

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR

Növénykórtani Tanszék

Tudományos diákköri dolgozat

***A Plasmopara obducens (Schröt) első előfordulása Magyarországon Impatiens
walleriana növényeken***

Csejk Gyöngyvér

Növényorvos MSc II. évfolyam

Konzulensek:

Dr. Petróczy Marietta egyetemi adjunktus

Dr. Palkovics László tanszékvezető, egyetemi tanár



Budapest, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. A KÓROKOZÓK RENDSZERTANI BESOROLÁSA	7
2.1.1. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> RENDSZERTANI BESOROLÁSA.....	7
2.1.2. A <i>PLASMOPARA CONSTANTINESCUI</i> RENDSZERTANI BESOROLÁSA.....	7
2.2. A KÓROKOZÓ TUDOMÁNYOS ELNEVEZÉSE	8
2.2.1. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> TUDOMÁNYOS ELNEVEZÉSE.....	8
2.2.2. A <i>PLASMOPARA CONSTANTINESCUI</i> TUDOMÁNYOS ELNEVEZÉSE	8
2.3. A KÓROKOZÓ FÖLDRAJZI ELTERJEDÉSE.....	8
2.3.1. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> FÖLDRAJZI ELTERJEDÉSE	8
2.3.2. A <i>PLASMOPARA CONSTANTINESCUI</i> FÖLDRAJZI ELTERJEDÉSE	9
2.4. A KÓROKOZÓK GAZDANÖVÉNYKÖRE.....	9
2.4.1. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> GAZDANÖVÉNYKÖRE.....	9
2.4.2. A <i>PLASMOPARA CONSTANTINESCUI</i> GAZDANÖVÉNYKÖRE.....	10
2.5. A KÓROKOZÓK MORFOLÓGIAI JELLEMZŐI	10
2.5.1. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> MORFOLÓGIAI JELLEMZŐI.....	10
2.5.2. A <i>PLASMOPARA CONSTANTINESCUI</i> MORFOLÓGIAI JELLEMZŐI	11
2.6. A BETEGSÉG TÜNETEI.....	12
2.6.1. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> OKOZTA TÜNETEK	12
2.6.2. A <i>PLASMOPARA CONSTANTINESCUI</i> OKOZTA TÜNETEK	13
2.7. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> GAZDASÁGI JELENTŐSÉGE.....	13
2.8. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> ÁTTELELÉSE	14
2.9. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> TERJEDÉSE ÉS A FERTŐZÉST ELŐSEGÍTŐ TÉNYEZŐK	15
2.10. A <i>PLASMOPARA OBDUCENS</i> ELLENI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI.....	15
3. A VIZSGÁLAT HELYE, ANYAGA ÉS MÓDSZERE	16
3.1. A VIZSGÁLAT HELYE ÉS IDEJE	16
3.2. A VIZSGÁLAT ANYAGA.....	16
3.2.1. NÖVÉNYEK.....	16
3.2.2. PRIMEREK.....	16
3.2.3. PLAZMID.....	17

3.2.4. BAKTÉRIUM TÖRZS A KLÓNOZÁSHOZ	17
3.2.5. TÁPTALAJOK.....	17
3.2.6. ENZIMEK, VEGYSZEREK, KITEK.....	18
3.2.7. A MORFOLÓGIAI JELLEMZÉS SORÁN HASZNÁLT MŰSZEREK ÉS ESZKÖZÖK	18
3.3. A VIZSGÁLAT MÓDSZERE.....	18
3.3.1. MORFOLÓGIAI AZONOSÍTÁS ÉS JELLEMZÉS	18
3.3.2. PATOGENITÁSI TESZT.....	19
3.3.3. FERTŐZÉSI MÓD VIZSGÁLATA	19
3.3.4. ÖSSZNUKLEINSAV KIVONÁS.....	20
3.3.5. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ VIZSGÁLAT.....	20
3.3.6. A PCR TERMÉK VISSZAIZOLÁLÁSA ÉS TISZTÍTÁSA	21
3.3.7. LIGÁLÁS	21
3.3.8. TRANSZFORMÁLÁS <i>E. COLI</i> DH 5- α TÖRZSÉBE.....	21
3.3.9. MINIPREPARÁTUM KÉSZÍTÉSE	22
3.3.10. AZ INZERT ELLENŐRZÉSE.....	22
3.3.11. PLAZMID TISZTÍTÁS A SZEKVENÁLÁSHOZ	23
3.3.12. A NUKLEOTID SORREND MEGHATÁROZÁSA ÉS ANALÍZISE.....	23
4. EREDMÉNYEK.....	25
4.1. A BETEGSÉG LEFOLYÁSA, TÜNETEK	25
4.2. A KÓROKOZÓ MORFOLÓGIAI JELLEMZŐI	26
4.3. PATOGENITÁSI TESZT	28
4.4. A FERTŐZÉSI MÓD VIZSGÁLATA	28
4.5. A KÓROKOZÓ MOLEKULÁRIS AZONOSÍTÁSA	28
4.5.1. PCR VIZSGÁLAT.....	28
4.5.2. MINIPREPARÁTUM.....	29
4.5.3. SZEKVENCIA MEGHATÁROZÁSA	29
4.5.4. ROKONSÁGI KAPCSOLATOK FELTÁRÁSA	30
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK	34
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	36
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	38
8. IRODALOMJEGYZÉK	39
9. MELLÉKLET.....	42

ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra	Virágzó <i>Impatiens walleriana</i>	5
2. ábra	A <i>Plasmopara obducens</i> sporangiumtartója.....	11
3. ábra	A <i>Plasmopara constantinescui</i> sporangiumtartója	12
4. ábra	<i>Plasmopara obducens</i> okozta tünetek a levél színén és fonákán	14
5. ábra	A riboszomális RNS-eket kódoló szakasz részlete a PCR reakciókban használt primerek feltüntetésével.....	16
6. ábra	A pGEM-T Easy Vektor.....	17
7. ábra	Függő vízcsepp módszer a fertőzési mód vizsgálatához.....	19
8. ábra	A kórokozó sporangiumtartó gyepe <i>Impatiens walleriana</i> leveleinek fonáki részén	25
9. ábra	A betegség tünetei <i>Impatiens walleriana</i> növényen.....	26
10. ábra	A kórokozó sporangiumtartója 600x-os nagyításon.....	27
11. ábra	A kórokozó sporangiumai 600x-os nagyításon.....	27
12. ábra	Az NL1 és NL4 primerek által kiemelt 600 és 800 bp hosszúságú PCR termékek.....	28
13. ábra	A rekombináns klónok ellenőrzése <i>EcoRI</i> hasítással 1%-os agaróz gélen.....	29
14. ábra	A <i>Plasmopara obducens</i> izolátumainak filogenetika törzsfája a 28S régió szekvenciája alapján	30
15. ábra	A BoxShade programmal készített nukleotid szekvencia összehasonlítás részlete az ITS régióban.....	31

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

bp	bázispár
DNS	dezoxiribonukleinsav
CTAB	cetil-trimetilammónium-bromid
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	kilobázis
Miniprep.	minipreparátum
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeráz láncreakció
PDB	Protein Data Bank
RNase	ribonukleáz
rDNS	riboszomális dezoxiribonukleinsav
rRNS	riboszomális ribonukleinsav
u	unit
USDA	United States Department of Agriculture

1. Bevezetés

Az *Impatiens walleriana* és az *Impatiens* 'Új-Guinea' hibridek Magyarországon is igen kedvelt és széles körben elterjedt dísznövények. A kertészek jelentős mennyiségben rendelnek szaporítóanyagot Németországból, Hollandiából, majd gondos nevelés után adják tovább a vásárlóknak. Gyakran találkozhatunk ezzel a kedves egynyári növényvel parkokban, köztereken és kertekben. Mutató, sokféle színben pompázó virágai már tavasztól egészen az első fagyokig díszlenek (**1. ábra**). Félárnyékban is hoz virágokat, de a napfényes helyeket jobban kedveli. Népszerűségére utal, hogy Magyarországon több néven is forgalomban van: Pistike, vízifukszia, vagy nebáncsvirág elnevezésekkel találkozhatunk a leggyakrabban.



1. ábra Virágzó *Impatiens walleriana* (Fotó: Palkovics L., 2011)

Az *Impatiens* nemzetség igen gazdag fajokban, mintegy 450 fajt sorolhatunk ide, melyek főleg Afrika és India trópusi vidékein és Észak-Amerikában honosak. Csak néhány képviselőjük (*Impatiens glandulifera* Royle, *I. noli-tangere* L., *I. parviflora* DC.) terjedt el Eurázsia mérsékelt éghajlatú vidékein. A *Balsaminaceae* (Nebáncsvirágfélék) családjába, és az *Ericales* (Hangavirágúak) rendjébe tartoznak.

Termesztéstechnológiáját tekintve a kertészek a külföldről vásárolt palántákat növényházakban, fóliasátrakban nevelik tovább, mely magában hordozza új kórokozók behurcolásának esélyét. 2011 májusában találkoztunk először peronoszpórával fertőzött *Impatiens walleriana* növényekkel. Egy kecskeméti növényházban észlelték elsőként a tüneteket: a növények sárgultak, hervadtak, a levelek fonáki részén fehér gombaképletek képződtek. Több fertőzött egyed a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékére küldtek vizsgálat, illetve azonosítás céljából.

A betegség jelentőségére hívja fel a figyelmünket, hogy már több hazai termesztő is jelezte a betegség előfordulását. A fertőzött állományok csaknem 100%-a elpusztult. A Hortus Hungaricus Dísznövénykiállításon végzett kutatómunkám során több termesztő is jelentős károkról panaszkodott. A kecskeméti termesztő kára 2000 euróra tehető, országosan pedig becsléseink

szerint akár fél millió eurós kár is keletkezhetett. Igen agresszív, könnyen terjedő kórokozóval állunk szemben és jelen ismereteink alapján a védekezési lehetőségek igen korlátozottak, ezért fontosnak tartjuk, hogy a kórokozót és biológiáját minél jobban megismerhessük.

Vizsgálataink elején az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- a tünetek és a kórfolyamat leírását;
- a kórokozó azonosítását és jellemzését morfológiai bélyegek alapján;
- a kórokozó molekuláris azonosítását és jellemzését.

2. Irodalmi áttekintés

Az irodalmi adatok szerint két kórokozó felelős az *Impatiens*-fajok peronoszpórájáért: a *Plasmopara obducens* Schröt. és a *Plasmopara constantinescui* Voglmayr. és Thines. Áttekintve a vonatkozó cikkeket, a *Plasmopara obducens* fajnak sokkal nagyobb a jelentősége a betegség kialakításában és lényegesen több publikáció is jelent meg a kórokozóval kapcsolatban.

A *Plasmopara constantinescui* kapcsán elsősorban **Constantinescu (1991)** adataira támaszkodhatunk. Az azóta megjelent tudományos publikációkban is csak a másik peronoszpóra fajjal találkozhatunk, a *Plasmopara constantinescui*-t csak megemlítik (idézve a leírót) de új adatokkal nem szolgálnak. Több vonatkozásban (pl. jelentősége, biológiája) a *Plasmopara constantinescui* kórokozóval kapcsolatban hivatkozást nem találtunk.

2.1. A kórokozók rendszertani besorolása

2.1.1. A *Plasmopara obducens* rendszertani besorolása

- Törzs: *Oomycota*
- Osztály: *Oomycetes*
- Rend: *Peronosporales*
- Család: *Peronosporaceae*
- Nemzetség: *Plasmopara*
- Faj: *Plasmopara obducens* Schröt. (**Index Fungorum**)

2.1.2. A *Plasmopara constantinescui* rendszertani besorolása

- Törzs: *Oomycota*
- Osztály: *Oomycetes*
- Rend: *Peronosporales*
- Család: *Peronosporaceae*
- Nemzetség: *Plasmopara*
- Faj: *Plasmopara constantinescui* Voglmayr és Thines (**Voglmayr és Thines, 2007**)

2.2. A kórokozók tudományos elnevezése

2.2.1. A *Plasmopara obducens* tudományos elnevezése

A kórokozót elsőként J. Schröter írta le 1877-ben *Peronospora obducens* néven, majd 1886-ban nevezte át *Plasmopara obducens*-nek. G. W. Wilson 1907-ben megjelent cikkében *Rhysotheca obducens* néven említette a kórokozót. 1891-ben Ellis és Everhart a Philadelphiai Természettudományi Akadémia kiadványában *Peronospora impatientis*-ként írják le. Berlese 1898-ban a *Plasmopara impatientis* nevet adja a gombának (**Palm, 2004**).

A kórokozó jelenlegi legitim neve az eredeti leírója Schröter által adott *Plasmopara obducens* elnevezés (**Index Fungorum**).

2.2.2. A *Plasmopara constantinescui* tudományos elnevezése

A kórokozót **Constantinescu (1991)** írta le elsőként *Bremiella sphaerospherma* néven. Jellemezte és új fajként különítette el Észak-Amerika északkeleti részéről gyűjtött minták alapján. **Voglmayr és Thines (2007)** molekuláris vizsgálatok alapján átsorolták a kórokozót a *Plasmopara* nemzetségbe és a *Plasmopara constantinescui* nevet adták neki. Az USDA (United States Department of Agriculture) adatbázisban szinonim elnevezésként a *Bremiella sphaerospherma* is szerepel (**Farr és Rossmann, 2011**).

2.3. A kórokozók földrajzi elterjedése

2.3.1. A *Plasmopara obducens* földrajzi elterjedése

Az európai kontinensről jelezték elsőként a kórokozó megjelenését. 2003-ban Angliában *Impatiens walleriana* 'Firefly' fajtán (**Lane és mtsai., 2005**), majd Németországban azonosították a *Plasmopara obducens* kórokozót (**Anonymus, 2008a**). 2008-ban már Olaszországban (**Anonymus, 2008b**), Szlovéniában (**Anonymus, 2008c**) és Norvégiában (**Toppe és mtsai., 2010**) is elterjedt. **Bulajić és mtsai. (2011)** számoltak be a gomba szerbiai megjelenéséről. Korábban jegyezték már a kórokozót vadon előforduló *Impatiens noli-tangere* fajokon Bulgáriában, Csehországban, Dániában, Finnországban, Németországban, Romániában és Oroszországban. Litvániában is megerősítették a kórokozó jelenlétét (**Anonymus, 2005**). A fent említett országokon kívül a *Plasmopara obducens* Ausztriában és Lengyelországban is jelen van az USDA adatbázisa szerint (**Farr és Rossmann, 2011**). Magyarországon korábban a kórokozót *Impatiens parviflora* DC. (kisvirágú nebáncsvirág) fajon mutatták ki (**Ubrizsy, 1965**).

Észak- és Dél-Amerikában, Ázsiában és Ausztráliában is megtalálható. Az USA-ban a kórokozó előfordulását már 1942-ben jelentették (Anonymus, 2005), azóta szórványosan fordult elő, majd 2004-ben okozott először jelentős károkat Kalifornia és Michigan államban az *Impatiens walleriana* 'Fiesta' sorozaton (Wegulo és mtsai., 2004). Kanadából is jelezték előfordulását (Anonymus, 2005). Ausztráliában 2006-ban észlelték először a kórokozó fertőzését szintén *Impatiens walleriana* 'Fiesta' fajtákon (Cunnington és mtsai., 2006). Ázsiában eddig Pakisztánból, Kínából, Indiából és a Koreai Köztársaság területéről jelentették (Farr és Rossmann, 2011). A kórokozó megtalálható Közép–Amerikában Guatemalában, valamint Dél-Amerikában Costa Ricában is (Anonymus, 2005).

2.3.2. A *Plasmopara constantinescui* földrajzi elterjedése

A kórokozót leírták az Amerikai Egyesült Államokból Dél-Karolinából és Virginiából, Kanadából, valamint Oroszország keleti részéről (Constantinescu, 1991; Voglmayr és Thines, 2007). További európai előfordulásával kapcsolatban irodalmi adatot nem találtunk.

2.4. A kórokozók gazdanövényköre

2.4.1. A *Plasmopara obducens* gazdanövényköre

Farr és Rossman (2011) szerint az alábbi fajokat fertőzi a kórokozó: *Impatiens balsamina* L., *Impatiens biflora* Walt, *Impatiens capensis* Meerb., *Impatiens dicentra* Franchet ex Hook., *Impatiens noli-tangere* L., *Impatiens omeiana* Hook, *Impatiens pallida* Nutt., *Impatiens parviflora* DC., *Impatiens roylei* Walp, *Impatiens textori* Miq. és *Impatiens walleriana* Hook.f.

A *Plasmopara obducens* az *Impatiens* nemzetségen kívül más fajokat nem fertőz (Castalanelli és Hoffmann, 2008). A nemesítő cégek szinte évente új *Impatiens walleriana* fajtákat, főleg fajtasorozatokat dobnak piacra (Tillyné és mtsai., 2008), melyeknek fogékonysága eltérő lehet. A kórokozó első megjelenéséről szóló közleményekben olvashatjuk, hogy az egyes országokban mely fajtákat fertőzte a *Plasmopara obducens*. Az *Impatiens walleriana* 'Fiesta' sorozaton okozott károkat az Egyesült Államokban, Ausztráliában és Olaszországban. Az Egyesült Államokban a 'Sparkler Hot Pink' fajtán közel 100%-os veszteséget állapítottak meg. Angliában az *Impatiens walleriana* 'Firefly' sorozat több fajtáján, Norvégiában az *Impatiens walleriana* 'Xtreme Red' hibriden, valamint 'Silhouette' sorozat fajtáin azonosították a kórokozót (Wegulo és mtsai., 2004; Cunnington és mtsai., 2006; Anonymus, 2008a; Lane és mtsai., 2005; Toppe és mtsai., 2010).

Az irodalmakban eltérő adatokat találunk azzal kapcsolatban, hogy a gomba fertőzi-e a vegetatívan szaporított *Impatiens* 'Új- Guinea' hibrideket. Hollandiában **Sansford (2007)** említi, hogy kimutatták a patogént 'Új- Guinea' fajtákon is, ezzel szemben 2006-ban Ausztráliában **Cunnington és mtsai. (2006)** nem tapasztaltak fertőzésre utaló jeleket a hibrideken.

2.4.2. A *Plasmopara constantinescui* gazdanövényköre

Constantinescu (1991) valamint **Farr és Rossmann (2011)** szerint a kórokozó a *Balsaminaceae* családba tartozó növényeket fertőzi.

2.5. A kórokozók morfológiai jellemzői

A két peronoszpóra faj morfológiai bélyegek, vagyis a sporangiumtartóik közti különbségek alapján egyértelműen megkülönböztethető (**Constantinescu, 1991**).

2.5.1. A *Plasmopara obducens* morfológiai jellemzői

A *Plasmopara* nemzetség sporangiumtartója faágszerűen elágazó, korlátozott növekedésű (**Glits, 2000**).

A *Plasmopara obducens* sporangiumtartója hialin, a sporangiumtartó nyél egyenes, 4 - 7 monopodiális elágazás látható rajta (**2. ábra**), sztrómából emelkedik ki. Az oldalágak nem keskenyednek el, nem szélesednek ki (**Constantinescu, 1991**). Az elágazások derékszöget zárnak be a tengellyel (**Wegulo és mtsai., 2004**). A sporangiumtartók három csúcsi elhelyezkedésű szterigmában végződnek. A szterigmák hosszúsága **Wegulo és mtsai. (2004)** szerint 8 - 14 µm. A sporangiumtartók a levélfonák egész felületét beborítják, a sporangiumtartó gypnek nincs határozott széle (**Constantinescu, 1991**).

A *Plasmopara obducens* sporangiumai hialinok, tojás alakúak vagy oválisak (**Constantinescu, 1991**). A sporangiumok disztális vége ellaposodik és egy pórus figyelhető meg ezen a részen (**Wegulo és mtsai. 2004**). A szerzők szerint a sporangiumok átlagos mérete 19,4 – (22,2) – 25,0 µm x 13,9 – (16,7) – 19,4 µm.

A *Plasmopara* nemzetség sporangiumai indirekt úton fejlődnek tovább, vagyis a sporangiumokból mozgó sporangiospórák szabadulnak ki (**Glits, 2000**).



2. ábra A *Plasmopara obducens* sporangiumtartója

(Forrás: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/factsheets/index.cfm?thisapp=Plasmoparaobducens>)

2.5.2. A *Plasmopara constantinescui* morfológiai jellemzői

A *Plasmopara constantinescui* sporangiumtartója szintelen. A nyél egyenes, általában rövidebb a másik fajénál. A tartó általában dihotónikusan 4 - 6-szor faágszerűen elágazik. Az első elágazást követően ritkán előfordul trihotónikus elágazás is. Az oldalágak hajlékonyak, jellegzetesen görbülnek, végül elvékonyodik (**3. ábra**). A sporangiumtartó 2 - 3 szterigmában végződik, melyeknek átlagos hosszúsága 5 - 15 μm (**Constantinescu, 1991**).

A *Plasmopara constantinescui* sporangiumai hialinok, gömbölyűek, méretük (14 -) 15 - 16 (- 19) μm (Constantinescu, 1991). A sporangiumok direkt módon, csíratömlőt fejlesztve fejlődnek tovább (Mukerji és mtsai., 1999).



3. ábra A *Plasmopara constantinescui* sporangiumtartója

(Forrás: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/factsheets/index.cfm?thisapp=Plasmoparaobducens>)

2.6. A betegség tünetei

Constantinescu (1991) megfigyelései alapján az *Impatiens*-fajok peronoszpóráját okozó *Plasmopara obducens* és *Plasmopara constantinescui* az okozott tünetek alapján is elkülöníthető egymástól.

2.6.1. A *Plasmopara obducens* okozta tünetek

Csakúgy, mint más peronoszpórák okozta betegségeknél, a *Plasmopara obducens* fertőzése során is először a levelek sárgulását, hervadását tapasztaljuk (Constantinescu, 1991). Cunningham és mtsai. (2006) szerint az *Impatiens* növények levelének színén először elszórtan pontszerű sárgulás jelenik meg. A levelek fonákán dús, fehér sporangiumtartó gyepek képződnek, a teljes fonákot beborítva (4. ábra).

A sporangiumtartó gyp a levelek alsó részén képződik, előfordulhat, hogy nem vesszük észre a szaporítóképleteket és a levelek fakulását, hervadását a nem megfelelő tápanyagellátásnak tulajdonítjuk, vagy atka kártétellel tévesztjük össze (**Castalanelli és Hoffmann, 2008**).

A fertőzött levelek egyre világosabbá válnak, majd elhervadnak. A fertőzött növények gyengén, vontatottan fejlődnek, gyakran alig vagy egyáltalán nem hoznak virágot. A levelek, amelyeken már megjelent a gomba szaporítóképlete, lehullanak. A kórokozó igen agresszív, gyorsan terjed. A betegség az egész növény pusztulásához vezethet, főleg a magról kelt fiatal növények esetében (**Constantinescu, 1991**).



4. ábra *Plasmopara obducens* okozta tünetek a levél színén és fonákán

(Forrás: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/factsheets/rptImages.cfm?currentNum=2>)

2.6.2. A *Plasmopara constantinescui* okozta tünetek

A gomba okozta tünetek foltokban jelennek meg a leveleken (**Palm, 2004**). *Plasmopara constantinescui* okozta fertőzés esetén a levelek színén lokális, sárguló foltokat láthatunk, amelynek megfelelően a fonákon is foltszerűen, szegéllyel határoltan jelenik meg a sporangiumtartó gyp (**Constantinescu, 1991**).

2.7. A *Plasmopara obducens* gazdasági jelentősége

A kórokozó igen agresszív és gyorsan terjed, ezért igen rövid idő alatt jelentős károkat okozott az egész világon (**Anonymus, 2005**). Angliában az *Impatiens*-fajok kiemelkedő jelentőségűek a dísnövényiparban, becsült értékük 40,000,000 £ évente (**Sansford, 2007**), ezért komoly gazdasági károkhoz vezetett *Plasmopara obducens* felbukkanása és gyors elterjedése. **Lane és mtsai. (2005)** szerint az *Impatiens walleriana* állományok a fertőzést követően hamar elhalnak,

párás környezetben az egyedek pusztulása még gyorsabban bekövetkezik. Ilyenkor az állományban akár 80%-os veszteséget is okozhat. Ausztráliában a 8 - 11 hetes magoncok 90%-át fertőzte meg a kórokozó (Cunnington és mtsai., 2006).

Az európai dísnövény-kereskedelem jelentős hányadát képezik az *Impatiens* dugványok. A fertőzött szaporítóanyag forgalmazásának köszönhetően a kórokozó könnyen és gyorsan el tudott terjedni Európa-szerte (Anonymus, 2005).

2.8. A *Plasmopara obducens* áttelése

Sansford (2007) szerint a kórokozó szabadföldi körülmények között áttelelhet az elpusztult növényi maradványokban, a mag felületén vagy a mag belsejében. Az *Impatiens*-fajokat leggyakrabban magról (ritkábban dugványozással) szaporítják, így a fertőzött magokból, fertőzött növények fejlődhetnek. A szerző azt is említi, hogy ha kifejlődnek a vastagfalú oospórák, a gomba jó eséllyel képes átvészelni a telet és tavasszal fertőzni. Castalanelli és Hoffmann (2008) fertőzési forrásként szintén a magot, a talajt és a növényi maradványokat említi.

Nem tisztázott a kórokozó maggal való terjedése, vagyis hogy a kórokozó közvetlenül terjed-e a magról a magoncra. Egy kísérletben az Egyesült Államokból importált magokat sporangiumokat tartalmazó vizes szuszpenzióval mosták át, de a kórokozó nem volt kimutatható a magokon, valamint a 21 nap múlva belőlük fejlődött növények is egészségesek maradtak (Sansford, 2007).

Egy indiai tanulmány megerősíti a gomba maggal való terjedését. Sohi és Tyagi (1974) szerint a maghéj szövettani elemzése során kiderült, hogy a kórokozó oospórákkal és a micéliummal áttelel a magokban. A fertőzött magokból fertőzött növények fejlődtek. Srivastava és Singh (1988) munkájuk során azt tapasztalták, hogy a fertőzött növényekről gyűjtött magokat steril talajon csíráztatva, a fejlődő növények mindegyike mutatta a betegség tüneteit. A fent említett két kísérlet során *Impatiens balsamina* növények magjait vizsgálták. A tanulmányokban azonban sajnos nem térnek ki a csíráztatási közeg és körülmények részletezésére.

Nem tudjuk, hogy pontosan hogyan történik a növények magból való fertőződése. Elképzelhető, hogy a gomba szisztemikusan fertőzi az embrió, vagy más részt a magon belül, például a maghéjat, de mag külső szennyezettsége is vezethet a kórokozó átviteléhez (Sansford, 2007).

2.9. A *Plasmopara obducens* terjedése és fertőzést elősegítő tényezők

A kórokozó sporangiumai vízzel és széllel terjednek. A *Plasmopara obducens* fertőzését elősegíti a magas páratartalom. A sűrű térállás és a nem megfelelő szellőztetés következtében kialakuló párás mikroklíma kedvez a peronoszpóra terjedésének. Ha a levelek között nincs megfelelő légmozgás, előfordulhat, hogy a leveleken több mint 6 órán át folyamatosan vékony vízréteg áll. Ilyenkor a sporangium szétesik mozgó sporangiospórákra, amelyek fertőzik a növényt. Az esti öntözések tovább fokozzák a kórokozó megjelenésének esélyét, mert az állomány így hosszabb ideig marad vízzel borított (Castalanelli és Hoffmann, 2008).

2.10. A *Plasmopara obducens* elleni védekezés lehetőségei

A védekezés alapja a megelőzés. Rendkívül fontos a higiénias előírások betartása. A lehullatott levelek és egyéb növényi maradványok összegyűjtése, a rendszeres szellőztetés, valamint a megfelelő páratartalom betartása. Kerülni kell az esti öntözéseket, illetve fontos, hogy ne legyen túl sűrű a térállás. Ha a cserepek egymástól megfelelő távolságra helyezkednek el, szellőztetésekor a levegő szabadon mozoghat a növények között. Így nem alakul ki a kórokozó számára kedvező párás mikroklíma. Az állományt folyamatosan ellenőrizni kell, hogy már az első tünetek megjelenésekor eltávolíthassuk a beteg növényeket, amelyeket meg kell semmisíteni (Castalanelli és Hoffmann, 2008). Ha a kórokozó megjelent, már a higiéniai előírások betartásával és növényvédő szeres kezeléssel sem tudjuk a fertőzés továbbterjedését megakadályozni. Egyes adatok szerint a vegyszeres kezelések késleltethetik, vagy egy időre elnyomhatják a tüneteket (Anonymus, 2005). A mankoceb hatóanyagú fungicidekkel a kórokozó terjedése megakadályozható, azonban a gombát nem pusztítja el (Castalanelli és Hoffmann, 2008).

3. A vizsgálat, helye, anyaga és módszere

3.1. A vizsgálat helye és ideje

A fertőzött növényeket Kecskeméten, egy dísnövények termesztésével foglalkozó kertészet üvegházában gyűjtöttük 2011 májusában. A kórokozó azonosítását a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékének laboratóriumaiban végeztük. A rekombináns plazmidot szekvencia meghatározásra a szegedi BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetbe küldtük.

3.2. A vizsgálat anyaga

3.2.1. Növények

A betegség megjelenését a következő *Impatiens walleriana* fajtákon és hibrideken vizsgáltuk: 'Impreza F1 Red', 'Accent', 'Rose Picottee', 'Vitara Rose', valamint 'Campos White'.

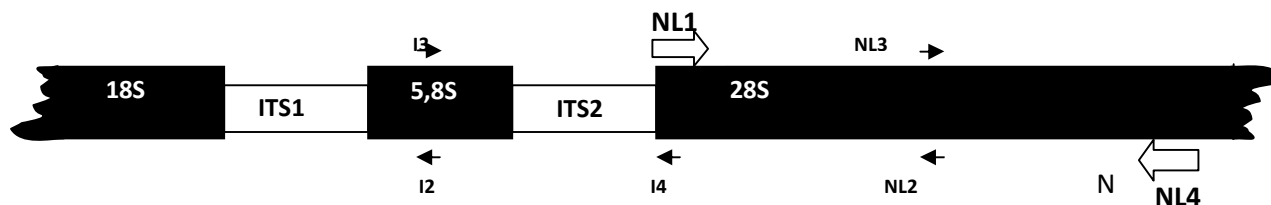
A patogenitási teszthez tüneteket nem mutató *Impatiens walleriana* növényeket használtunk.

3.2.2. Primerek

A molekuláris azonosítás során univerzális primereket használtunk PCR (Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció) vizsgálathoz, amelyek a kórokozó ITS (Internal Transcribed Spacer) régiójában található, 28S rRNS (riboszomális ribonukleinsav) gén egy részét sokszorozzák meg (5. ábra).

NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') szenz primer

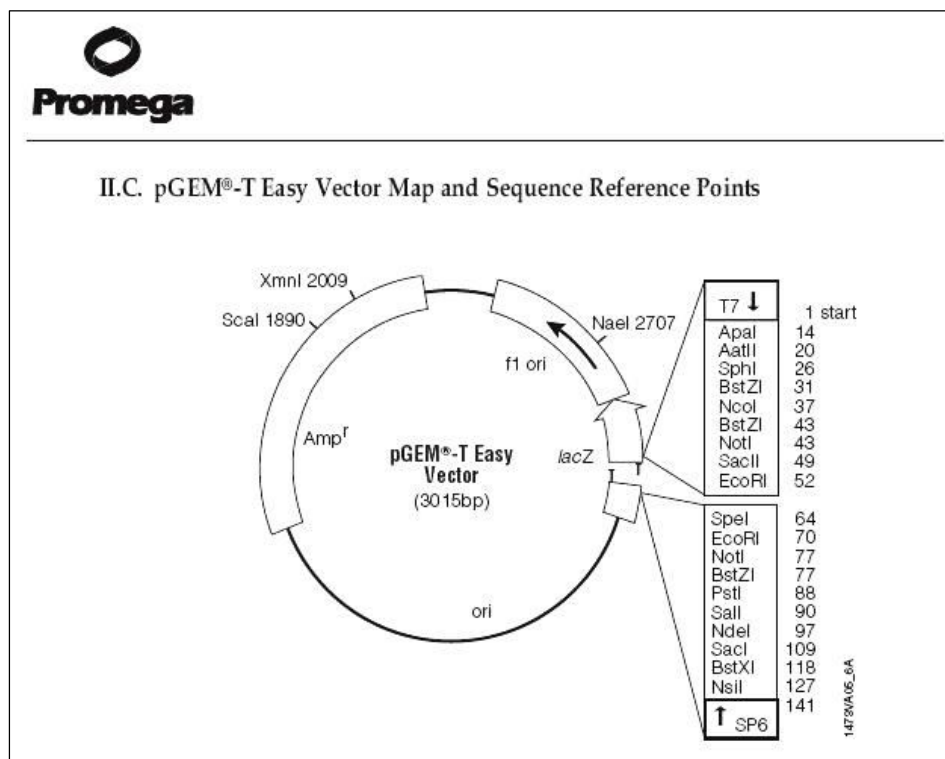
NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') antiszenz primer (Maier és mtsai., 2003).



5. ábra A riboszomális RNS-eket kódoló szakasz részlete a PCR reakciókban használt primerek feltüntetésével (A nyilak a primerek orientációját mutatják.)

3.2.3. Plazmid

A tisztított PCR-terméket a Promega 3015 bázispár hosszúságú pGEM-T Easy plazmidjába ligáltuk (6. ábra), amelyet kifejezetten PRC-termékek klónozására fejlesztettek ki.



6. ábra A pGEM-T Easy Vektor plazmidtérképe

(Forrás: <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>)

3.2.4. Baktérium törzs a klónozáshoz

A PCR-termék klónozásához az *Escherichia coli* baktérium DH 5- α törzsét használtuk.

3.2.5. Táptalajok

A transzformálás során steril 2TY (4 g tripton, 2,5 g yeast extract, 1,25 g NaCl, 250 ml végtérfogatban) és steril ampicillines LB táptalajt (2,5 g tripton, 1,25 g yeast extract, 2,5 g NaCl 250 ml végtérfogatban + 500 μ l ampicillin), a Minipreparátum készítéséhez steril ampicillines LB szilárd és folyékony táptalajt használtunk.

3.2.6. Enzimek, vegyszerek, Kitek

A felhasznált enzimeket a Fermentas cégtől vásároltuk. A polimeráz láncreakcióhoz Taq DNS polimeráz enzimet (rekombináns) (5 u/μl) és annak pufferét: 10x-es Taq puffer +KCl – MgCl₂, (pH: 8,8 25 °C-on) használtuk.

A ligáláshoz T4 DNS ligáz enzimet (5 u/μl) és annak pufferét: 10x-es T4 DNS ligáz puffert alkalmaztuk. A plazmidot tartalmazó baktérium kolóniák kék-fehér szín szelekciójához IPTG-t és X-Gal-t (Fermentas) használtunk. Az inzertet a plazmidból *EcoRI* (10 u/μl) restriktációs endonukleázzal vágtuk ki. Az enzim puffere: 10x-es *EcoRI* puffer pH: 7,5 37 °C-on.

A PCR-termék tisztítását High Pure PCR Product Purification Kittel (Roche) végeztük. A szekvenáláshoz BIO RAD, Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel tisztítottuk a rekombináns plazmidot.

3.2.7. A morfológiai jellemzés során használt műszerek és eszközök

A beteg növényeket Zeiss–SM XX. sztereomikroszkóppal, a képződő sporangiumtartókat és sporangiumokat Nikon Eclipse 50i mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A mikroszkópos felvételeket QImaging MicroPublisher 5.0 RTV kamerával készítettük. A mikroszkópos méréseket QCapture Pro program segítségével végeztük.

A vizsgálatok során általános laboratóriumi fém-, műanyag- és üvegeszközöket használtunk.

A polimeráz láncreakciót Applied Biosystems 9700 típusú PCR-készülékben végeztük. A PCR termék és a rekombináns plazmid koncentrációját NanoDropp 2000 készülékkel ellenőriztük.

A vizsgálatok során 1 ml-es, 200 μl-es, 20 μl-es és 10 μl-es BioPette pipettákat használtunk.

3.3 A vizsgálat módszere

3.3.1. Morfológiai azonosítás és jellemzés

A morfológiai vizsgálatok során mikroszkóp alatt vizsgáltuk a kórokozó sporangiumtartójának színét, habitusát, alakját, az elágazások számát, a szterigmák számát és átlagos hosszúságát. A vizsgálat során továbbá 100 db sporangium két, egymásra merőleges átmérőjét mértük meg.

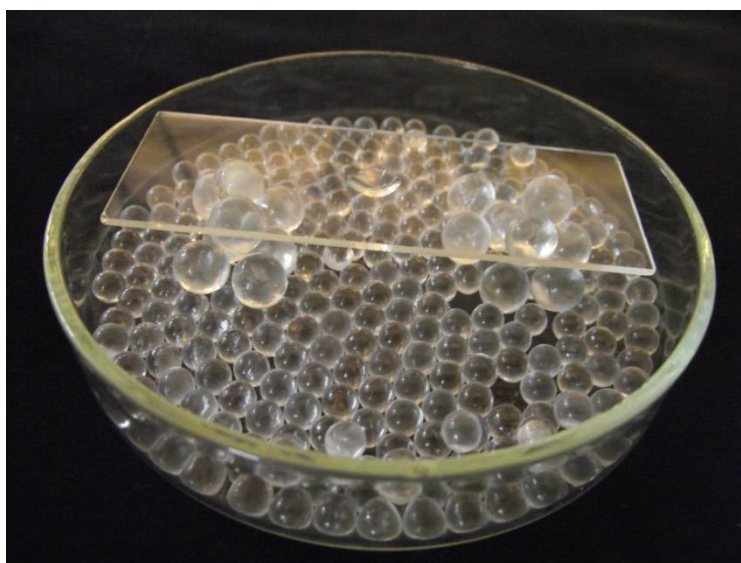
3.3.2. Patogenitási teszt

A kórokozó biotróf életmódja miatt a gomba táptalajon nem tenyésztethető, így a patogenitási tesztet közvetlenül a fertőzött növényeken képződő szaporítóképletekkel végeztük el. Tüneteket mutató növények levelének fonáki részéről sporangiumokat mostunk le steril vízzel. Az így kapott sporangium szuszpenzióval (1×10^4 sporangium/ml) permeteztünk 3 db fiatal, tüneteket nem mutató *Impatiens walleriana* növényt. A kontroll egyedeket (3 db) steril vízzel permeteztük. A növényeket szobahőmérsékleten üvegbúra alatt tartottuk, magas kb. 80 - 90%-os relatív páratartalom mellett. Az eredményeket az inokulálást követő 25. napon értékeltük.

3.3.3. Fertőzési mód vizsgálata

A sporangiumok továbbfejlődését, vagyis a kórokozó fertőzési módját függő vízcsepp módszerrel vizsgáltuk (Vujičić és Colhoun, 1966).

Tüneteket mutató levelek fonáki részéről, ahol a kórokozó sporangiumtartó gyepe megjelent, sporangiumokat mostunk le steril vízzel. Az így kapott sporangium szuszpenzióból egy cseppet tárgylemezre cseppentettünk, majd a tárgylemezt hirtelen mozdulattal fejjel lefelé fordítva, a csepp a felületen maradt. Petri-csészébe üveggyöngyökből néhány cm magas támasztékot építettünk, erre helyeztük a tárgylemezt (7. ábra). Az üveggyöngyök alá steril vizet öntöttünk, majd a Petri-csészét lefedtük, biztosítva a 90% feletti páratartalmat, amely megakadályozta a párolgást. A sporangiumokat szobahőmérsékleten, természetes megvilágítás mellett csíráztattuk, melyek továbbfejlődését 24 és 48 h elteltével, mikroszkóppal vizsgáltuk.



7. ábra Függő vízcsepp módszer a fertőzési mód vizsgálatához (Fotó: Csejk Gy., 2011)

3.3.4. Össznukleinsav kivonás

A peronoszpórák többsége (kivéve pl. *Phytophthora* fajokat) táptalajon nem tenyésztethető, ezért a DNS kivonásához közvetlenül a kórokozó szaporítóképleteit használtuk. A levelek fonákáról steril lándzsátűvel sporangiumtartó gypet kapartunk steril dörzsmozsárba, amelyet kvarchomokkal eldörzsöltünk. 600 µl CTAB (cetil-trimetilammónium-bromid) puffert adtunk hozzá, majd tovább dörzsöltük. Az elegyet 1,5 ml-es Eppendorf csőbe töltöttük, majd 65 °C-on inkubáltuk blokk-termosztátban 45 percen keresztül. Ezt követően 600 µl izoamil-alkoholos kloroformot (24:1) adtunk hozzá, amellyel alaposan összeráztuk és vortexeltük. Centrifugálással (10 perc, szobahőmérsékleten) történő ülepítést követően a vizes fázist tiszta Eppendorf csőbe pipettáztuk át, majd a kloroformmal történő tisztítást az előző lépés szerint megismételtük. A nukleinsavakat 600 µl izopropanollal csaptuk ki. A denaturálódott nukleinsavakat 5 perc centrifugálással ülepítettük, majd 1 ml 70%-os etanollal mostuk, újabb 5 percen át centrifugálva. A pelletet beszárítottuk, majd 40 µl 10 µg/ml RNase-os (ribonukleáz) TE oldatban szuszpendáltuk (**Maniatis és mtsai., 1989**).

3.3.5. Polimeráz láncreakció vizsgálat

A vizsgálathoz a következőket mértük össze 50 µl végtérfogatra:

5 µl 10x Taq puffér (+ KCl – MgCl₂)

3 µl MgCl₂ (25 mM)

2 µl dNTPs 5mM-os (A, G, T, C)

1 µl primer NL1 (20 pmol/µl)

1 µl primer NL4 (20 pmol/µl)

3 µl DNS (0,5 µg)

0,5 µl Taq polimeráz enzim (5 u/µl)

34,5 µl H₂O

A PCR ciklus során a kórokozó gomba DNS elsődleges denaturálása (a két komplementer DNS szál szétválása) 94 °C-on 3 percig zajlott. A ciklusokon belüli denaturáció 94 °C-on 1 percig tartott. Az anelláció (az indítószekvenciaként szolgáló oligonukleotidok kapcsolódása) 55 °C-on 1 percig zajlott, majd az elongáció (láncépítés) 72 °C-on 1,5 percig tartott. A ciklus 30-szor ismétlődött. Az elmaradt szálak befejezése 72 °C-on 10 percig történt, végül a PCR-terméket 4 °C-on tárolta a készülék.

3.3.6. A PCR-termék ellenőrzése és tisztítása

5 µl PCR-terméket, 3 µl steril vizet és 3 µl 1x-es festéket 1%-os agaróz gélben futtattuk. A PCR termék méretét 1 kb (kilobázis) méretmarker (GeneRouler 1 kb DNA ladder, Fermentas) mellett ellenőriztük.

A PCR terméket High Pure PCR Product Purification Kittel a gyártó utasításait követve tisztítottuk meg. Eppendorf csőbe 250 µl kötő puffert mértünk a PCR termékhez, majd összeráztuk. A folyadékot egy gyűjtőcsőbe elhelyezett szűrőbe pipettáztuk át, majd egy percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A cső alján összegyűlt folyadékot kiöntöttük. 500 µl etanolos mosó puffert adtunk hozzá, majd egy percig centrifugáltuk. Az összegyűlt folyadékot kiöntöttük, majd a tisztítást megismételtük 200 µl mosó puffer hozzáadásával. A centrifugálást követően a szűrőt tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük. 50 µl elúciós pufferrel oldottuk ki a PCR terméket a szűrőben lévő mátrixból.

3.3.7. Ligálás

A ligáláshoz a következőket mértük össze 10 µl végtérfogatra:

1 µl puffer (T4 DNS ligáz 10x-es puffere)

1 µl plazmid (pGEM-T Easy)

3 µl inzert (tisztított PCR-termék, ~300 ng)

0,5 µl enzim (T4 DNS ligáz enzim, 5 u/µl)

4,5 µl steril H₂O

Ezt szobahőmérsékleten egész éjszakán át ligáltuk.

3.3.8. Transzformálás *E. coli* DH 5-α törzsébe

A -70 °C-on tárolt kompetens sejtet jégen kiolvasztottuk, a ligátumot szintén jégre tettük. A már felolvadt kompetens sejtet hozzámértük a ligátumhoz, 30 percig hagytuk jégen állni, majd egy percig 42 °C-on tartottuk, hogy kinyíljanak az *E. coli* baktérium pórusai és a plazmid bejuthasson. Ezután azonnal jégre tettük és öt percig jégen tartottuk. Ezt követően hozzámértünk 500 µl antibiotikum-mentes 2TY folyékony táptalajt, és ezzel összeforgattuk. Egy órán át 37 °C-on ráztattuk. Ezalatt ampicillin tartalmú LB szilárd táptalajra 10 µl IPTG-t és 40 µl X-Gal-t szélesztettünk, és megvártuk, míg megszárad. A ráztatás után az előkészített táptalajra 100 µl ill. 50

μl-t kikentünk a már felszaporodott baktérium tenyészetből. Száradás után a lemezeket 37 °C-ra helyeztük és egy éjszakán át növesztettük a kolóniákat.

3.3.9. Minipreparátum készítése

Tizenkét egyedi fehér kolóniából 2–2 ml folyadékkultúrába (ampicillines LB) oltottunk le, és 37 °C-on éjszaka rázattuk. A baktériumkultúrával töltött Eppendorf csövet szobahőmérsékleten 1 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, és a pellethez 200 μl „A” oldatot adtunk hozzá (15 mM TRIS HCl pH: 8, 10 mM EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav), 50 mM glükóz). Vortex segítségével összekevertük, majd öt percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Hozzáértünk 400 μl „B” oldatot (0,2 M NaOH, 1% SDS) és összeforgattuk, feloldva ezzel a sejtfalat. Ezt követően 300 μl „C” oldatot adtunk hozzá (60 ml 5 M Na-acetát, 11,5 ml ecetsav, 28,5 ml steril H₂O) és ezzel is összeforgattuk. Öt percre jégre helyeztük és öt percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf csőbe töltöttük, majd ismét centrifugáltuk. A nukleinsavak denaturálására 600 μl izopropanolt adtunk hozzá, ezzel összeforgattuk, és öt percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. Elöntöttük a felülúszót, lecsöpögtettük, és a pellethez hozzáadtunk 200 μl „D” oldatot (0,1 M Na-acetát pH: 7, 0,05 M TRIS HCl pH: 8), ezt hagytuk szobahőmérsékleten állni 10 percig, majd Vortex segítségével kevertük, végül 400 μl abszolút etanollal öt percig centrifugáltuk, a felülúszót elöntöttük, és a pelletet beszárítottuk 30 perc alatt. Utolsó lépésként a pelletet visszaoldottuk 40 μl RNase TE-ben (1 ml 10x TE, 9 ml steril H₂O, 10 μl RNase (10 mg/ml) (Maniatis és mtsai., 1989).

3.3.10. Az inzert ellenőrzése

Az inzert beépülését a minipreparátum módszerrel tisztított klónok rekombináns plazmidjaiba *Eco*RI restrikciós endonukleázzal ellenőriztük. Az *Eco*RI enzim a legmegfelelőbb erre a célra, hiszen a vektoron a beépülés helye mellett mindkét oldalon megtalálható ez a specifikus hasítóhely (6. ábra).

Az emésztéshez az alábbiakat mértük össze, egyenként 10 μl végtérfogatra:

2 μl plazmid (0,5 μg)

1 μl 10x *Eco*RI puffer

0,2 μl *Eco*RI enzim (10 u/μl)

6,8 μl H₂O

Az Eppendorf csöveket 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A mintákhoz 3 - 3 µl 1x-es festéket mértünk. 1% agaróz gélben megfuttattuk, és ellenőriztük, a megfelelő hosszúságú inzert kivágódását.

3.3.11. Plazmid tisztítás szekvenáláshoz

A kiválasztott klónokat 2 ml folyadékkultúrában (ampicillines LB) újra felszaporítottuk (egész éjszakán át rázattuk 37 °C-on). A baktériumkultúrával töltött Eppendorf csöveket 1 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel (BIO-RAD) a gyártó utasításai szerint tisztítottuk.

A pellethez 200 µl 'Cell Resuspension' puffert adtunk, majd vortexeltük, amíg vissza nem oldódott. 250 µl lízis oldatot mértünk hozzá, majd ezt kézzel összeforgattuk. Ezt követően hozzáadtunk 250 µl neutralizációs oldatot, kézzel összeforgattuk, 5 percre jégre tettük, majd 5 percig centrifugáltuk. A gyűjtőcsőbe belehelyeztük a filtert, majd a mátrixot összeráztuk. A felülúszót átöntöttük egy szűrőbe, és hozzáadtunk 200 µl mátrixot, pipettával felsuszpendáltuk, majd 30 másodpercig centrifugáltuk. Következő lépésben eltávolítottuk a szűrőt, kiöntöttük az összegyűlt oldatot, majd visszahelyeztük a filtert és hozzáadtunk 500 µl mosópuffert. Ezt 30 másodperc centrifugálás követte. A mosást még egyszer megismételtük, majd 2 percen át centrifugáltuk. Végül a szűrőt egy tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük és 40 µl steril vízzel centrifugálva oldottuk ki a mátrixból a plazmidot.

Szekvencia meghatározásra 10 µl (150ng/ µl) tisztított rekombináns plazmidot küldtük a szegedi BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetbe.

3.3.12. A nukleotid sorrend meghatározása és analízise

A kiválasztott klónokat ABI3500 (Applied Biosystems) típusú kapilláris szekvenáló berendezéssel és ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kittel (Applied Biosystems) szekvenáltattuk, M13 reverse és M13-20 forward primerekkel. A szekvenciák azonosításához az EMBL (European Molecular Biology Laboratory)/DDBJ (DNA Data Bank of Japan)/PDB (Protein Data Bank) adatbázisokat használtuk fel.

A szekvenciák összehasonlításához a GCG szekvenciaanalizáló programcsomagot használtunk (University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG) sequence analysis software package version 9.1), amelyből a SEQED, ASSEMBLE, GAP és a PILEUP programokat használtuk fel. Az összehasonlítás során ezen kívül a BoxShade 3.21 programot alkalmaztuk

(www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). A filogenetikai törzsfa megrajzolását és a megbízhatóság becslésére szolgáló bootstrap analízist a MEGA 3.1 szoftverrel végeztük, ahol a filogenetikai távolság számítás a Jukes-Cantor módszerrel történt, a törzsfa pedig a Neighbor-Joining eljárással készült.

A génbank adatbázisából a következő hivatkozási számokon található peronoszpóra izolátumok 28S rRNS génjének szekvenciáit hasonlítottuk össze a magyar izolátuméval:

- AY250181 (gazdanövény: *Impatiens noli-tangere*)
- AY035522 (gazdanövény: *Impatiens capensis*)
- AY587558 (gazdanövény: *Impatiens* sp.)
- EF196869 (gazdanövény: *Impatiens noli-tangere*)
- FJ787308 (gazdanövény: *Impatiens walleriana*)
- HQ246451 (gazdanövény: *Impatiens walleriana*)

4. Eredmények

4.1. A betegség lefolyása, tünetek

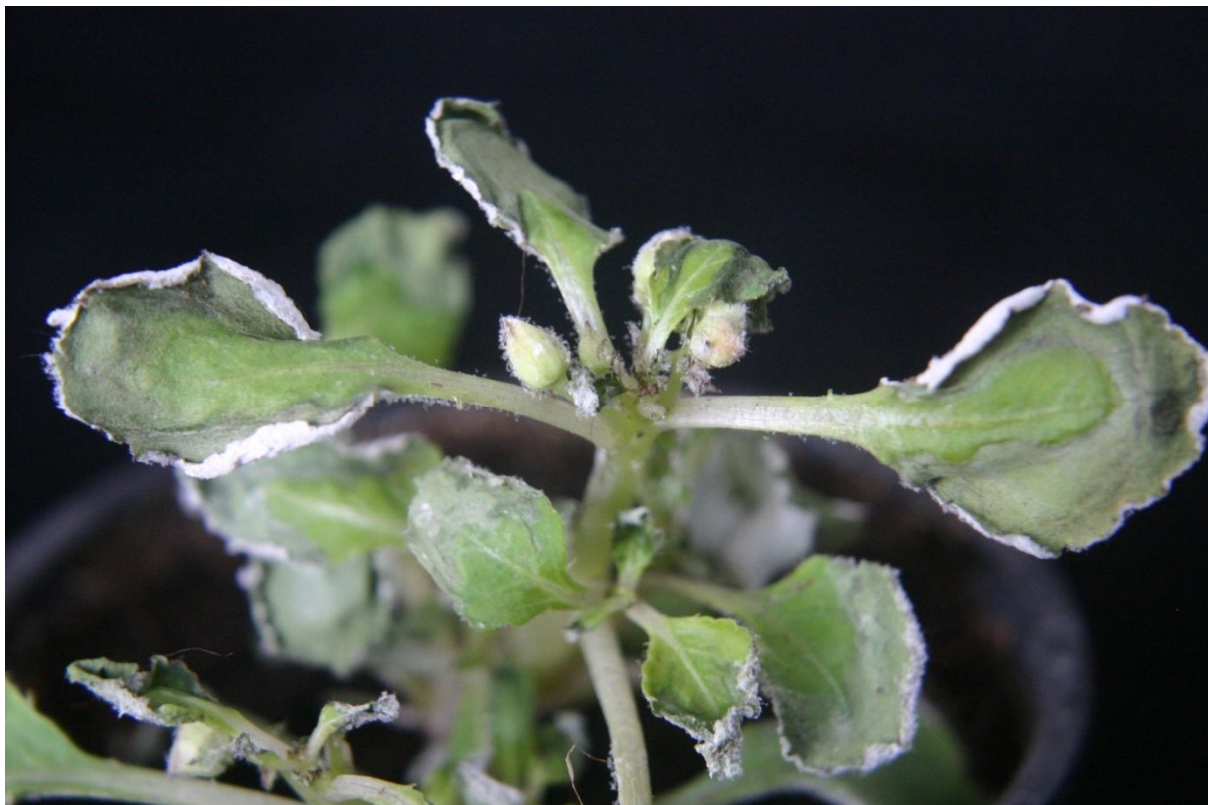
A betegség tüneteit *Impatiens walleriana* növények következő hibridjein és fajtáin figyeltük meg: 'Impreza F1 Red', 'Accent', 'Rose Picottee', 'Vitara Rose', valamint 'Campos White'.

Az első tünetek hirtelen alakultak ki a fiatal, addig egészségesnek tűnő növényeken. A levelek színén sárgulás jelent meg, majd a fonáki részt hamarosan teljes mértékben beborította a gomba fehér, bársonyos sporangiumtartó gyepe (**8. ábra**).



8. ábra A kórokozó sporangiumtartó gyepe *Impatiens walleriana* leveleinek fonáki részén
(Fotó: Palkovics L., 2011)

A bimbókat szintén beborította a sporangiumtartó gyepe (**9. ábra**). A fertőzött növények egyáltalán nem virágoztak. A növények a növekedésükben visszamaradtak. A levelek hullámossá váltak, színük felé kanalasodtak (**9. ábra**), hervadtak, majd elszáradtak. A száraz, elhalt leveleken a főtünet továbbra is látható volt. Az első tünetek megjelenésétől növények teljes pusztulásáig 2 - 4 hét telt el.



9. ábra: A betegség tünetei *Impatiens walleriana* növényen (Fotó: Palkovics L., 2011)

Kecskeméten az értékesítés előtt álló növényállomány mintegy 90%-án megjelentek a peronoszpóra tünetei. A fertőzött növények a növényvédelmi kezelések ellenére kivétel nélkül elpusztultak.

4.2. A kórokozó morfológiai jellemzői

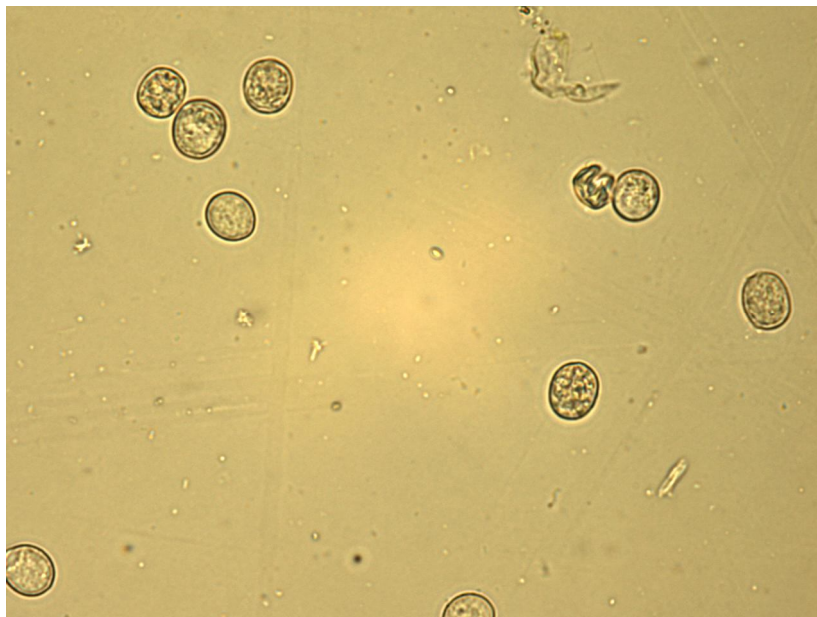
A sporangiumtartók nagy tömegben hófehér színűek, mikroszkóp alatt vizsgálva hialinok. A sporangiumtartó monopodiális, vagyis az oldal elágazásoknak egyetlen közös alapjuk van. A sporangiumtartó nyél egyenes, rajta 4 - 7 elágazás figyelhető meg, amelyek szintén egyenes lefutásúak, nem keskenyednek el. A sporangiumtartók három apikális szterigmában végződnek (**10. ábra**). A szterigmák átlagos hosszúsága 4.6 - 16.4 μm (átlagosan 9.6 μm).

A sporangiumtartó habitusa, elágazásai és a szterigmák száma alapján megállapítottuk, hogy a kórokozó a peronoszpórák közül a *Plasmopara* nemzetségbe tartozik.



10. ábra A kórokozó sporangiumtartója 600x-os nagyításon (Fotó: Csejk Gy., 2011)

A sporangiumok egysejtűek, hialinok. Alakjuk lapított gömb vagy ovális (**11. ábra**). Rövidebb és hosszabb átmérőjük 100 sporangium adatai alapján: $11,04 (7,7 - 13,8) \times 13,9 (9,9 - 17,4) \mu\text{m}$.



11. ábra A kórokozó sporangiumai 600x-os nagyításon (Fotó: Csejk Gy., 2011)

4.3. Patogenitási teszt

Az első tünetek 12 - 16 nappal az inokulációt követően jelentek meg a növényeken. A levelek színén sárgulást figyeltünk meg. A levelek fonáki részén 5 - 7 nappal később kialakult a fehér színű sporangiumtartó gyepek. Mikroszkóp alatt vizsgálva a szaporító képleteket megállapítottuk, hogy az inokulált növényeken megjelent kórokozó morfológiailag megegyezik az eredeti növényről származóval. A kontroll növények az értékelés napjáig egészségesek maradtak. Tehát az *Impatiens walleriana* növényen megjelent peronoszpóra faj patogenitását bizonyítottuk.

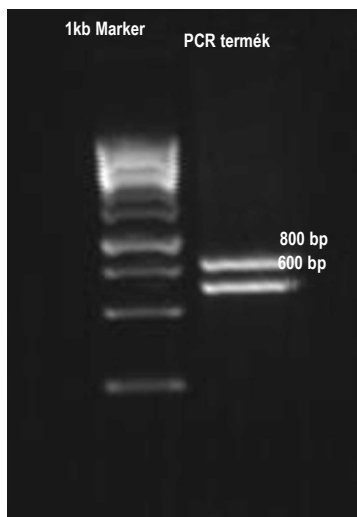
4.4. A fertőzési mód vizsgálata

A gomba sporangiumait vízcseppben csíráztatva megállapítottuk, hogy a sporangiumok csíratömlőt nem fejlesztettek. A sporangiumok belseje láthatóan differenciálódott, feldarabolódott, majd 48 óra elteltével már megfigyeltünk kiürült sporangiumokat is. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a vízifukszia peronoszpóráját okozó gomba sporangiumai indirekt módon fejlődnek tovább.

4.5. A kórokozó molekuláris azonosítása

4.5.1. PCR vizsgálat

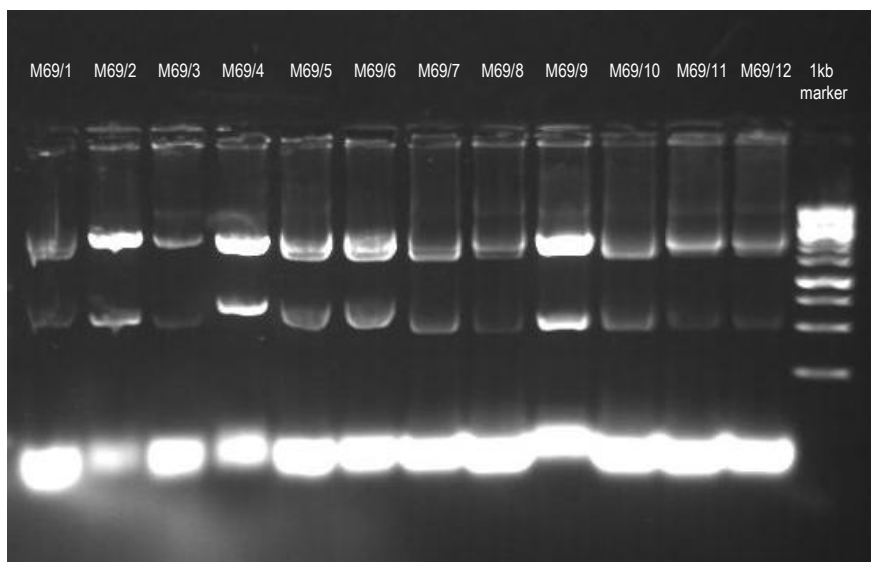
A polimeráz láncreakció eredményeként az ITS régióra tervezett primerek egy 600 és egy 800 bp (bázispár) körüli PCR terméket emeltek ki (**12. ábra**).



12. ábra Az NL1 és NL4 primerek által kiemelt 600 és 800 bp hosszúságú PCR termékek (Fotó: Csejk Gy., 2011)

4.5.2. Minipreparátum

A tizenkét minipreparátumból tizenegy a rövidebb szakaszt, míg egy klón (M69/4) a hosszabb inzertet tartalmazta (**13. ábra**). A M69/4-es (800 bp) és a M69/6 (600 bp) számú klónokat választottuk ki, és szaporítottuk fel a szekvencia meghatározásához.



13. ábra A rekombináns klónok ellenőrzése *Eco*RI hasítással 1%-os agaróz gélen

(Fotó: Csejk Gy., 2011)

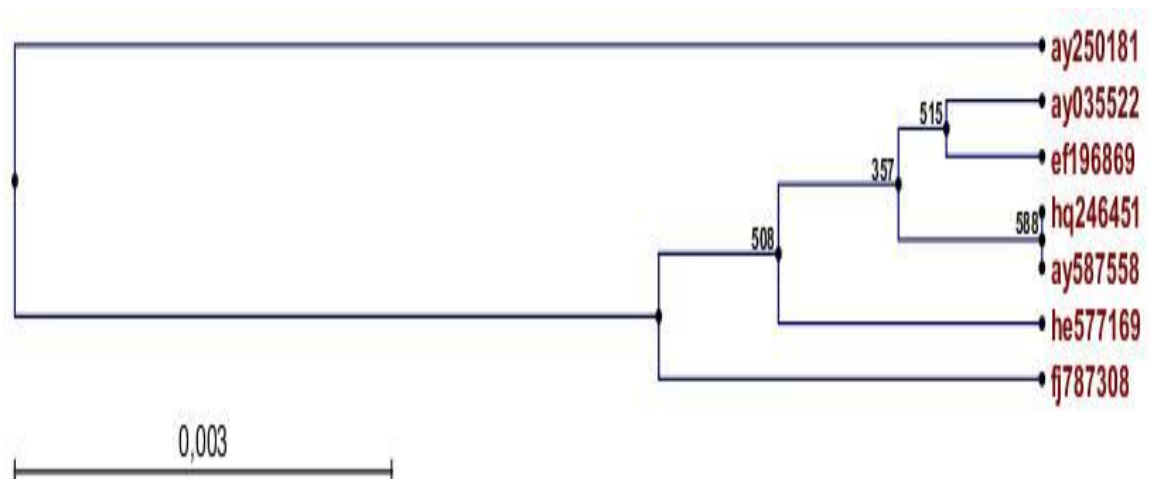
4.5.3. Szekvencia meghatározása

A szekvencia meghatározás után a klónozott szakasz nukleotid sorrendjét összevetve az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban találhatóakkal megállapítottuk, hogy az M69/4-es számú klón, amely a hosszabb (800 bp körüli) inzertet tartalmazza közel 100%-os homológiát mutat a *Plasmopara obducens* kórokozóval. Így a molekuláris vizsgálat is megerősítette, hogy valóban a morfológiai bélyegek alapján *Plasmopara obducens*-ként azonosított peronoszpóra okozta a megbetegedést *Impatiens walleriana* növényeken. A szekvenciát feltöltöttük a nemzetközi adatbázisba, ahol az izolátumnak az IWPO-H1 nevet adtuk. A szekvencia a génbankban a HE577169 hivatkozási számon található meg (**1. melléklet**). Ez az első szekvencia adat Magyarországról a *Plasmopara obducens* kórokozó kapcsán.

Az M69/6 klón, amelybe a rövidebb (600 bp körüli) inzert épült be, az *Impatiens walleriana* növény 26S riboszomális RNS génjének egy részletét tartalmazta.

4.5.4. Rokonsági kapcsolatok feltárása

A magyar *Plasmopara obducens* izolátum a legnagyobb homológiát (99,72%) az Egyesült Királyságból származó AY587558 és a Szerbiából származó HQ246451 hivatkozási számú izolátummal mutatta (14., 15. ábra).



14. ábra A *Plasmopara obducens* izolátumainak filogenetika törzsfája a 28S régió szekvenciája alapján

Magyarázat: 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. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják 1000 mintavétel esetén. A törzsfá alatti skála mértéke 3 bázis eltérést jelöl 1000 bázisonként. Az izolátumokat az EMBL/DDBJ/PDB azonosítási számukkal jelöltük. Saját izolátumunkat piros kerettel emeltük ki.

ay035522	1	ATGAGCTCAAGCTTAAATCTTCGTGCAATTTTGCACGGCGAATTGTAGTCTATAGAGG
ef196869	1	
ay587558	1	C.....
hq246451	1	C.....
he577169	1	G.....C.....
fj787308	1	C.....
ay250181	1	
ay035522	61	CGTGGTCAGTATAAGCACTTGGGGTAAGTTCCTTGAAAAAGGACAG-CATGGAGGGTGAT
ef196869	61	-
ay587558	61	-
hq246451	61	-
he577169	61	-
fj787308	61	-..G.....
ay250181	61	C.....
ay035522	120	ACTCCCGTTCATCTCTAAGTTGCTTGTGCGTACGACCCGTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT
ef196869	120	
ay587558	120	
hq246451	120	
he577169	120	
fj787308	120	
ay250181	121	
ay035522	180	TGAGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGAC
ef196869	180	
ay587558	180	
hq246451	180	
he577169	180	
fj787308	180	T.....
ay250181	181	
ay035522	240	CGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAATAGAGTTAAAGA
ef196869	240	
ay587558	240	
hq246451	240	
he577169	240	
fj787308	240	
ay250181	241	

ay035522	300	GTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAACCAAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCGTGGTATAT
ef196869	300	
ay587558	300	
hq246451	300	
he577169	300	
fj787308	300	
ay250181	301	
ay035522	360	TTCATTGGCGAGTGTGTGCGTGCGTGCTGTTGCAGTGGCTTTTTGGCTGCGCTCGGTG
ef196869	360	
ay587558	360	
hq246451	360	
he577169	360	
fj787308	360	
ay250181	361	
ay035522	420	TGTGTGCTGTGTGTACTTGCTGGTGCCCTGTGCTGCGGTGGGACGTCAAGGTCAGTTCGT
ef196869	420	
ay587558	420	
hq246451	420	
he577169	420	
fj787308	420	
ay250181	421	A.....
ay035522	480	ATGCTGCGGGAAATGGCTACTGAGGAGGTAGGGCTTACGCTTGCGTTTGTCTGTTATATC
ef196869	480	
ay587558	480	
hq246451	480	
he577169	480	
fj787308	480	
ay250181	481	..A....R.C.....C.....A.....S.....
ay035522	540	TTGGTGGACGAGTCGTCGC-GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGTGCTTTGAGTGGGC
ef196869	540	-
ay587558	540	-
hq246451	540	-
he577169	540	-.....C.....
fj787308	540	G.....
ay250181	541	C.....-.....W.....R...C.....

ay035522	599	TTGGGTCTCCGTGTGCGCCGTGTGCGGATAGCTTGCTATGCGTGTGTG-GTTGTATGTG
ef196869	599	-.....
ay587558	599	-.....
hq246451	599	-.....
he577169	599	-.....
fj787308	600	-.....
ay250181	600	S.....A.....R

15. ábra A BoxShade programmal készített nukleotid szekvencia összehasonlítás részlete az ITS régióban

Magyarázat: Az ábrán szereplő nukleotid szekvencia az 28S riboszomális RNS gén egy részletét mutatja. Az egyforma nukleotidokat az ábrában pontokkal, a hiányzó nukleotidokat vízszintes vonallal jelöltük. A nukleinsav szekvenciák előtt az izolátumok azonosító számát tüntettük fel, amellyel a nemzetközi adatbázisban szerepelnek. Saját izolátumunkat pirossal emeltük ki.

5. Eredmények megvitatása, következtetések

Impatiens walleriana növényen eddigi ismereteink szerint két kórokozó, a *Plasmopara constantinescui* és a *Plasmopara obducens* okozhat peronoszpórát (Constantinescu, 1991). A szakirodalmi adatokat összevetve az általunk végzett vizsgálatok eredményével egyértelműen kijelenthetjük, hogy 2011-ben Magyarországon a *Plasmopara obducens* okozott komoly károkat.

A beteg növényeken a levelek sárgulását tapasztaltuk, majd megjelent a gomba fehér, bársonyos sporangiumtartó gyepe beborítva a fonáki részt. A fertőzött növények egyáltalán nem virágoztak, fejlődésükben visszamaradtak. A levelek hervadtak, végül teljesen elszáradtak. A száraz, elhalt leveleken a főtünet továbbra is látható volt. Az első tünetek megjelenésétől a növények teljes pusztulásáig 2 - 4 hét telt el. Megállapításaink megegyeznek Constantinescu (1991), Castalanelli és Hoffmann (2008), valamint Cunnigton és mtsai (2008) által leírt szimptomákkal.

Kecskeméten szinte az egész értékesítés előtt álló növényállományon (körülbelül 90%) megjelentek a peronoszpóra tünetei. A fertőzött növényeken a növényvédelmi kezelések már nem tudtak segíteni, azok kivétel nélkül elpusztultak. A termesztők észrevételeit az irodalmi adatok is alátámasztják. Anonymus (2005) szerint, ha a kórokozó megjelent az állományban, már a higiéniai előírások betartásával és növényvédő szeres kezeléssel sem lehet a fertőzés továbbterjedését megakadályozni.

A morfológiai jellemzőket összevetve az irodalmi adatokkal, kismértékű eltérést csak a sporangiumok méretében tapasztaltunk. A sporangiumtartók felépítése megfelel a Constantinescu (1991) és Wegulo és mtsai. (2004) által leírtaknak, mely szerint az oldalágak nem keskenyednek el, nem szélesednek ki és derékszöget zárnak be a tengellyel. A sporangiumtartók három csúcsi elhelyezkedésű szterigmában végződnek. A kórokozó morfológiai tulajdonságai (sporangiumtartó habitusa, elágazásai és a szterigmák száma) alapján megállapítottuk, hogy a kórokozó a peronoszpórák közül a *Plasmopara* nemzetségbe tartozik. Wegulo és mtsai. (2004) által mért sporangiumok mérete átlagosan $22,2\ \mu\text{m} \times 16,7\ \mu\text{m}$, ezzel szemben az általunk mért sporangiumok hosszabb és rövidebb átmérője $13,9 \times 11,04\ \mu\text{m}$. Glits (2000) szerint a *Plasmopara* nemzetség sporangiumai indirekt úton fejlődnek tovább, vagyis a sporangiumokból mozgó sporangiospórák szabadulnak ki. A gomba sporangiumait vízcseppben csíráztatva, majd azok továbbfejlődését vizsgálva mi is azonos eredményre jutottunk.

Korábban a peronoszpóra félék rendszertani besorolása elsősorban morfológiai jellemzőkön alapult (Shaw, 1981). A molekuláris azonosítás új lehetőségeket tárt fel a *Peronosporales* renden belül a rokonsági kapcsolatok feltárásában (Riethmüller és mtsai., 2002; Göker és mtsai., 2003). A morfológiai vizsgálatok eredményei alapján feltételeztük, hogy a *Plasmopara obducens*

kórokozóval állunk szemben, azonban a klasszikus vizsgálatok mellett fontosnak tartottuk elvégezni a kórokozó molekuláris azonosítását is. A polimeráz láncreakció során egy közel 600 és egy 800 bp hosszúságú PCR termék keletkezett, ahogy **Bulajić és mtsai. (2011)** is említik tanulmányukban. Ennek oka, hogy az NL1 NL4 indítószekvenciák az *Impatiens walleriana* növény 26S régiójából (600 bp) és a *Plasmopara obducens* a 28S régiójából (800 bp) is kiemelnek egy szakaszt. A nukleotid sorrendet összehasonítottuk az NCBI adatbázisban található izolátumokéval. Az Egyesült Királyságból származó AY587558 és a Szerbiából származó HQ246451 hivatkozási számú izolátumokkal mutatta a legnagyobb homológiát (99,72 %).

2011 tavaszán egy kecskeméti termesztő észlelte a betegség előfordulását, azóta már több hazai termesztő is jelezte a kórokozó megjelenését. A fertőzött állományok csaknem 100%-a elpusztult. Magyarországra Németországból importált dugványokkal került be a kórokozó. A kórokozót vizsgálatainkkal párhuzamosan **Vajna (2011)** is azonosította, aki rövid közleményében említi, hogy 2010-ben már előfordult a kórokozó a budapesti parkokban.

A Hortus Hungaricus Dísznövénykiállításon a forgalmazók elmondása alapján, arra a megállapításra jutottam, hogy Magyarországon is jelentős mértékben elterjedt a kórokozó. Több hazai termesztőben felmerült az *Impatiens walleriana* forgalmazásának visszaszorítása. Döntésüket a kórokozó gyors terjedésével, valamint a hatékony kémiai növényvédelem hiányával magyarázzák. Egyesek a megoldást az *Impatiens* 'Új-Guinea' hibridek árusításában látják, ami valóban célszerű lehet, hiszen **Cunnington és mtsai. (2006)** nem tapasztaltak fertőzésre utaló jeleket az 'Új-Guinea' hibrideken. Más termesztők egyéb fajokkal (*Begonia* sp.) helyettesítenék a vízifuksiát.

A *Plasmopara obducens* Magyarországra feltételezhetően 2010-ben került be, igen kevés adat áll a rendelkezésünkre. A jövőben továbbra is figyelemmel kísérjük a kórokozó terjedését, valamint további vizsgálatokat is tervezünk, elsősorban a kórokozó biológiájával kapcsolatban. Magátviteli vizsgálatokkal kívánjuk eldönteni, hogy a kórokozó terjedésében a külső vagy a belső magátvitelnek van nagyobb szerepe.

6. Összefoglalás

Az *Impatiens walleriana* és az *Impatiens* 'Új-Guinea' hibridek Magyarországon is igen kedvelt és széles körben elterjedt dísznövények. Nagy mennyiségű import szaporítóanyag érkezik Magyarországra Nyugat-Európából, főleg Németországból és Hollandiából. 2011 tavaszán egy kecskeméti üvegházban szokatlan peronoszpóra jellegű tünetekre figyeltek fel *Impatiens walleriana* különböző hibridjein és fajtáin. A következő hónapokban az ország több részéről jelentős károkról számoltak be a termesztők. Munkánk során célul tűztük ki a tünetek és a kórfolyamat leírását, a kórokozó azonosítását és jellemzését morfológiai bélyegek alapján és molekuláris biológiai módszerekkel.

Az *Impatiens*-fajok esetében az irodalmi adatok alapján a *Plasmopara constantinensis* és a *Plasmopara obducens* okozhat peronoszpórát, a két faj azonban az okozott tünetek és a sporangiumtartók alapján egyértelműen elkülöníthető. A morfológiai jellemzés során mikroszkóp alatt vizsgáltuk a kórokozó sporangiumtartójának színét, habitusát, alakját, az elágazások számát, a szterigmák számát és átlagos hosszúságát. A vizsgálat során továbbá 100 db sporangium két, egymásra merőleges átmérőjét mértük meg. Függő vízcsepp módszerrel vizsgáltuk a kórokozó fertőzési módját. Patogenitási tesztet végeztünk a gomba megbetegítő képességének igazolására. A molekuláris vizsgálatok során CTAB módszerrel össznukleinsav kivonást végeztünk, majd polimeráz láncreakcióval az ITS régióban található 28S rRNS egy részét sokszoroztuk meg NL1 és NL4 indítószekvenciák segítségével. A felszaporított szakaszt klónoztuk, majd szekvencia meghatározásra küldtük. A kórokozó meghatározására és rokonsági kapcsolatainak feltárására szekvencia analízist végeztünk.

A kórokozó morfológiai és molekuláris vizsgálata után megállapítottuk, hogy a vízfúkszia peronoszpóráját a *Plasmopara obducens* okozta, amely egyre több országban okoz súlyos megbetegedést Európa szerte. A levelek színe sárgult, a fonákon pedig megjelent a fehér, bársonyos, egybefüggő sporangiumtartó gyp. A növények virágot nem hoztak, növekedésben visszamaradtak, az első tünetek megjelenését követő 2 - 4 héten belül teljesen elpusztultak. A sporangiumtartók hialinok, monopodiálisak, a sporangiumtartó nyél egyenes, rajta 4 - 7 elágazás figyelhető meg, melyek három szterigmában végződnek. A fertőzési mód vizsgálatok kiderült, hogy a sporangiumok indirekt módon fejlődnek tovább.

A szekvencia meghatározás után megállapítottuk, hogy a közel 800 bp hosszúságú PCR termék csaknem 100%-os homológiát mutat a *Plasmopara obducens* kórokozó egyes izolátumaival. A nukleotid sorrendet összehasonítottuk az NCBI adatbázisban található izolátumokkal, a legnagyobb homológiát (99,72%) az Egyesült Királyságból származó AY587558 és a Szerbiából származó HQ246451 hivatkozási számú izolátummal mutatta. A nukleotid sorrendet feltöltöttük a

nemzetközi adatbázisba, ahol a szekvencia a HE577169 hivatkozási számon érhető el, amely az első szekvencia adat Magyarországról a *Plasmopara obducens* kórokozó kapcsán.

Eredményeinket összegezve, elsőként azonosítottuk hazánkban klasszikus és molekuláris módszerrel a *Plasmopara obducens* kórokozót *Impatiens walleriana* növényekről.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a segítséget konzulenseimnek dr. Palkovics László tanszékvezetőnek és dr. Petróczy Marietta egyetemi adjunktusnak. A vizsgálatok során folyamatosan irányították és ellenőrizték munkámat, illetve készségesen válaszoltak kérdéseimre.

Külön szeretném megköszönni Professzor Úrnak a fényképek készítésében, valamint a molekuláris vizsgálatok során nyújtott segítségét.

Továbbá külön köszönet jár Petróczy Mariettának, aki végtelen türelemmel és megértéssel segítette és támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom Tóth Annamária PhD-hallgatónak a laboratóriumi vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségéért.

Kutatómunkánkat a **TÁMOP- 4.2.1./B-09/1-KMR-2010-0005** és a **TÁMOP- 4.2.2./B-10/1-2010-0023** pályázatok támogatták.

8. Irodalomjegyzék

1. **Anonymus**, 2005. EPPO Reporting Service NO. 7 PARIS, 2005-07-01. 2005/108. Addition of *Plasmopara obducens* to the EPPO Alert List.
<http://archives.eppo.org/EPPORreporting/2005/Rse-0507.pdf>
2. **Anonymus**, 2008a. EPPO Reporting Service NO. 5 PARIS, 2008-05-01. 2008/102. First record of *Plasmopara obducens* in Italy. <http://archives.eppo.org/EPPORreporting/2008/Rse-0805.pdf>
3. **Anonymus**, 2008b. EPPO Reporting Service NO. 7 PARIS, 2005-07-01. 2005/106. A new downy mildew of *Impatiens* (*Plasmopara obducens*) found in Germany.
<http://archives.eppo.org/EPPORreporting/2005/Rse-0507.pdf>
4. **Anonymus**, 2008c. EPPO Reporting Service NO. 5 PARIS, 2008-05-01. 2008/101. First record of *Plasmopara obducens* in Slovenia. <http://archives.eppo.org/EPPORreporting/2008/Rse-0805.pdf>
5. **Bulajić, A., Vučurović, A., Stanković, I., Ristić, D., Jović, J., Stojković, B., Krstić, B.** 2011. First report of *Plasmopara obducens* on *Impatiens walleriana* in Serbia. In: Plant Disease. 95 évf. p. 491.
6. **Castalanelli, C., Hoffmann, H.** 2008. Downey mildew of *Impatiens*. In: Gardennote. Department of Agriculture and Food. Australia. note 321.
7. **Constantinescu, O.** 1991. *Bremiella sphaerosperma* sp. nov. and *Plasmopara borrieriae* comb. nov. In: Mycologia. 83 évf. p. 473 - 479.
8. **Cunnington, J. H., Aldaoud, R., Loh, M., Washington, W.S., Irvine, G.** 2006. First record of *Plasmopara obducens* (downy mildew) in *Impatiens* in Australia. In: Plant Pathology. 57 évf. p. 371.
9. **Farr, D. F., Rossman, A. Y.** 2011. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratories. United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service. Retrieved October 11. 2011. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
10. **Glits M.** 2000. Oospórásgombák. In: Glits M., és Folk Gy. Kertészeti Növénykórtan. Budapest Mezőgazda Kiadó. p. 86 -8 7.
11. **Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Weiß, M., Oberwinkler, F.** 2003. Taxonomic aspects of *Peronosporaceae* inferred from Bayesian molecular phylogenetics. In: Canadian Journal of Botany. 81 évf. p. 672 - 683.
12. **Index Fungorum** <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=211129>

13. **Lane, C. R., Beales, P. A., O'Neill, T. M., McPherson, G. M., Finlay, A. R., David, J., Constantinescu, O., Henricot, B.** 2005. First report of *Impatiens* downy mildew (*Plasmopara obducens*) in the UK. In: Plant Pathology. 54 évf. p. 243.
14. **Maier, W., Begerow, D., Weiß, M., Oberwinkler, F.** 2003. Phylogeny of the rust fungi: an approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. In: Canadian Journal of Botany. 81 évf. p. 12 – 23.
15. **Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. F.** 1989. Molecular cloning: a Laboratory Manual (3rd volume). Cold Spring Harbor Laboratory. USA
16. **Mukerji, K. G., Chamola B. P., Upadhyay, R. K.** 1999. Biotechnological approaches. In: Biocontrol of plant pathogens. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York p. 17.
17. **Palm, M. E.** 2004. Invasive Fungi. Downy mildew (*Plasmopara*) of *Impatiens*. In: Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratories. United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service. Retrieved October 24. 2011. <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/factsheets/pdfPrintFile.cfm?thisApp=Plasmoparaobducens>
18. **Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiß, M., Oberwinkler, F.** 2002. Phylogenetic relationships of the downey mildews (*Peronosporales*) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. In: Mycologia. 94 évf. p. 834 - 849.
19. **Sansford, C.** 2007. CSL Pest Risk Analysis for *Plasmopara obducens*. http://www.eppo.org/QUARANTINE/Pest_Risk_Analysis/PRAdocs_fungi/07-13972%20GB%20PRA%20PLASOB.pdf
20. **Shaw, C. G.** 1981. Taxonomy and evolution. In: Spencer, D. M. The Downy Mildews. London. Academic Press. P. 17 - 29.
21. **Sohi, H., Tyagi, S. N. S.** 1974. Studies on the downy mildew disease of balsam caused by *Peronospora obducens*. In: Indian Journal of Mycology and Plant Pathology. 4 évf. p. 161 - 165.
22. **Srivastava, S., Singh, L.** 1988. Evidence of seed-borne nature of downy mildew fungus of balsam. In: Seed Research. 16 évf. p. 254 - 255.
23. **Tillyné Mándy A., Honfi P., Szántó M.** 2008. A legfontosabb egynyári dísznövények és balkonnövények ismertetése. In: Tillyné Mándy, A., Honfi, P. Növényházi dísznövénytermesztés. Budapest. Inkart Kft. p. 282.

24. **Toppe, B., Brurberg, M. B., Stensvand, A., Herrero, M. L.** 2010. First report of *Plasmopara obducens* (downy mildew) on *Impatiens walleriana* in Norway. In: Plant Pathology. 59 évf. p. 800.
25. **Ubrizsy, G.,** 1965. Növénykórtan Vol. II, Budapest. Akadémiai Kiadó. p. 83.
26. **Vajna, L.** 2011. First report of *Plasmopara obducens* on impatiens (*Impatiens walleriana*) in Hungary. In: New Disease Reports. 24 évf. p. 13.
27. **Voglmayr, H., Thines, M.** 2007. Phylogenetic relationships and nomenclature of *Bremiella sphaerosperma* (Chromista, Peronosporales). In: Mycotaxon. 100 évf. p. 11 - 20.
28. **Wegulo, S. N., Koike, S. T., Vilchez, M., Santos, P.** 2004. First report of downy mildew caused by *Plasmopara obducens* on impatiens in California. In: Plant Disease. 88 évf. p. 909.
29. **Vujičić R., Colhoun J.** 1966. Asexual reproduction in *Phytophthora erythroseptica*. In: Transactions of the British Mycological Society. 49 évf. p. 245 - 254.

Melléklet

1. melléklet A nemzetközi adatbázisba elküldött *Plasmopara obducens* izolátum hivatkozási száma és adatlapja, a nukleinsav szekvenciával

LOCUS HE577169 757 bp DNA linear PLN 26-SEP-2011

DEFINITION *Plasmopara obducens* partial 28S rRNA gene, isolate IWPO-H1, clone M69.4.

ACCESSION HE577169

VERSION HE577169.1 GI:347843749

KEYWORDS .

SOURCE *Plasmopara obducens*

ORGANISM *Plasmopara obducens*

Eukaryota; stramenopiles; Oomycetes; Peronosporales;

Peronosporaceae; *Plasmopara*.

REFERENCE 1

AUTHORS Petroczy,M., Csejk,G.Y. and Palkovics,L.

TITLE First report of *Plasmopara obducens* on *Impatiens walleriana* in Hungary

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 757)

AUTHORS Palkovics,L.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (26-JUL-2011) to the INSDC. Department of Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..757

/organism="Plasmopara obducens"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="IWPO-H1"

/host="Impatiens walleriana cv. Rose Picottee"

/db_xref="taxon:162140"

/clone="M69.4"

gene <1..>757

/gene="28S rRNA"

rRNA <1..>757

/gene="28S rRNA"

/product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 aaactaaca ggattccct agtaacggcg agtgaagcgg gatgagctca agcttgaat

61 ctccgtgcaa ttttgcacg gcgaattgta gtctatagag gcgtggtcag tataagcact

121 tggggtaagt tccttgaaa aggacagcat ggagggtgat actccggttc atctctaagt

181 tgcttgtcgc tacgaccggt tttctttgag tcgcgttgtt tgagaatgca gcgcaaagta

241 ggtggtaaat tccatctaaa gctaaatatt ggtgcgagac cgatagcaaa caagtaccgt
301 gagggaaaaga tgaagaagac ttgaaaata gagttaaaga gtacctgaaa ctgctgaaag
361 ggaaccaaat cgtttccagt gtctataatc cgtggtatat ttattggcg agtgtgtgag
421 tgcgtgtgct gttgcagtgg cttttggct gcgctcggtg tgtgtgctgt gtgtactgc
481 tggcgccctg tgctgcggtg ggacgtcaag gtcagttcgt atgctgcggg aaatggctac
541 tgaggaggta gggcttacgc ttgcgtttgt ctgttatatc ttggtggacg agtcgtcgcg
601 gttgggactg aggtgcctac aacgtgcttt cgagtgggct tgggtctccg tgcgcgccgt
661 gtgcggatag ctgctatgc gtgtgtggtt gtatgtggat tgatgcgagc cgtaacttgt
721 agtcgttcgg gacgttgacg aaatggagcg atttgac

//