 43–61.
85. Woudenberg, J. H., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., de Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P., Crous, P. W. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in mycology*, 82, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>
86. Wu, G., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F.R., Carbonell-Caballero, J.; Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M.L., Dopazo, J., Gmitter, F.G., Rokhsar, D.S., Talon, M. 2018. Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*. 554, 311–316.
87. Xiao, L. H., Luo, Z. Y., Fu, Y. Q., Zeng, J. K., Xiang, M. L., Chen, J. Y., Chen M. 2023. First Report of Postharvest Fruit Rot on Citrus reticulata Caused by *Fusarium concentricum* in China. *Plant Disease* 107:3, 962.
88. Yilmaz, N.; Sandoval-Denis, M.; Lombard, L.; Visagie, C.M.; Wingfield, B.D.; Crous, P.W. 2021. Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, Volume 46, pp. 129-162(34) <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.05>
89. Youssef, K., Hussien, A. 2020. Electrolysed water and salt solutions can reduce green and blue molds while maintain the quality properties of 'Valencia' late oranges. *Postharvest Biol. Technol.* 159:111025.
90. Zakaria, L. 2023. *Fusarium* Species Associated with Diseases of Major Tropical Fruit Crops. *Horticulturae*, 9, 322.