

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYKÓRTANI TANSZÉK

Tudományos diákköri dolgozat

A Colletotrichum acutatum első megjelenése húsos som termésén

Csömör Zsófia

Növényorvos MSc II. évfolyam

Konzulensek:

Dr. Petróczy Marietta egyetemi adjunktus

Tóth Annamária PhD hallgató

Dr. Palkovics László tanszékvezető egyetemi tanár



Budapest, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. A som jelentősebb kórokozói	7
2.1.1. <i>Septoria cornicola</i> Desm. jellemzése	7
2.1.1.1. Rendszertani besorolása	7
2.1.1.2. Jelentősége	7
2.1.1.3. Elterjedése	7
2.1.1.4. Gazdanövényköre	7
2.1.1.5. Tünetei	8
2.1.1.6. Biológiája	8
2.1.1.7. Morfológiai bélyegei	9
2.1.1.8. Tenyészbélyegei	9
2.1.2. <i>Discula destructiva</i> Redlin kórokozó jellemzése	9
2.1.2.1. Rendszertani besorolása	9
2.1.2.2. Jelentősége	10
2.1.2.3. Elterjedése	10
2.1.2.4. Gazdanövényköre	11
2.1.2.5. Tünetei	11
2.1.2.6. Biológiája	11
2.1.2.7. Morfológiai bélyegei	12
2.1.2.8. Tenyészbélyegei	12
2.1.3. <i>Colletotrichum acutatum</i> J.H. Simmonds jellemzése	13
2.1.3.1. Rendszertani besorolása	13
2.1.3.2. Jelentősége	13
2.1.3.3. Elterjedése	13
2.1.3.4. Gazdanövényköre	13
2.1.3.5. Tünetei	14
2.1.3.6. Biológiája	14
2.1.3.7. Morfológiai bélyegei	15
2.1.3.8. Tenyészbélyegei	15
2.2. A fonalas gombák molekuláris vizsgálata és azonosítása	16
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	17
3.1. A vizsgálat helye és ideje	17
3.2. A vizsgálat anyaga	17
3.2.1. Növények	17
3.2.2. Táptalaj	17
3.2.3. Indítószekvenciák	17
3.2.4. Plazmid és baktérium törzs klónozáshoz	17
3.2.5. Enzimek, kitek	18
3.2.6. Eszközök	18
3.3. A vizsgálat módszere	19
3.3.1. A kártétel felmérése és a növényi részek gyűjtése, tárolása	19
3.3.2. A kórokozó izolálása táptalajon és a tenyészetek fenntartása	19
3.3.3. A morfológiai és tenyészbélyegeik megállapítása és értékelése	20
3.3.4. Patogenitási teszt	20
3.3.5. Molekuláris biológiai vizsgálatok	20
3.3.5.1. Össznukleinsav kivonás CTAB módszerrel	20
3.3.5.2. PCR (Polimeráz-láncreakció)	21
3.3.5.3. A PCR-termékek ellenőrzése és tisztítása	21

3.3.5.4. Transzformálás <i>Echerichia coli</i> JM109 törzsébe	22
3.3.5.5. Ligálás	22
3.3.5.6. Minipreparátum	22
3.3.5.7. A plazmid tisztítása szekvencia meghatározáshoz	23
3.3.5.8. Nukleotid szekvencia meghatározása és analízise	23
4. EREDMÉNYEK	25
4.1. Tünetek	25
4.2. A megbetegedés mértékének felmérése Bársonyoson	26
4.3. Morfológiai és tenyészbélyegek	26
4.3.1. Morfológiai bélyegek	26
4.3.2. Tenyészbélyegek	27
4.4. Patogenitási vizsgálat	28
4.5. Az izolátumok azonosítása és molekuláris jellemzése	28
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK	31
6. ÖSSZEFOGLALÁS	33
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	35
8. IRODALOMJEGYZÉK	36
MELLÉKLETEK	

Rövidítések jegyzéke

DNS	dezoxiribonukleinsav
CTAB	cetil-trimetilammónium-bromid
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kb	kilobázis
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeráz-láncreakció
PDA	Potato dextrose agar, Burgonya-dextróz agar
RNase	ribonukleáz
rDNS	riboszómális RNS-t kódoló sejtmagi dezoxiribonukleinsav
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TE	Tris-EDTA
USDA	United States Department of Agriculture

1. Bevezetés, célkitűzés

A *Cornus mas* L. (húsos som) a *Cornales* rendbe (Somvirágúak), azon belül pedig a *Cornaceae* családba (Somfélék) tartozik. Egész Európában, így a Kárpát-medencében is elterjedt.

A húsos som fája rendkívül kemény, nagy szilárdságú és szívós. Ezen tulajdonságait már az ókorban is ismerték, ezért gyakran alkalmazták lándzsa- és dárdanyélként a fegyverkészítés során. Somhajtásokból – főként a *Cornus mas* hajtásaiból – a legkülönbözőbb, kiváló szerszámnyelvek is készíthetők. A középkorban híresek voltak a németországi botfaragványok, amelynek elkészítési technikája (hántolás, szárítás, egyenesítés, óvatos pörköléssel csikozás, fényezés) jól mutatja a som keménységét és megmunkálhatóságát.

A középkorban került előtérbe a növény orvosi célú felhasználása, amelyet főként az ókori gyógyászatból vettek át, de megfigyelésekkel is bizonyították hatását. A növény levele és termése magas csersav tartalmú, amelynek összehúzó hatása van. Megemlítendő továbbá magas C-vitamin tartalma, ezáltal a téli hónapokban kiváló vitaminpótló lehet. Mindemellett glükózt és fruktózt is tartalmaz.

A húsos som legismertebb felhasználási módját az érett termés adja. Gyümölcse nyersen fogyasztható a teljes éréskor. Édeskés íze mellett, kellemesen savanykás, kissé fanyar, fűszeres aromával rendelkezik. Felhasználása igen sokrétű, készülhet belőle kompót, konzerv, szörp, lekvár, néhol aszalják, de készítenek belőle mustot, pálinkát is. A középkor óta ismert a kellemes illatú sombor. A somléből változatos italokat is készítenek. Az ókorban a som termését félérett állapotban az olíwabogyóhoz hasonlóan tették el.

A som virágának fontos szerepe van a méhészetben is, hiszen jelentős mennyiségű nektárt és pollent termel. Igen korai és értékes méhlegelőként tartják számon.

Az eddig felsorolt hasznosítási lehetőségein kívül jelentős szerepe van dísznövényként és az erdészeti alkalmazás területén is. Kertekben és parkokban kiválóan érvényesül, akár önmagában, akár kisebb-nagyobb csoportokban, de felhasználható fedőcserjeként is. Tavasszal virágaival, nyár közepétől pedig színes terméseivel díszít **(1. ábra)**. Kiskertekben számos helyen alkalmazzák élősvévényként vagy kerítés létesítésére. Városokban, forgalmas helyeken kimondottan alkalmas ültetése, mert jól tűri a légszennyezettséget és a talajjal szemben is igénytelennek mondható.

Régebben a húsos somot Európában általában csak szórványosan, háztáji kertekben termesztették, kiterjedt ültetvények soha nem voltak, kivéve az egykori Szovjetunióban, ahol foglalkoztak a növény termesztésével. Többnyire a vadon előforduló cserjék termését gyűjtötték be. Manapság termesztése Lengyelországban, Bulgáriában, Romániában és Szlovákiában jelentősebb. Néhány fontosabb termesztett fajta: *Cornus mas* 'Őszi Tűz' (magyar), 'Devin' és 'Titus' (szlovák), 'Jolico' (osztrák), 'Bylda' (ukrán). Az USA-ban inkább a *Cornus florida* L. (virágos som) az elterjedtebb, bár főként dísznövényként termesztik.

A húsos somnak meglehetősen kevés kórokozója ismert és azok kártétele sem nevezhető jelentősnek Európában. Amerikában viszont több mint 50 növényi kórokozót írtak már le, amelyek kisebb nagyobb károkat okozhatnak. A szaporítóanyagok kereskedelmével ma már könnyen terjedhetnek a kórokozók, amelyek akár súlyos növényvédelmi problémákat is okozhatnak az európai som populációban és a szaporítóanyag előállításban.

Bársonyoson *Cornus mas* terméseken szokatlan, eddig ismeretlen tüneteken figyeltünk meg. A Növénykórtani Tanszék laboratóriumában vizsgáltuk és határoztuk meg a kórokozót.

Dolgozatomban a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- a tünetek jellemzése;
- a kártétel felmérése a bársonyosi magángyűjteményben;
- a kórokozó jellemzése morfológiai- és tenyészbélyegek alapján;
- a kórokozó azonosítása és jellemzése molekuláris módszerekkel, rokonsági kapcsolatainak feltárása.



1. ábra Húsos som érett termései Bársonyoson (Fotó: Csömör, 2011)

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A som jelentősebb kórokozói

A somfajokat tekintve az USDA (United States Department of Agriculture) adatbázisa több száz gomba nemzetséget és fajt említ, amelyek igen változatos tüneteket és megbetegedéseket okoznak. Csak a *Cornus mas* fajt tekintve is 49 kórokozót sorol fel (Farr és Rossman, 2011). A som Magyarországon leírt és elterjedt kórokozói a lisztharmatot okozó *Erysiphe tortilis* Link., a foltbetegséget okozó *Phyllactinia gutatta* Lév. és a *Septoria cornicola* Desm. (Priszter, 1990).

Az irodalmi áttekintés fejezetben csak azokat a kórokozókat részletezzük, amelyek morfológiájukban, vagy az okozott tünetekben hasonlítanak az általunk megfigyeltekhez.

2.1.1. *Septoria cornicola* Desm. jellemzése

2.1.1.1. Rendszertani besorolása

A *Septoria cornicola* Desm. piknidiumos gomba, amelynek ivaros alakja az *Ascomycota* törzsbe, a *Dothideomycetes* osztályba, a *Capnodiales* rendbe és a *Mycosphaerellaceae* családba tartozik. A kórokozót Kickx 1867-ben írta le (Index Fungorum).

2.1.1.2. Jelentősége

A som szeptóriás betegsége Daughtrey és Hagan (2001) szerint csak kis mértékben rontja a díszítő értéket, vagy hátráltatja a növényt a fejlődésben. Farr (1991) szerint súlyos esetben a megbetegedés levélszáradáshoz vezet. Neely és Nolte (1989) számolt be arról, hogy a *Septoria cornicola* okozza a somfélék augusztusi lombhullását Középnyugat-Amerikában.

2.1.1.3. Elterjedése

Cornus fajok leveleiről több *Septoria* faj károsítását írták már le. Hazánkban a *Septoria cornicola* okoz károkat (Priszter, 1990). Magyarországon *Cornus sanguinea* fajon figyelték meg a *Septoria cornicola* tüneteit június és szeptember között. Hollós (1933) a következő helyeken figyelte meg: Kis-Bükk, Sötétvölgy, Haramia kút környéke, Nagy-Kajdacs. Moesz (1942) *Cornus sanguinea* levelein figyelte meg a budai erdőkben.

2001 tavaszán Olaszországban (Biella Provincia) Garibaldi és mtsai. (2003) figyelték meg először a *Septoria cornicola* kórokozót *Cornus sericea* fajon házikertekben.

2.1.1.4. Gazdanövényköre

A kórokozó gazdanövényei a somfélék (Farr, 1991). A *Cornus* nemzetségből 21 fajról jelezték előfordulását, köztük a *Cornus mas*-ról is (Farr és Rossman, 2011). Illinoisban a kórokozó a legjelentősebb károkat a *Cornus alba* 'Sibirica', *Cornus stolonifera* 'Flaviramea' fajtákon okozza, de más som fajokon (pl. *Cornus florida*) is előfordul (Neely és Nolte, 1989).

2.1.1.5. Tünetei

A leveleken egynemű lilásbordós színű, vagy szegéllyel rendelkező kissé kivilágosodó közepű foltok (**2. ábra**) jelennek meg (**Farr, 1991**).



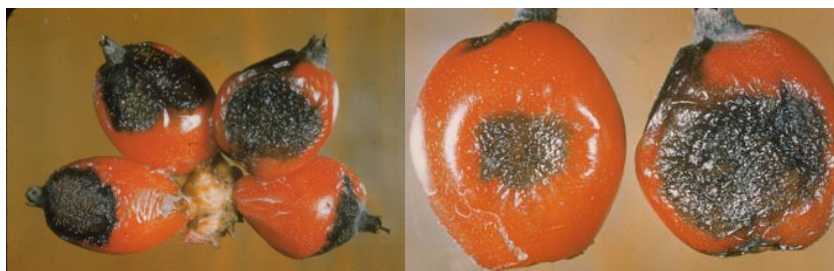
2. ábra: A *Septoria cornicola* tünete *Cornus florida* levelein

(Forrás: www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5368793)

A levélfoltok általában kör alakúak, 2-3 mm átmérőjűek, a levelek színén alakulnak ki. A foltokat, amelyek néha egybefolynak, lilás szegély határolja. A tünetek hasonlítanak a som antraknózis okozta foltokhoz, amelyet a *Discula destructiva* okoz. A *Septoria cornicola* azonban nem okozza a gallyak és az ágak elhalását. (**Neely és Nolte, 1989**).

Hazánkban is gyakran találkozhatunk a gomba okozta levélfoltossággal somfélék esetében. Kezdetben sötétzöld, majd ólomszürke foltokat idéz elő, főként *Cornus sanguinea*-n (**Vörös, 1957**).

A kórokozó megjelenhet a somfélék termésén is. **Neely és Nolte (1989)** szerint a betegség tünete gyakran előbb látható a terméseken, mint a leveleken (**3. ábra**).



3. ábra A *Septoria cornicola* tünete *Cornus florida* termésén

(Forrás: www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1503069)

2.1.1.6. Biológiája

A gomba a növénymaradványokon képes áttelelni. A *Septoria cornicola* apró termőtestjei a levélfoltokban képződnek, majd a konídiumok szeles, esős időben szóródnak szét és fertőznek (**Hansen, 2009**).

2.1.1.7. Morfológiai bélyegei

A kórokozó piknídiumai elszórtan jelennek meg a fertőzött növényi részekben. A közel gömbalakú termőtestek általában a bőrszövet alatt, vagy ritkábban a parenchima szövetekbe ágyazódva képződnek (Neely és Nolte, 1989). A szerzők szerint magasságuk 55-105 μm , átmérőjük 40-95 μm , a termőtest falának vastagsága 10-15 μm .

A konidiogén sejtek indetermináltak, a konídiumok holoblasztikusan képződnek (Neely and Nolte, 1989). Bedlan (2010) megfigyelései alapján a konídiumok hialinok, hosszúkásak, megnyúltak és enyhén görbültek (4. ábra). Neely és Nolte (1989) szerint a konídiumok (1-) 3-5 (-7) szeptummal tagoltak, méretük (20-) 30-50 (65) $\times$ 2-3 μm között változik.



4. ábra A *Septoria cornicola* konídiumai

(Forrás: <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5368794>)

Garibaldi és mtsai. (2003) szerint a konídiumok hialinok, 2-6 harántfallal rendelkeznek, méretük: 22-48 μm (átlagosan 35 μm) $\times$ 2,2-3,6 μm (átlagosan 2,5 μm).

2.1.1.8. Tenyészbélyegei

Garibaldi és mtsai. (2003) fertőzött leveleken képződő piknídiumokból izolálták a kórokozót burgonya dextróz agaron (potato dextrose agar, PDA). Megfigyeléseik szerint a micélium sötét színű, PDA táptalajon lassan növekszik, benne nagy mennyiségben jelennek meg piknídiumok, amelyekben konídiumok képződnek. A konídiumok 2-6 harántfallal rendelkeznek, méretük pedig 22-48 μm (átlagosan 35 μm) $\times$ 2,2-3,6 μm (átlagosan 2,5 μm).

2.1.2. *Discula destructiva* Redlin kórokozó jellemzése

2.1.2.1. Rendszertani besorolása

A *Discula destructiva* acervuluszos gomba, melynek ivaros alakja az *Ascomycota* törzsbe, a *Sordariomycetes* osztályba, a *Sordariomycetidae* alosztályba, a *Diaporthales* rendbe és a *Gnomoniaceae* családba tartozik (Index Fungorum).

A som antraknózisát okozó *Discula destructiva* mindösszesen 20 éve ismert, ekkor írta le a kórokozót Redlin (1991) Észak-Amerikában. A kórokozó rendszertani besorolása nehézségekbe ütközött, hiszen csak Észak-Amerikában fordult elő és ivaros alakját sem találták meg. Tény, hogy számos *Diaporthales* rendbe tartozó gomba ivartalan alakja tartozik a *Discula* nemzetségbe, ebből

adódik az a feltételezést is, hogy a *Discula destructiva* ivaros alakja a *Diaporthales* renden belül keresendő (Zhang és Blackwell, 2001).

2.1.2.2. Jelentősége

A *Discula destructiva* okozta antraknózis a somfélék legsúlyosabb és legjelentősebb betegsége. A fertőzés levél- és hajtásszáradást okoz vagy a növény teljes pusztulásához is vezethet (Hagan és Mullen, 1999).

A kórokozó 2003-2007-ig szerepelt az EPPO figyelmeztető listáján, mint újonnan megjelenő és veszélyes kórokozó Európában (Tantardini és mtsai., 2004).

2.1.2.3. Elterjedése

Zhang és Blackwell (2001) szerint a gombafaj megjelenése Észak-Amerikában 1970-es évekre tehető, amikor váratlanul északnyugaton és északkeleten is megjelent, majd gyorsan terjedt 20 államon keresztül (Daughtrey és Hibben, 1994).

A fertőzést igazolták Észak-Amerika nyugati részéről Washingtonból, Oregonból, Idahóból, Kaliforniából és Brit Kolumbiából. A keleti részen a kórokozót megfigyelték New Yorkban, Massachusettsben, Connecticutban, New Jerseyben, Pennsylvániában, Delawareben, Marylandben, Virginiában, Nyugat-Virginiában, Észak-Karolinában, Dél-Karolinában, Tennesseeben, Kentuckyban, Indiánában, Vermontban, Michiganben, Ohióban, New Hampshireben, Rhode Islandben, Missouriban, Kansasban, és a déli részen Georgiában és Alabamában (Daughtrey és mtsai., 1996) (5. ábra).



5. ábra A *Cornus florida* természetes elterjedése Kelet-Amerikában (szürke), a megyék ahonnan jelentették a *Discula destructiva* fertőzést (piros). (Forrás: Holzmüller és mtsai., 2007)

Európában először 1995-ben jelezték előfordulását. Az Egyesült Királyságba virágos som (*Cornus florida*) szaporítóanyaggal került be, amelyet az USA-ból importáltak. 2002-ben Németországban is megtalálták a kórokozót (Tantardini és mtsai., 2004). Olaszországban, Lombardiában *Cornus florida* és *Cornus nuttallii* fajokról írták le először (Anonymus, 2007).

2.1.2.4. Gazdanövényköre

A betegséget *Cornus florida* és *Cornus nuttallii* növényeken figyelték meg Észak- Nyugat-Amerikában az 1970-es években (**Byther és Davidson, 1979**). **Redlin (1991)** 120 izolátumot gyűjtött és vizsgált *Cornus florida*, *Cornus kousa* és *Cornus nuttalli* fajokról, melyek Észak-Amerika keleti és a nyugati részeiről származtak. **Farr és Rossman (2011)** szerint is a fenti három fajt fertőzi a kórokozó.

Európában *Cornus florida* és *Cornus nuttallii* fajokat fertőzi. A *Cornus kousa* ellenállósággal rendelkezik, míg az Európában őshonos *Cornus mas*-t rezisztensnek tartják. A *Cornus sanguinea*-ról nem áll rendelkezésre adat (**Anonymus, 2007**).

2.1.2.5. Tünetei

Az első tünetek május közepén, végén jelentkeznek levélfoltok formájában. A foltok világosbarnák, amelyeket lila szegély határol (**6. ábra**). Nedves körülmények között ezek a foltok gyorsan növekednek és elpusztítják a levelet. Ezek a hervadó, elhaló levelek fenn maradnak a növényen. A virágok szíromlevelein bordó foltok jelennek meg (**7. ábra**). A kórokozó tovább terjed a fás részekre. A fertőzés következtében a hajtások elhalnak, a gallyak letörnek. Ha eléri a törzset, az egész növény elpusztul (**Hagan és Mullen, 1999**).



6. ábra *Discula destructiva* tünete *Cornus florida* levelén

(Forrás: Robert L. Anderson, USDA Forest Service, www.forestryimages.org)



7. ábra *Discula destructiva* tünete *Cornus florida* szíromlevelein

(Forrás: Robert L. Anderson, USDA Forest Service, www.forestryimages.org)

2.1.2.6. Biológiája

A **Plant Disease Diagnostic Clinic (2001)** állítása szerint a *Discula destructiva* szaporítóképletei a levélfoltokon és a fertőzött fás részekben telelnek át és alakulnak ki, amelyekben

nagy mennyiségben képződnek konídiumok. **Pecknold és mtsai. (2001)** szerint a kiszóródó konídiumok esőcseppekkel vagy öntözéskor a vízcseppekkel jutnak a növényi részekre. A szaporítóképletek nagyobb távolságokra rovarok és madarak segítségével juthatnak el. A fertőzött, kivágott fák szállítása szintén terjeszti a kórokozót, különösen olyan területeken, ahol a som nem őshonos. A gomba miután bejutott a növényi szövetekbe gyors elhalást okoz azáltal, hogy toxinokat termel.

2.1.2.7. Morfológiai bélyegei

Redlin (1991) szerint az acervuluszokban képződő szaporítóképletek elliptikusak és nem szeptáltak (**8. ábra**). **Tantardini és mtsai. (2004)** közlése alapján a konídiogén sejtek a bőrszövet felszínén vagy szubkutikulárisan jönnek létre, barna vagy fekete színűek, gömb alakúak, 40-100 µm átmérőjűek. **Redlin (1991)** szerint a konídiogén sejtek átmérője 150-290 µm között változik. A szerző leírja továbbá, hogy konídiumok színtelenek, elliptikusak vagy hosszúkásak, 5,5-10 µm × 1,5-3 µm nagyságúak. **Tantardini és mtsai. (2004)** szerint gyakran tartalmaznak egy vagy két olajcseppet és méretük 5,5-10 µm × 1,5-3 µm.



8. ábra *Discula* sp. kórokozó konídiumai

(Forrás: http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht_dogwd/ht_dog.htm)

2.1.2.8. Tenyészbélyegei

A gomba lassan növekszik maláta vagy burgonya dextróz agaron. A tenyészetek fehérek, idővel sötétebbé válnak (**9. ábra**). A *Discula* sp. sporulálhat a tenyészetben, de ez izolátumonként eltérhet (**Anonymus, 2011**). **Tantardini és mtsai. (2004)** szerint a kórokozó mindössze 20 mm-t növekszik 10 nap alatt PDA táptalajon. A kórokozó számára az optimális hőmérséklet a micélium növekedéshez 21-24 °C között van, 27 °C-on már nem fejlődik (**Daughtrey és Hibben, 1994**).



9. ábra A *Discula destructiva* tenyésze PDA táptalajon

(Forrás: http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht_dogwd/ht_dog.htm)

2.1.3. *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds jellemzése

2.1.3.1. Rendszertani besorolása

A *Colletotrichum acutatum* acervuluszos gomba, melynek ivaros alakja az *Ascomycota* törzsbe, *Pezizomycotina* altörzsbe, a *Sordariomycetes* osztályba és a *Glomerellaceae* családba tartozik (**Index Fungorum**). **Simmonds (1965)** írta le a kórokozót és határozta meg új fajként, elválasztva a *Colletotrichum gloeosporioides* fajtól. Az ivaros alakját eddig csak laboratóriumi körülmények között figyelték meg és írták le *Glomerella acutata* Guerber & J.C. Corell néven **Guerber és Correl (2001)**.

2.1.3.2. Jelentősége

Bailey és Jeger (1992) szerint a kórokozó jelentős termés kiesést okoz a trópusi, szubtrópusi és kontinentális területeken egyaránt. A legsúlyosabb kártételt a gomba akkor okozza, amikor a terméseket betegíti meg. A kórokozó igen kiterjedt gazdanövénykörrel rendelkezik, azonban a legsúlyosabb károkat szamóca esetében okozza, amelynek szaporítóanyagán karantén kórokozónak minősül (**EPPO/CABI, 1997; EPPO, 2004**). Az elmúlt években hazánkban ismét járványszerűen jelentkezett a meggyantraknózis az ország számos részén, súlyos károkat okozva a termesztőknek. A járványért **Tóth és mtsai. (2011)** a *Colletotrichum acutatum*-ot tartják felelősnek.

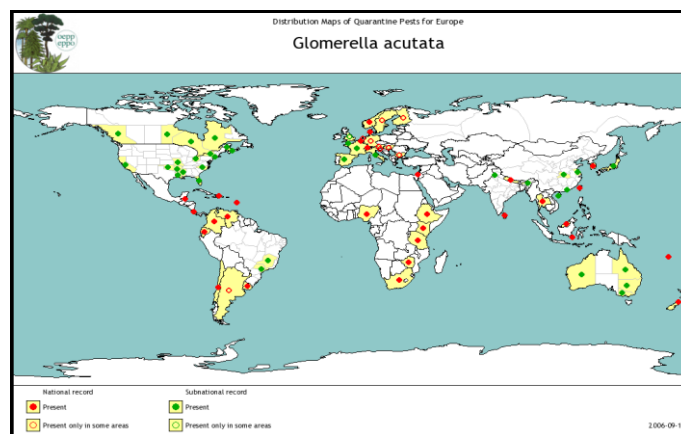
2.1.3.3. Elterjedése

A *Colletotrichum acutatum* az egész világon igen elterjedt. Előfordul Európában, Ázsiában, Afrikában, Észak-, Közép-, és Dél-Amerikában, Ausztráliában (**10. ábra**). Az EPPO régió belül megbetegedéseket okoz Belgiumban, Franciaországban, Olaszországban, Hollandiában, Portugáliában, Spanyolországban és Angliában (**EPPO/CABI, 1997; EPPO, 2004**). Norvégiában a kórokozót **Børve és Stensvand (2006)** izolálta cseresznyéről és meggyről. Első magyarországi előfordulásáról szamócán **Irinyi és Kövics (2008)** számolt be.

2.1.3.4. Gazdanövényköre

Gazdanövényei közé tartoznak a következő fajok: koronás szellőrózsa, padlizsán, avokádó, kamélia fajok, paprika, zeller, kávé, olíva, papaya, egyes fenyőfélék, paradicsom, szamóca (**EPPO/CABI, 1997; EPPO, 2004**). A gomba megbetegedést okoz továbbá mandulán, őszibarackon, áfonyaféléken, citrusféléken, almán, fügén, szőlőn, kivin, körtén, paprikán, tökféléken (**Lardner és mtsai., 1999**). A kórokozó felelős a cseresznye és a meggy esetében az antraknózisért (**Børve és Stensvand, 2006**).

A somfélék közül csak *Cornus florida* terméséről írta le **Smith (1993)**.



10. ábra A *Colletotrichum acutatum* földrajzi elterjedése

(Forrás: http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Colletotrichum_acutatum/COLLAC_map.htm)

2.1.3.5. Tünetei

A *Colletotrichum acutatum* a legtöbb növényi részt meg tudja betegíteni. Változatos tüneteket okoz, a gyökerek rothadásától kezdve, a levélhulláson, hajtás- és virágelhaláson át, a gyümölcsrothadásig (**Wharton és Uribeondo, 2004**).

1991 és 1992 között számos tünetet (levélfoltosságot, lombhullást, ág és vesszőpusztulást és a virágzó fák pusztulását) figyeltek meg *Cornus florida* növényeken észak és közép-floridai faiskolákban. A virágbimbók nem nyíltak ki, sok fa elpusztult vagy meg kellett semmisíteni az elhalt ágak és a deformált törzsek miatt (**Strandberg és Chellemi, 2002**). **Chellemi és mtsai. (1993)** vizsgálták a levélfoltokat és a hajtáselhalást. Ők izolálták és azonosították a kórokozót, amely a megbetegedést okozta: a *Colletotrichum acutatum*-ot. A gomba a mai napig jelentős károkat okoz a floridai faiskolákban (**Strandberg, 2001**). A betegség tünetei meglepően hasonlítanak a som antraknózisához, amelyet a *Discula destructiva* okoz (**Redlin, 1991**).

Smith (1993) számolt be arról, hogy az erdőkben és a tájépítészetben alkalmazott *Cornus florida* fák gyümölcsei gyakran fertőzöttek a *Colletotrichum acutatum* kórokozóval, amely szabálytalan, fekete elváltozásokat okoz a gyümölcs kocsányánál. Két évvel később **Britton és Redlin (1995)** megfigyelték természetben gyűjtött som magok nevelése során, hogy a *Colletotrichum acutatum* okozza a som csíranövények palántadőlését és a magról kelt növények pusztulását.

2.1.3.6. Biológiája

Nincs bizonyíték arra, hogy a kórokozó ivaros alakjának jelentősége lenne a kórokozó biológiájában (**Peres és mtsai., 2005**). Fő fertőzési forrásként említi **DeMarsay és Oudemans (2002)** a rügyeket, ahol a kórokozó micéliummal telel. **Børve és Stensvand (2006)** megállapították, hogy *Colletotrichum acutatum* a cseresznye rügyeiben is telel. A tenyészidőszak során az elsődleges konídium képzés az acervuluszokban történik, bár a kórokozó képes az élő levelek

felületén másodlagos konídiumképzésre is (**Leandro és mtsai., 2001**). **Børve és Stensvand (2010)** megfigyelték, hogy a cseresznye levelein tüneteket nem okozva szaporodik a kórokozó a vegetáció során és ez potenciális fertőzési forrás lehet. További fertőzési forrásként említik a szerzők meggy esetében a fertőzött gyümölcsöket és a gyümölcsök kocsányát.

A kórokozó az érőfélben lévő, vagy érett terméseket betegíti meg, azonban már a zöld gyümölcsökön is jelen van tünetmentesen (**Børve és Stensvand, 2010**). A fertőzött részeken nagy mennyiségű konídium képződik, amelyek vízzel terjednek (**Fitzell és Peak, 1984**).

2.1.3.7. Morfológiai bélyegei

A kórokozó ivaros alakját (*Glomerella acutata*) **Guerber és Correl (2001)** azonosította *in vitro*. A fertőzőképes peritéciumok önmeddő, egykonídiumos törzsek keresztezése után jöttek létre. A peritéciumok a szerzők szerint feketésbarnák, leggyakrabban köcsög alakúak, átmérőjük $125 \times 312 \mu\text{m}$ (átlagosan $183 \mu\text{m}$), szájnnyílással és perifízisekkel rendelkeznek. Az aszkuszokban általában nyolc, hosszúkas, ellipszoid alakú aszkospóra képződik, amelyeknek mérete: $8,5\text{--}(15,7)\text{--}25,1 \times 3,1\text{--}(5,8)\text{--}8,1 \mu\text{m}$. Később **Guerber és mtsai. (2003)** számos gazdanövényről származó izolátum esetében megfigyelték érett, fertőzőképes peritéciumok létrejöttét *in vitro*.

A fertőzött növényi részeken bőségesen képződik az ivartalan alak képlete. Az acervulusokban igen bőséges a konídium képzés, amely lazac színű masszaként jelenik meg. Az acervulusok kb. $0,5 \text{ mm}$ átmérőjűek, bennük széták csak igen ritkán képződnek. Ha mégis képződik szeta, akkor barna színű, egyenes vagy enyhén csavarodott lefutású, mérete $46\text{--}85 \times 3\text{--}4 \mu\text{m}$ (**EPPO, 2004**). A konídiumok egysejtűek hialinok, méretük $8\text{--}20 \times 2,5\text{--}5 \mu\text{m}$, alakjukat tekintve hosszúkasak, vagy orsó alakúak. A fajt konídiumai alapján, úgy lehet megkülönböztetni a többi *Colletotrichum* fajtól, hogy a konídiumok egyik vagy mindkét vége inkább kihegyesedő, mint lekerekített (**Simmonds, 1965**). **Wharton és Uribeondo (2004)** szerint azonban a két faj nehezen különböztethető meg egymástól a klasszikus taxonómiai bélyegek alapján.

2.1.3.8. Tenyészbélyegei

Burgonya dextróz agaron a tenyészetek színe a barnássárgától a krémszínig, vagy a halványszürkétől a sárgásbarnaig változik, de soha nem sötét színű. Később világos rózsaszínű vagy narancs-rózsaszínű pigmentképződés figyelhető meg benne. A tenyészetekben konídiumok képződnek, melyek elliptikusak és kissé megnyúltak, végeik elvékonyodóak. Átlagosan 18%-ban a végek kissé íveltek, viszont egyiknél sem fordul elő, hogy a végek egyszerre íveltek és lekerekítettek. A tenyészetben fejlődő konídiumok $15,3 \times 4,78 \mu\text{m}$ nagyságúak, hosszúságuk és szélességük aránya 3,20 (**Walker és mtsai., 1991; Sutton, 1992**).

Zulfiquar és mtsai. (1996) szerint a kórokozó táptalajon képződött tiszta tenyészetek kezdetben általában fehér, majd később a felületét rózsaszínes vagy narancssárga konídium massa borítja be (**11. ábra**).



11. ábra A *Colletotrichum acutatum* tenyészetek PDA táptalajon [Forrás: **Than és mtsai. (2008)**]

A kórokozó számára a növekedéséhez szükséges optimális hőmérséklet 25 °C. A tenyészetek szürkés színűek, ritkán rózsaszínesek (**EPPO, 2004**). A **Mycobank (www.mycobank.org)** leírása szerint a tenyészetek kezdetben fehérek, majd halvány narancssárgások, végül szürkék, vagy feketések lesznek. Felületükön légmicélium képződés és konídium képződés figyelhető meg.

2.2. A fonalas gombák molekuláris vizsgálata és azonosítása

A fonalas gombák molekuláris jellemzéséhez elsősorban a riboszomális RNS-eket kódoló DNS-en elhelyezkedő ITS (internal transcribed spacer) régiókat vizsgálják, ill. az ezt követő 28S rDNS-t. Ez a régió tartalmazza sorrendben a 18S rDNS-t, az ITS1-et, a 3,5S rDNS-t, az ITS2-t és a 28S rDNS-t (**White és mtsai., 1990**). Az ITS régió meglehetősen konzervált szakasza a genomnak, ezért alkalmas univerzális primerek tervezésére és használatára, amelyek lehetővé teszik PCR segítségével ennek a régiónak, vagy a régió egy részének megsokszorozását (**White és mtsai., 1990; O'Donnell, 1993**). A viszonylagos állandóság mellett azonban ez a régió alkalmas az egyes fajok elkülönítésére is a legtöbb esetben, így erről a régióról található a legtöbb szekvencia adat a nemzetközi adatbázisokban. A primerek használata során szerzett tapasztalatok alapján később újabb primerpárokat terveztek a régió kiemelésére, melyek sokkal hatékonyabban működtek, önmagukkal és egymás között nem alakítanak ki másodlagos szerkezeteket (**Bertini és mtsai., 1999**).

A *Colletotrichum* fajok ITS régiójának vizsgálatára is alkalmasak ezek az univerzális primerek. A különböző fajok jól elkülöníthetők egymástól, de az elkülönítés csak a nukleotid szekvencia meghatározása után lehetséges, mely költséges eljárás. Ezért a fajok elkülönítésére az univerzális primerek mellett fajspecifikus primereket terveztek *Colletotrichum acutatum* esetében is (**Brown és mtsai., 1996**).

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgálat helye és ideje

A somterméseket Bársonyoson gyűjtöttük Szamák Zsófia magángyűjteményében 2011. szeptember 8-án. A kórokozó azonosítását, valamint a patogenitási teszteket a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük. A rekombináns plazmidokat szekvencia meghatározásra, Szegedre BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetbe küldtük.

3.2. A vizsgálat anyaga

3.2.1. Növények

A magángyűjtemény 37 db nagytermésű *Cornus mas* L. változattól áll. A növényeket 1999-ben magvetéssel telepítették. A magok Csallóközi tájfajtaiktól származnak.

Az izolátumok patogenitásának ellenőrzéséhez *Cornus mas* terméseket használtunk, amelyek érettsége 75%-os volt.

3.2.2. Táptalaj

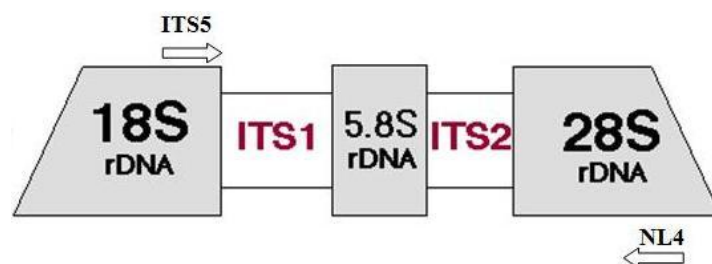
A kórokozó izolálásához, tenyésztéséhez és fenntartásához burgonya-dextróz agar (PDA, Reanal) táptalajt (39,00 g PDA, 1000,00 ml végtérfogatra desztillált vízzel kiegészítve) használtunk.

3.2.3. Indítószekvenciák

A molekuláris vizsgálatok során univerzális primereket használtunk a PCR reakcióhoz, melyek a 18S rRNS gén egy részét, az ITS1 régiót, az 5,8S rRNS gént, az ITS2 régiót és a 28S rRNS gén egy részét sokszorozzák meg (**12. ábra**).

forward primer: **ITS5** (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (**White és mtsai., 1990**)

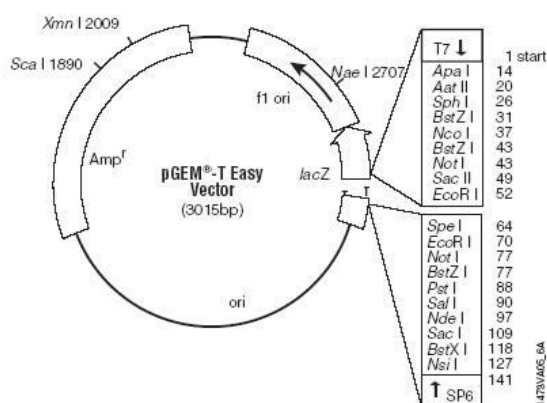
reverse primer: **NL4** (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (**O'Donnell, 1993**)



12. ábra A riboszomális RNS-eket kódoló szakasz részlete a primerek elhelyezkedésével és orientációjával

3.2.4. Plazmid és baktérium törzs klónozáshoz

A PCR-terméket pGEM-T Easy plazmidba (Promega) ligáltuk (**13. ábra**), majd az *Escherichia coli* baktérium JM109 törzsébe transzformáltuk.



13. ábra A pGEM-T Easy vektor felépítése

(Forrás: <http://biotektanaman.wordpress.com/2009/06/24/map-vektor-pgem-t-easy/>)

3.2.5. Enzimek, kitek

A PCR-hez (rekombináns) Taq DNS polimeráz enzimet használtunk (5 u/μl), valamint az enzim saját pufferét: 10x-es Taq puffer +KCl – MgCl₂ (pH: 8,8 25 °C-on). A ligáláshoz T4 DNS ligáz enzimet (5 u/μl) használtunk; puffere: 10x-es T4 DNS ligáz puffer pH: 7,8 25 °C-on. A rekombináns plazmidot tartalmazó baktérium kolóniák kék-fehér szín szelekciójához IPTG-t (100 mM, 10 μl) és Xgal-t (20 mg/ml, 40 μl) szélesztettünk a táptalajon. Az inzertet a plazmidból FD *EcoRI* (10 u/μl) restrikciós endonukleázzal vágtuk ki. Az enzim puffere: 10x-es FD *EcoRI* puffer pH: 7,5 37 °C-on. Az enzimeket a Fermentas cégtől vásároltuk.

A PCR-terméket High Pure PCR Product Purification Kittel (Roche) tisztítottuk. A szekvencia meghatározáshoz Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-tel (BIO RAD) tisztítottuk a rekombináns plazmidot.

3.2.6. Eszközök

Az általános laboratóriumi fém-, műanyag- és üvegeszközök mellett a klasszikus diagnosztikai vizsgálatainkhoz az alábbi anyagokat és eszközöket használtuk:

- Zeiss – SM XX. sztereomikroszkóppal vizsgáltuk a beteg növényrészeket;
- Nikon Eclipse 50i citoplaszt mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a konídiumokat. A mikroszkópos felvételeket QImaging MicroPublisher 5.0 RTV kamerával készítettük. A konídiumok méreteit QCapture Pro program segítségével mértük meg.

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz Applied Biosystem 9700 típusú PCR-készüléket használunk. A PCR-termék és a rekombináns plazmid koncentrációját NanoDrop 2000C készülékkel ellenőriztük.

3.3. A vizsgálat módszere

3.3.1. A kártétel felmérése és a növényi részek gyűjtése, tárolása

A mintavételezés előtt értékeltük 100 termés fertőzöttségének mértékét. A terméseket 6 betegség kategóriába soroltuk a tünetek súlyossága alapján.

Kategória	Megbetegedés mértéke %
0	Tünet nem látható
1	1-20 %-os fertőzöttség
2	21-40 %-os fertőzöttség
3	41-60 %-os fertőzöttség
4	61-80 %-os fertőzöttség
5	81-100 %-os fertőzöttség

A Townsend-Heuberger (**Gartner, 1971**) betegségfokot az alábbi képlet segítségével számítottuk ki:

$$P = [\sum(n \times v) / Z \times N] \times 100$$

P – betegségfok

n – a növényrészek száma kategóriánként

v – kategória érték (6)

Z – a legmagasabb kategória

N – a vizsgált összes növényrész száma

A fertőzött termésekből mintát vettünk, feliratozott papírzacskóba gyűjtöttük és a vizsgálatokig hűtőszekrényben, 4 °C-on tároltuk.

3.3.2. A kórokozó izolálása táptalajon és a tenyészetek fenntartása

A kórokozó acervulusaiban képződött konídiumait steril lándzsátű segítségével emeltük le és steril PDA táptalajra helyeztük. A tenyészeteket 24 °C-on termosztátban, sötétben inkubáltuk. A növekedésnek indult tenyészetek széléről egy hét elteltével 5 mm keresztmetszetű steril dugófúróval készített, micéliummal átszőtt táptalaj korongokat helyeztünk újra steril táptalajra. Az így kapott tiszta tenyészeteket használtuk fel a morfológiai jellemzéshez, a patogenitási teszthez, valamint a molekuláris vizsgálatához.

3.3.3. A morfológiai és tenyészbélyegek megállapítása és értékelése

A fertőzött termések felületéről, ahol a kórokozó szaporítóképletei megjelentek, lándzsatűvel emeltük le a konídiumokat, és citoplaszt mikroszkóp segítségével 100 konídium hosszúságát és átmérőjét mértük meg. Ezt követően Excel program segítségével kiszámoltuk az átlagot, valamint a minimum és a maximum értékeket.

A tenyészbélyegek leírása során vizsgáltuk a tenyészetek színét, a tenyészet alakját és szélét, mintázottságát. A tenyészetet 24 °C-os termosztátban, sötétben tároltuk a vizsgálat végéig. Amikor a gomba tisztatenyésze benőtte a 85 mm-es Petri-csészét, kiszámítottuk a tenyészet átlagos növekedését (mm/24h).

3.3.4. Patogenitási teszt

A patogenitás tesztet 6-6 felületileg fertőtlenített somtermésen végeztük. A terméseket 70 %-os etanolba mártottuk, majd steril vízzel öblítettük őket. Hat termés epidermiszén steril lándzsa tűvel „V” alakú sebést ejtettünk. Hét napos növekvő tiszta tenyészet széléből micéliummal átszőtt táptalaj korongot helyeztünk a sebzésbe. Hat termésen közvetlenül a növény epidermiszére helyeztük a micéliummal átszőtt táptalajkorongokat. A kontroll termések esetében a bőrszöveten sebést ejtettünk, amelybe steril táptalajkorongot helyeztünk. Nagy, csíráztató üvegedényekbe steril üveggolyókra helyeztük a terméseket, amelyek alá steril vizet öntöttünk (**14. ábra**). A tüneteket 9 nap inkubáció után értékeltük.



14. ábra: A somtermések inokulálása a patogenitási teszt során (Fotó: Petrőczy, 2011)

3.3.5. Molekuláris biológiai vizsgálatok

3.3.5.1. Össznukleinsav kivonás CTAB módszerrel

Hét napos tiszta tenyészeteket használtunk az össznukleinsav kivonásához. A gomba tenyészetét leemeltük a táptalajról és a dörzscsészében kvarchomok segítségével eldörzsöltük, majd 600 µl CTAB puffer (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl pH: 8, 0,2 % 2-EM) hozzáadása után tovább dörzsöltük. Az elegyet Eppendorf csövekbe töltöttük és 45 percig 65 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk. A nukleinsav tisztítására és a fehérjék eltávolítására 600 µl izoamil-alkoholos kloroformot (1:24 arányú) mértünk a pufferhez. Az elegyet összeráztuk (vortex),

majd 10 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót tiszta Eppendorfba pipettáztuk, majd még egyszer megismételtük ezt a lépést. A centrifugálást követően 600 µl izopropanollal csaptuk ki a nukleinsavat, majd újabb centrifugálás után a pelletet 1ml 70 %-os etanollal mostuk. A következő centrifugálás után a pelletet beszárítottuk, majd az RNS-ek elbontása érdekében 30 µl 10 µg/ml RNase-t tartalmazó TE-oldatban szuszpendáltuk **(Maniatis és mtsai., 1989)**.

3.3.5.2. PCR (Polimeráz-láncreakció)

A PCR a következő részekből tevődött össze: a két komplementer DNS szál elsődleges szétválása 94 °C-on ment végbe 3 percig. A 30 ciklus során szintén 94 °C-on történt a denaturáció 30 s-ig, az indítószekvenciák 55 °C-on kapcsolódtak 1 percen át, majd a lánchosszabbítás következett 72 °C-on, amely 90 másodpercig tartott. A ciklusok után az elmaradt szálak befejezése 72 °C-on 10 percig zajlott, majd a kész PCR-terméket 4 °C-on tárolta a készülék.

A vizsgálathoz a következőket mértük össze 50 µl térfogatra:

- 3 µl DNS
- 5 µl 10x Taq puffer (+KCl – MgCl₂)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2 µl 5 mM dNTPs (nukleotidok: A, G, C, T)
- 1 µl ITS5primer (20 pmol)
- 1 µl NL4 primer (20 pmol)
- 0,5 µl Taq polimeráz enzim (5 u/µl)
- 34,5 µl steril víz

3.3.5.3. A PCR-termékek ellenőrzése és tisztítása

GelRed tartalmú 1%-os agaróz gélben futtattunk 5 µl PCR-terméket, 3 µl festéket, valamint 3 µl steril vizet. A PCR-termék méretét 1kb marker mellett ellenőriztük.

A PCR-terméket a High Pure PCR Product Purification Kit-tel a gyártó utasításait követve tisztítottuk. A PCR csőben lévő elegyhez hozzáadunk 250 µl nukleinsav kötő puffert (Binding Buffer). Ezután alaposan összeforgattuk. Egy gyűjtőcsőbe szűrőt helyeztünk, amelybe átpipettáztuk az elegyet, majd 60 másodpercig, szobahőmérsékleten, maximális sebességgel centrifugáltuk. Kiöntöttük az összegyűlt folyadékot, majd visszahelyeztük a szűrőt. A PCR-terméket először 500 µl, majd 200 µl etanos mosó pufferrel (Wash Buffer) tisztítottuk, 1 percig maximális sebességen centrifugálva. Ezt követően a szűrőt tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe tettük át. A PCR-termék szuszpendálására 40 µl elúciós puffert (Elution Buffer) adtunk hozzá, majd 1 percig centrifugáltuk.

3.3.5.4. Ligálás

A tisztított PCR-terméket pGEM-T Easy vektorba ligáltuk. A ligáláshoz 10 µl végtérfogatra a következőket mértük össze, amit szobahőmérsékleten egész éjszakán át ligáltunk:

- 4,5 µl steril víz
- 1 µl puffer (T4 DNS ligáz 100x-es puffer)
- 1 µl vektor
- 3 µl inzert (tisztított PCR-termék)
- 0,5 µl enzim (T4 DNS ligáz enzim).

3.3.5.5. Transzformálás *Echerichia coli* JM109 törzsébe

A -70 °C-on tárolt kompetens sejtet jégen kiolvasztottuk, majd a ligátumot is jégre tettük. A felolvadt kompetens sejtet hozzámértük a ligátumhoz, 30 percig hagytuk jégen állni, majd egy percig 42 °C-on tartottuk, hogy átjárhatóvá váljon az *E. coli* baktérium sejtfala és membránja és a plazmid bejuthasson. Ezután azonnal jégre tettük és öt percig ott tartottuk. Ezt követően hozzámértünk 500 µl antibiotikum-mentes 2TY folyékony táptalajt, és ezzel összeforgattuk. Egy órán át 37 °C-on rázattuk. Ezalatt ampicillin tartalmú LB szilárd táptalajra 10 µl IPTG-t (10 mM/ml) és 40 µl XGAL-t (10 mg/ml) szélesztettünk, és megvártuk, míg megszárad. A rázatás után az előkészített táptalajra 100 µl ill. 50 µl -t szélesztettünk a már felszaporodott baktérium tenyészetből. Száradás után a lemezeket 37 °C-ra termosztátba helyeztük és egy éjszakán át növesztettük a kolóniákat.

3.3.5.6. Minipreparátum

Nyolc egyedi fehér kolóniából 2–2 ml folyadékkultúrába (ampicillines LB) inokuláltuk, és 37 °C-on éjszaka rázattuk. A baktériumkultúrával töltött Eppendorf csövet 3 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. A felülúszót leöntöttük, és a pellethez hozzáadtunk 200 µl „A” oldatot (15 mM TRIS-HCl pH: 8, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz), Vortex segítségével összekevertük, majd öt percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Aztán hozzámértünk 400 µl „B” oldatot (0,2 M NaOH, 1% SDS), összeforgattuk, majd 300 µl „C” oldatot (60 ml 5 M Na-acetát, 11,5 ml ecetsav, 28,5 ml steril desztillált víz) és ezzel is összeforgattuk, öt percre jégre helyeztük, ezt követően öt percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf csőbe töltöttük, így öt percig centrifugáltuk, majd a felülúszót ismét új Eppendorf csőbe töltöttük, és hozzáadtunk 600 µl izopropanolt, ezzel összeforgattuk és 5 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. Leöntöttük 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 10 percig hagytuk szobahőmérsékleten állni, majd Vortex segítségével kevertük, végül 400 µl etanollal 5 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és a

pelletet beszárítottuk 30 perc alatt. Utolsó lépésként a pelletet visszaoldottuk 50 µl RNase TE-ben (1 ml 10x TE, 9 ml steril H₂O, 10 µl RNase (10mg/ml)).

A Minipreparátum módszerrel tisztított rekombináns klónok plazmidjaiból *EcoRI* enzimmel ellenőriztük a PCR-termék beépülését, amelyhez 3 µl plazmidot (0,5 µg), 1 µl 10x FD *EcoRI* puffert, 0,5 µl FD *EcoRI* enzimet (10 u/µl) és 5,5 µl steril desztillált vizet mértük össze 10 µl végtérfogatra. Az Eppendorf-csőveket 10 percen át 37 °C-on inkubáltuk termosztátban. A mintákat 1% agaróz gélben megfuttattuk, és 1kb marker mellett ellenőriztük a megfelelő hosszúságú inzert kivágódását.

3.3.5.7. A plazmid tisztítása szekvencia meghatározáshoz

A kiválasztott klónt 2 x 2 ml folyadékkultúrában (ampicillines LB) újra felszaporítottuk (37 °C egész éjszakás rázatás). A baktériumkultúrával töltött Eppendorf csövet 3 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel (BIO-RAD) tisztítottuk a plazmidot. A pellethez hozzáadtunk 200 µl puffer oldatot, majd addig vortexeltük, amíg teljesen vissza nem oldódott. 250 µl lízis oldatot adtunk hozzá, amellyel kézzel összeforgattuk. Hozzáadtunk 250 µl neutralizáló folyadékot. Ismét összeforgattuk, majd 5 perc jégen állást követően 5 percig centrifugáltuk. 2 ml-es gyűjtőcsőbe belehelyeztük a szűrőt. Összeráztuk a mátrix oldatot, míg egynemű nem lett. A centrifugálást követően a felülúszót átöntöttük a filterbe és hozzáadtunk 200 µl mátrixot, amellyel alaposan összeszuszpendáltuk. A csövet 30 másodpercig centrifugáltuk. Elöntöttük a gyűjtőcső alján lévő folyadékot, majd kétszer tisztítottuk 500 µl mosó puffer hozzáadásával és 30 másodperc centrifugálással. A szűrőt ezután egy tiszta 1,5 ml Eppendorf csőbe helyeztük, hozzámérünk 30 µl steril vizet és 1 percig centrifugáltuk.

Szekvencia meghatározásra 12 µl (150 ng/µl) tisztított rekombináns plazmidot küldtünk Szegedre BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetbe.

3.3.5.8. Nukleotid szekvencia meghatározása és analízise

A klónozott szakasz szekvenciáját ABI 3500 (Applied Biosystems) típusú szekvenáló automatával, és ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kittel határoztattuk meg, M13 reverse és M13-20 forward primerekkel. A szekvencia azonosításához az EMBL/GeneBank adatbázist illetve annak BLAST programját használtuk fel. A szekvenciák összehasonlításához a GCG szekvenciaanalizáló programcsomagot használtuk (University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), sequence analysis software package version 9.1), amelyből a PILEUP programot alkalmaztuk. Az összehasonlítás során ezen kívül a Boxshade 3.21 programot használtuk fel (www.ch.embnet.org/software/BOKSZ_form.html). A filogenetikai törzsfák megrajzolását és a megbízhatóság becslésére szolgáló bootstrap analízist a CLC Sequence Viewer 6.5.3. szoftverrel végeztük.

Az NCBI adatbankból a következő hivatkozási számokon található és gazdanövényekről származó *Colletotrichum acutatum* izolátumok szekvenciáit hasonlítottuk össze:

AJ301925 azonosítási számú, *Syringa vulgaris*

AJ301952 azonosítási számú, *Salix* sp.

AJ301972 azonosítási számú, *Sambucus* sp.

AJ301963 azonosítási számú, *Solanum lycopersicum*

AJ301956 azonosítási számú, *Hepatica acutiloba*

AJ301936 azonosítási számú, *Bergenia* sp.

AJ301917 azonosítási számú, *Prunus cerasus*

AJ301914 azonosítási számú, *Fragaria* sp.

AJ301906 azonosítási számú, *Primula florindae*

FR716517 azonosítási számú, *Prunus cerasus*

FR716518 azonosítási számú, *Prunus cerasus*

AJ301987 azonosítási számú, *Camelia* sp.

AJ301983 azonosítási számú, *Juglans regia*

AJ301971 azonosítási számú, *Prunus cerasus* fajról származó izolátum.

4. Eredmények

4.1. Tünetek

A tünetek az érőfélben lévő somterméseken jelentek meg. Gyakran a kocsány felőli részen alakultak ki először, majd onnan terjedtek tovább (**15. ábra**). A termések felületén fénytelen, barna, szabálytalan alakú foltok jelentek meg, melyek gyorsan növekedtek.



15. ábra: Kezdeti tünetek húsos som termésén (Fotó: Csömör, 2011)

A foltok később besüppedtek. A foltokban elszórtan fekete termőtestek jelentek meg (**16. ábra**). A foltokban esetenként sűrű, ragacsos, narancssárga színű konídium massa jelent meg.



16. ábra: Acervuluszok a rothadó terméseken (Fotó: Petróczy, 2011)

A fertőzött termések végül összeaszalódtak, összeszáradtak (**17. ábra**). Egy részük a bokrokon maradt, többségük a földre hullott.



17. ábra: Gyümölcsmúmia (Fotó: Csömör, 2011)

4.2. A megbetegedés mértékének felmérése Bársonyoson

A 37 fából három egyeden (5., 6., 7. fa) figyeltük meg a gomba okozta termésrothadást. Az ötödik fán a terméskárok mellett a fás részeken is megfigyeltünk elhalást.

A felvételezés alapján a termések 65 %-án jelent meg tünet. A betegségfok értéke: 51,8 (**1. táblázat**).

1. táblázat: A fertőzött termések száma betegségkategóriánként

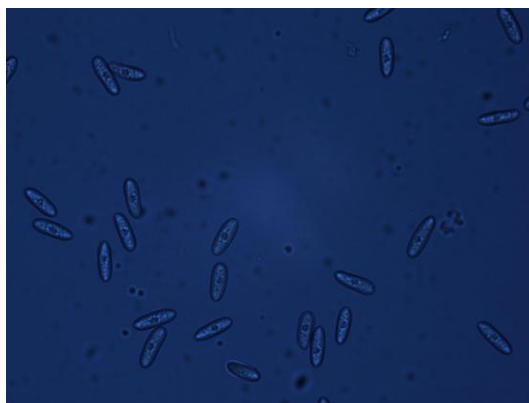
Kategória	Fertőzött termések (db)
0	35
1	10
2	3
3	4
4	0
5	48

4.3. Morfológiai és tenyészbélyegek

4.3.1. Morfológiai bélyegek

A fertőzött termések felszínén fekete színű acervuluszok képződtek. Az acervuluszokban szétákat nem figyeltünk meg. A szaporítóképletekben képződő konídiumok nagy tömegben narancssárgás színűek voltak.

A konídiumok egysejtűek, hialinok, végük lekerekített. A konídiumok jellegzetesen egy vagy ritkán kettő olajcseppet tartalmaztak (**18. ábra**). A bársonyosi mintából származó konídiumok hosszúsága 16,94 – 29,07 μm (átlagosan 23,08 μm), átmérőjük 5,25 – 11,33 μm (átlagosan 8,05 μm).



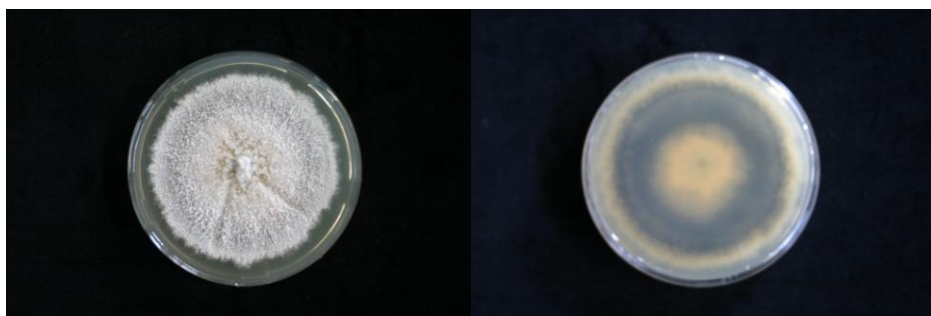
18. ábra: A húsos som antraknózisát okozó gomba konídiumai 600-szoros nagyításon (Fotó: Csömör, 2011)

4.3.2. Tenyészbélyegek

A fiatal (5-7 napos) tenyészetek színe egységes rózsaszínes vagy púder színű. A tenyészetek széle csaknem ép.

A gomba 13 napos tiszta tenyésze PDA táptalajon szabályos kör alakú, a táptalajból enyhén kiemelkedő. A tenyészet alapszíne púder színű, amely a leoltási pont körüli 3-4 cm átmérőjű zónában és a tenyészet szélén látható. A köztes részben egy sötétebb barnásszürke gyűrű látható. A tenyészet felszínén fehér színű, egyöntetű, gyapjas légmicélium képződik **(19. ábra)**. A légmicélium felszíne később enyhén megszürkül és a tenyészetek felszínén konídiumképzés figyelhető meg. A kórokozó gyorsan növekszik PDA táptalajon. A tenyészetek átlagos növekedése 6,07 mm naponta.

Az idősebb tenyészetekben eltűnik a fiatalabb tenyészetekre jellemző világos szín, a fonáki részük sötétté, földszínűvé válik. 3-4 hetes tenyészetekben elszórtan fekete micélium-tömörülések jelennek meg.



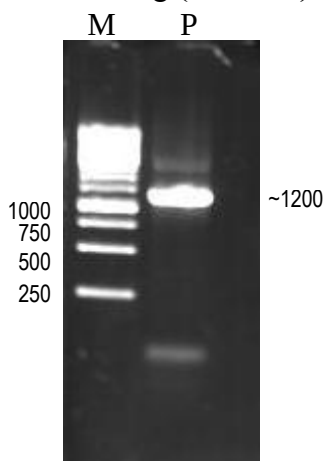
19. ábra: A húsos som antraknózisát okozó gomba 13 napos tiszta tenyésze PDA táptalajon (Fotó: Csömör, 2011)

4.4. Patogenitási vizsgálat

Az inokulált terméseken 6-7 nap elteltével jelentek meg a tünetek. A gyümölcsök rothadni kezdtek, felületükön narancsos színű konídium massa, ill. helyenként fehér színű, gyér micélium is megjelent. A kórokozót sikerült újraizolálni a megfertőzött termésekből, így a Koch posztulátumokat követve bizonyítottuk a kórokozó patogenitását. Bár azok a termések, amelyeknél az ép bőrszövetre helyeztük a kórokozó micéliumát, helyenként felrepedtek a magas páratartalom következtében, mégis egyértelműen megállapítható, hogy a kórokozó sebzés nélkül is képes megfertőzni a gyümölcsöket. A kontroll gyümölcsökön az értékelés napjáig nem jelentkeztek a kórokozó tünetei.

4.5. Az izolátumok azonosítása és molekuláris jellemzése

A polimeráz láncreakció során az ITS5 és NL4 univerzális primerek egy közel 1200 bázispár hosszúságú szakaszt sokszoroztak meg (20. ábra).



20. ábra: Az ITS5 és NL4 primerek által kiemelt kb. 1200 bázispár hosszúságú szakasz
(Jelmagyarázat: M-DNS méretmarker, P-PCR-termék)

A szekvencia meghatározás után a nukleinsav sorrendet összehasonlítottuk a nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal és kétséget kizáróan megállapítottuk, hogy az izolált kórokozó *Colletotrichum acutatum*, amely az adatbázisban (EMBL/DDBJ/PDB) található *Colletotrichum acutatum* izolátumokkal 99,304 - 99,739 %-os hasonlóságot mutatott.

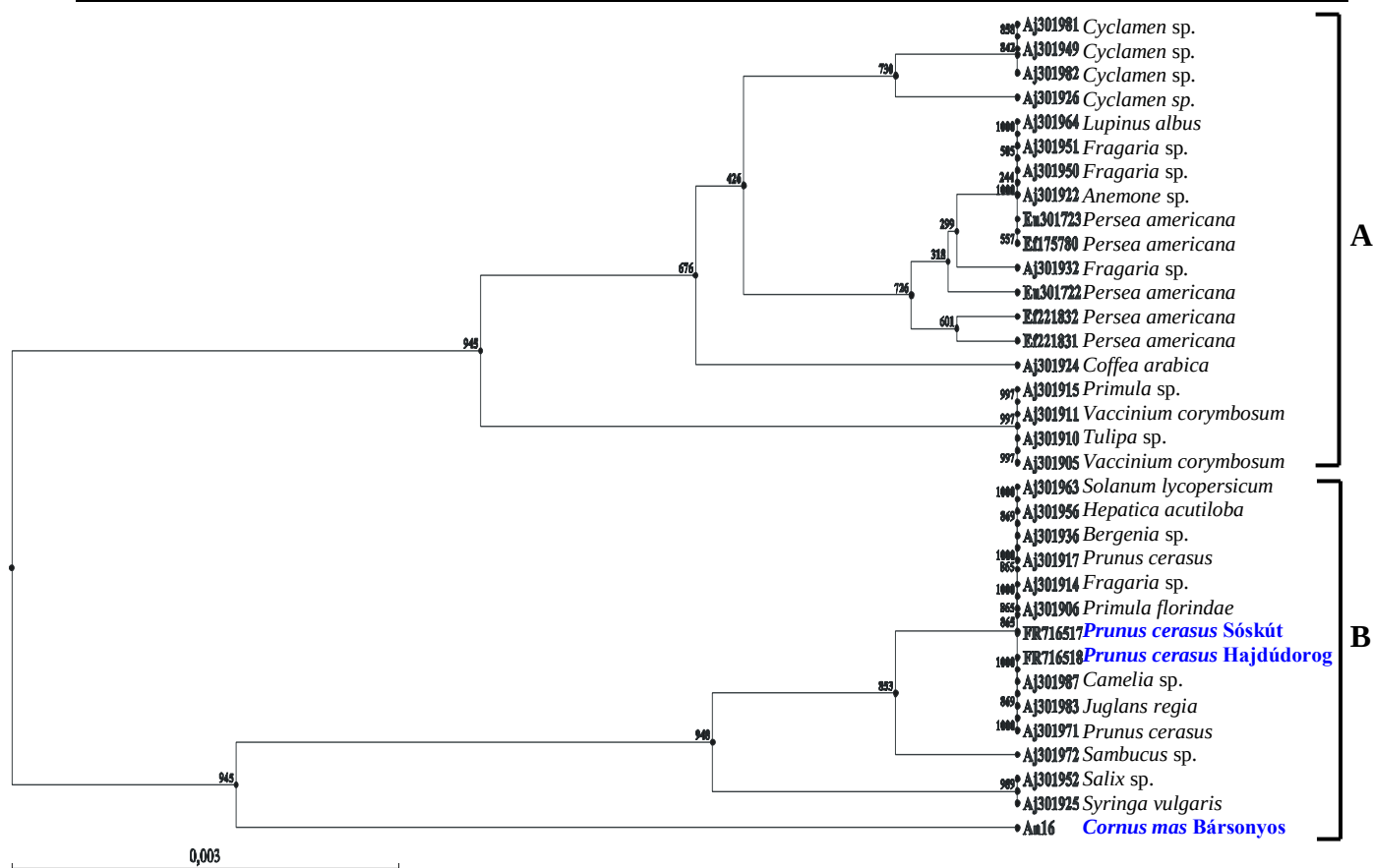
Az izolátum meghatározott nukleinsav sorrendjét elküldtük a nemzetközi adatbázisba, amely a HE610587 azonosító számon található meg (1. melléklet).

A húsos somról származó izolátum homológiája a nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal a következő:

AJ301963 azonosítási számú, *Solanum lycopersicum* fajról származó izolátum - 99,739 %
 AJ301956 azonosítási számú, *Hepatica acutiloba* fajról származó izolátum – 99,739 %
 AJ301936 azonosítási számú, *Bergenia* sp. fajról származó izolátum – 99,739 %
 AJ301917 azonosítási számú, *Prunus cerasus* fajról származó izolátum – 99,739 %
 AJ301914 azonosítási számú, *Fragaria* sp. fajról származó izolátum – 99,739 %
 AJ301906 azonosítási számú, *Primula florindae* fajról származó izolátum – 99,739 %
 FR716517 azonosítási számú, *Prunus cerasus* fajról – SÓSKÚT-ról származó izolátum – 99,739 %
 FR716518 azonosítási számú, *Prunus cerasus* fajról – HAJDÚDOROG-ról származó izolátum – 99,739 %
 AJ301987 azonosítási számú, *Camelia* sp. fajról származó izolátum – 99, 739 %
 AJ301983 azonosítási számú, *Juglans regia* fajról származó izolátum – 99,739 %
 AJ301971 azonosítási számú, *Prunus cerasus* fajról származó izolátum – 99,739 %
 AJ301972 azonosítási számú, *Sambucus* sp. fajról származó izolátum – 99,565 %
 AJ301925 azonosítási számú, *Syringa vulgaris* fajról származó izolátum – 99,304 %
 AJ301952 azonosítási számú, *Salix* sp. fajról származó izolátum – 99,304 %

A BoxShade programmal elkészített szekvencia analízis eredményei egyértelműen mutatják a *Colletotrichum acutatum* izolátumok közötti molekuláris, nukleinsav szintű eltéréseket az ITS régióban. Az An16 jelű izolátum jelentősen eltér az eddig ismert izolátumoktól, mind szekvenciájában, mind a szekvenciában több helyen található inzerciókat tekintve (**2. melléklet**).

A CLC Sequence Viewer 6.5.3. programmal elkészített törzsfá szemléletesen ábrázolja az izolátumok közötti eltérést és filogenetikai távolságot (**21. ábra**). A törzsfán a fajon belül két alcsoport különíthető el, A és B. A húsos somról származó *Colletotrichum acutatum* izolátum másik 14 izolátummal, köztük a korábban meggyről azonosított két magyar izolátummal együtt a második, B alcsoportot alkotja, de az alcsoporton belül is külön ágon helyezkedik el a szekvencia eltérések és inzerciók miatt (**21. ábra**).



21. ábra A *Colletotrichum acutatum* kórokozó izolátumainak filogenetika törzsfája az ITS régió szekvencia adatai alapján

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 törzsfa alatti skála mértéke 3 bázis eltérést jelöl 1000 bázisonként. Az izolátumokat az EMBL/DDBJ/PDB azonosítási számukkal jelöltük. A magyar izolátumokat kék színnel emeltük ki és feltüntettük az izolálás helyét. Az izolátumok azonosítási száma, ill. neve után feltüntettük a gazdanövény latin nevét.

5. Eredmények megvitatása, következtetések

Vizsgálataink megkezdésekor három kórokozóról feltételeztük, hogy okozhatják a somterméseken megjelenő elváltozásokat. Feltételezéseinket arra alapoztuk, hogy a kórokozók morfológiájukban vagy az okozott tünetekben hasonlítottak az általunk megfigyelttekhez.

A *Septoria cornicola* okozta termésfoltosság (Neely és Nolte, 1989) hasonlít a bársonyosi gyűjteményben észlelt elváltozásokhoz. Azonban megvizsgálva a foltokban képződő szaporító képleteket megállapítottuk, hogy a gomba, amely a tüneteket okozta, nem a *Septoria* nemzetségbe tartozik. A *Septoria cornicola* piknidiumban képezi konídiumait, amelyek hialinok, többsejtűek, hosszúkásak, megnyúltak és enyhén görbültek (Bedlan, 2010), míg mi acervuluszokban képződő, egysejtű és ovális konídiumokat figyeltünk meg a bársonyosi somterméseken.

A *Discula destructiva* acervuluszban képezi konídiumait, amelyek színtelenek, elliptikusak és nem szeptáltak (Redlin, 1991). A szerző megfigyelései egybevágtak az általunk megfigyelttekkel. Továbbá Tandardini és mtsai (2004) megemlíti, hogy a konídiumok egy vagy két olajcseppet is tartalmaznak, melyek az általunk vizsgált konídiumokban is megtalálhatók. A *Discula destructiva* ágelhalást is okoz, amelyet az ötödik fán mi is megfigyeltünk, azonban a terméseken az irodalmi adatok alapján nem okoz semmiféle tünetet (Hagan és Mullen, 1999). Ráadásul egyes irodalmak a *Cornus mas* fajt rezisztensnek tartják a kórokozóval szemben (Anonymus, 2007).

A *Colletotrichum acutatum* a somfélék termésén a kocsány felőli részen fekete, szabálytalan alakú elváltozást okoz (Smith, 1993), amelyek hasonlítanak az általunk megfigyelttekhez. A későbbiekben a foltok besüppedtek és továbbterjedtek. Chellemi és mtsai. (1993) sikeresen izolálták az elhalt ágakból és levélfoltokból a kórokozót. Mi is észleltünk a leveleken és az ágakon tüneteket az ötödik fán, de a levelekből nem sikerült izolálni a kórokozót. Ahhoz, hogy bebizonyítsuk, hogy a levélfoltokért és az ágelhalásokért is a *Colletotrichum acutatum* a felelős további vizsgálatok szükségesek.

Az acervuluszokban képződő konídiumok lazac színűek és nagy mennyiségben képződnek. Az acervuluszokban nagyon ritkán képződnek szeták (EPPO, 2004). Vizsgálataink során szeták képződését nem észleltünk, de a fent említett morfológiai jellemzők egyeznek az általunk megfigyelttekkel.

A konídiumok Walker és mtsai. (1991) és Sutton (1992) megfigyelései alapján elliptikusak és kissé megnyúltak, végeik elvékonyodóak, nagyságuk $15,3 \times 4,78 \mu\text{m}$. Ezek a konídiumok egyeznek az általunk megfigyelttekkel, viszont mind hosszúságban, mind szélességben jelentősen nagyobbak az irodalmi áttekintésben említett mérési adatoknál.

A tenyészbélyegek megfigyelése során leírt jellemzők – a leoltási pont körüli kezdetben púder vagy lazac szín, a köztes részben kialakuló barnásszürke gyűrű, a fehéres szürkés légmicélium – egybevágnak Walker és mtsai. (1991) és Sutton (1992) által leírtakkal. A

tenyészetekben a légmicélium és a konídiumképzés folyamatos **Mycobank (www. mycobank.org)**, amelyet mi is megfigyeltünk.

A molekuláris azonosítás után egyértelművé vált, hogy az általunk izolált kórokozó, amely felelős a húsos som terméseinek rothadásáért: a *Colletotrichum acutatum*.

Az ITS régiót vizsgálva és összehasonlítva az adatbázisban fellelhető szekvenciákkal, jól látható, hogy a szekvencia eltérő mind a hazai, mind a külföldi izolátumokhoz képest. Nem mutat teljes homológiát egyetlen másik izolátummal sem. Számos inzerció és nukleotid változás figyelhető meg benne (**2. melléklet**), holott ezt a régiót a genom kevésbé változékony szakaszaként jelölik meg a szakirodalmak (**White és mtsai., 1990; O'Donnell, 1993**). Az ITS régióban az 5,8S RNS gén az egyes izolátumok között teljes homológiát mutat, a legváltozékonyabb régió az ITS1 és az ITS2. Az ITS2 régióban figyelhetők meg a som izolátumra jellemző inzerciók (**2. melléklet**).

Bár a kórokozó igencsak polifág és számos gazdanövénye ismert világszerte (**EPPO/CABI, 1997; EPPO, 2004**), a som félék közül idáig csak a *Cornus florida* fajon figyelték meg a *Colletotrichum acutatum* károsítását (**Smith, 1993; Strandberg és Chellemi, 2002**). Ez alapján kijelenthetjük, hogy a kórokozó kártétele *Cornus mas* terméseken új tudományos eredmény, hiszen sem az átvizsgált irodalmak, sem az USDA adatbázisa nem említi a húsos somot a kórokozó gazdanövényei között.

Bár a húsos som gazdasági jelentősége igen csekély, a *Colletotrichum acutatum* okozta termésrothadás jelentősége mégis számottevő lehet. A *Colletotrichum acutatum* hazánkban súlyos megbetegedést okozott az elmúlt években a meggyültetvényekben (**Tóth és mtsai., 2011**), de a szamócának is fontos kórokozója, hiszen a szaporítóanyagon karantén kórokozónak minősül (**EPPO/CABI, 1997; EPPO, 2004**). A *Cornus mas* őshonos növény Európában. Az erdőkben, ültetvények szegélyénél gyakran előfordul, ezáltal fertőzési forrást jelenthet a korábban említett gyümölcstermő növények számára. Másrészt a hazai faiskolákban is komoly gondokat okozhat, akárcsak az Egyesült Államokban, Floridában (**Strandberg, 2001**).

6. Összefoglalás

A húsos somnak viszonylag kevés betegsége ismert és azok kártétele sem nevezhető jelentősnek Európában. Amerikában viszont több mint 50 növényi kórokozót írtak már le, amelyek kisebb nagyobb károkat okozhatnak. A szaporítóanyagok kereskedelmével ma már könnyen terjedhetnek a kórokozók, amelyek akár súlyos növényvédelmi problémákat is okozhatnak az európai som populációban és a szaporítóanyag előállításban. 2011 szeptemberében szokatlan tüneteket figyeltünk meg Bársonyoson, *Cornus mas* terméseken egy magángyűjteményben. Munkánk során célul tűztük ki a tünetek jellemzését, a kártétel felmérését (betegségfok kiszámítását), a kórokozó jellemzését morfológiai- és tenyészbélyegek alapján, a kórokozó azonosítását és jellemzését molekuláris módszerekkel, valamint rokonsági kapcsolatainak feltárását.

A vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékén végeztük. A kórokozót PDA, táptalajon izoláltuk. A morfológia jellemzés során 100 konídium hosszúságát és átmérőjét mertük meg, valamint vizsgáltuk a tenyészetek színét, alakját és szélét, mintázottságát, növekedési ütemét. A kórokozó patogenitásának ellenőrzését a Koch-féle posztulátumok alapján végeztük el. A molekuláris vizsgálatok során univerzális primereket (ITS5, NL4) használtunk a PCR reakcióhoz, melyek a 18S rRNS gén egy részét, az ITS1 régiót, az 5,8S rRNS gént, az ITS2 régiót és a 28S rRNS gén egy részét sokszorozzák meg. A felszaporított szakaszt klónoztuk, majd nukleotid sorrendjét meghatároztattuk.

A gyümölcsön a tünetek a kocsány felőli részen alakultak ki először, majd onnan terjedtek tovább. A somtermés felületén fénytelen, barna, szabálytalan alakú, besüppedő foltok jelentek meg, melyek gyorsan növekedtek. A foltokban fekete termőtestek jelentek meg, azokon sűrű, ragacsos, narancssárga színű konídium masszát lehetett megfigyelni. A fertőzött gyümölcsök összeaszódtak, egy részük a fán maradt vagy a földre hullott.

Vizsgálataink megkezdésekor három kórokozóról (*Septoria cornicola*, a *Discula destructiva* és a *Colletotrichum acutatum*) feltételeztük, hogy okozhatják a somterméseken megjelenő, antraknózisra emlékeztető, elváltozásokat. Feltételezéseinket arra alapoztuk, hogy a kórokozók morfológiájukban vagy az okozott tünetekben hasonlítottak az általunk megfigyelt tünetekhez.

A kórokozót a klasszikus mikológiai és molekuláris módszerekkel egyaránt *Colletotrichum acutatum*-ként azonosítottuk. **A kórokozó kártétele *Cornus mas* terméseken új tudományos eredmény, hiszen sem az átvizsgált irodalmak, sem az USDA adatbázisa nem említi a húsos somot a kórokozó gazdanövényei között a világon.**

Bár a húsos som gazdasági jelentősége igen csekély, a *Colletotrichum acutatum* okozta termésrothadás jelentősége mégis számottevő lehet. A *Colletotrichum acutatum* rendkívül sok gazdanövényvel rendelkezik. Hazánkban súlyos megbetegedést okozott az elmúlt években a meggyültetvényekben, de a szamócának is fontos kórokozója. A *Cornus mas* őshonos Európában,

erdőkben, ültetvények szegélyében gyakran előfordul, ezáltal fertőzési forrást jelenthet a korábban említett gyümölcstermő növények számára. Másrészt a hazai faiskolákban is komoly gondokat okozhat, akár csak Floridában. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy a kórokozó mely növényi részeken képes fennmaradni és megfertőzni a terméseken kívül.

7. Köszönetnyilvánítás

Kiemelten szeretném megköszönni Dr. Petróczy Mariettának a dolgozat elkészülésében való folyamatos segítségét, tanácsait, támogatását és a labormunkákban való útmutatását.

Köszönöm Tóth Annamária segítségét a labormunkákban és a dolgozat elkészítésében való közreműködését.

Köszönöm Dr. Palkovics Lászlónak, hogy lehetőséget adott arra, hogy a Növénykórtani Tanszéken írjam dolgozatom. Továbbá, hogy tanácsaival mindvégig segítette és támogatta dolgozatom létrejöttét.

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

- Anonymus** 2007. http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/deleted%20files/fungi/Discula_destructiva.doc
- Anonymus** 2011. http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht_dogwd/ht_dog.htm
- Bailey, J. A. and Jeger, M. J.** 1992. *Colletotrichum* biology. In: Pathology and Control. CAB International, Wallingford, UK.
- Bedlan, G.** 2010. Gehölzkrankheiten. Roter hartriegel *Septoria cornicola*. http://www.bedlan.at/upload/start/Gehoelzkrankheiten/FB_Hartriegel_Septoria_cornicola.pdf
- Bertini, L., Amicucci, A., Agostini, D., Polidori, E., Potenza, L., Guidi, C. and Stocchi, V.** 1999. A new pair of primers designed for amplification of the ITS region in Tuber species. In: FEMS Microbiology Letters 173. p. 239-245.
- Børve, J. and Stensvand, A.** 2006. *Colletotrichum acutatum* Overwinters on Sweet Cherry Buds. In: Plant Disease 11. p. 1452-1456.
- Børve, J. and Stensvand, A.** 2010. *Colletotrichum acutatum* occurs asymptotically on sweet cherry leaves. In: European Journal of Plant Pathology 3. p. 325-332.
- Britton, K. O. and Redlin, S. C.** 1995. Damping-off of flowering dogwood seedling caused by *Colletotrichum acutatum*. In: Plant Disease 79. p. 1188.
- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L. W.** 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. In: Phytopathology 86. p. 523-527.
- Byther, R. S. and Davidson, R. M. Jr.** 1979. Dogwood anthracnose. In: Ornamentals Northwest Newsletters 3. p. 20-21.
- Chellemi, D. O., Knox, G. and Palm, M. E.** 1993. Limb dieback of flowering dogwood caused by *Colletotrichum acutatum*. In: Plant Disease 77. p. 100.
- Daughtrey, M. L. and Hagan, A. K.** 2001. Dogwood diseases. pp 124–132. In: Jones, R. K., and Benson, M. D. (Eds.). Diseases on Woody Ornamentals and Trees in Nurseries. APS Press, St. Paul, MN. p. 481.
- Daughtrey, M. L., and Hibben, C. R.** 1994. Dogwood anthracnose: a new disease threatens two native *Cornus* species. In: Annual Review of Phytopathology 32. p. 61-73.
- Daughtrey, M. L., Hibben, C. R., Britton, K. O., Wingham, M. T. and Redlin, S. C.** 1996. Dogwood anthracnose – Understanding a disease new to North America. In: Plant Disease 80. p. 349-359.
- DeMarsay, A. and Oudemans, P. V.** 2002. Reservoirs of *Colletotrichum acutatum* in dormant and growing highbush blueberry. In: Phytopathology 92. p. 143.

- EPPO** 2004. Diagnostic protocols for regulated pests/Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés *Glomerella acutata*. OEPP/EPPO Bulletin 34. p.193-199.
- EPPO/CABI** 1997. *Colletotrichum acutatum*. Quarantine Pests for Europe, 2nd edn. CAB International, Wallingford (GB). pp. 692–697.
- Farr, D. F.** 1991. *Septoria* species on *Cornus*. In: Mycologia 83 évf. 5sz.: p. 611-623.
- Farr, D. F., and Rossman, A. Y.** 2011. In: Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved October 1, 2011, from /fungaldatabases/.
- Fitzell, R. D. and Peak, C. M.** 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango – Inoculum sources, spore production and dispersal. In: Annals of Applied Biology 104. p. 53-59.
- Garibaldi, A., Bertetti, D. and Gullino, M. L.** 2003. First Report of *Septoria* Leaf Spot on *Cornus sericea* in Italy. In: Plant Disease 87. p. 204.
- Gartner, H.** 1971. Versuche zur Bekämpfung von *Botrytis cinerea* (Grauschimmel) als Traubenfaule. In: Mitteilungen Klosterneuburg 21 évf. 3 sz.: p. 183-188.
- Guerber, J. C. and Correll, J. C.** 2001. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. In: Mycologia 93. p. 216-229.
- Guerber, J. C., Liu, B., Correll, J. C. and Johnston, P. R.** 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. In: Mycologia 95. p. 872-895.
- Hagan, A. K. and Mullen, J. M.** 1999. Occurrence of Diseases in Native Stands of Flowering Dogwood in North Alabama. Bulletin 639. Alabama Agricultural Experiment Station <http://www.aaes.auburn.edu/comm/pubs/bulletins/bull639dogwood.pdf>
- Hansen, M. A.** 2009. Foliar Disease of Dogwood. Virginia Cooperative Extension. <http://pubs.ext.vt.edu/450/450-611/450-611.html>
- Hollós L.** 1933. Szekszárd vidékének gombái. Budapest. p. 69.
- Holzmüller, E., Jose S., Long, A.** 2007. Dogwood anthracnose: a threat to flowering dogwood. University of Florida. p. 127. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FR/FR18300.pdf>
- Index Fungorum** <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
- Irinyi L. és Kövics Gy.** 2008. A *Colletotrichum acutatum* első hazai előfordulása szamócán. In: 13. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum p. 66-77.
- Lardner, R., Johnston, P. R., Plummer, K. M. and Pearson, M. N.** 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. In: Mycological Research 103. p. 275-285.
- Leandro, L. F. S., Gleason, M. L., Nutter, F. W., Jr., Wegulo, S. N. and Dixon, P. M.** 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. In: Phytopathology 91. p. 659-664.

- Maniatis, T., Sambrook, I. and Fritsch, E. F.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Moesz** 1942. Budapest és környékének gombái. Budapest. p. 222.
- Mycobank** <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx>
- Neely, D. and Nolte, D. S.** 1989. *Septoria* leaf spot on dogwoods. In: Journal of Arboriculture 15 évf. 11 sz.: p. 263-266.
- O'Donnell, K.** 1993. *Fusarium* and its near relatives, pp. 225-233. In: Reynolds, D.R., and Taylor, J.W. (Eds.). The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systemics. CAB International, Wallingford, UK.
- Pecknold, P. Ruhl, G. and Rane, K.** 2001. Dogwood anthracnose. In: Purdue University: Department of Botany & Plant Pathology. BP-48-W Ornamental Diseases
- Peres, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E. and Correll, J. C.** 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. In: Plant Disease 89. p. 784-796.
- Plant Disease Diagnostic Clinic** 2001. Dogwood Anthracnose (*Discula destructiva*). Factsheet Cornell University. In: Plant Science Building, Ithaca, NY. p. 334.
- Priszter, Sz.** 1990. A húsos som. Magyarország kulturflórája. Akadémiai Kiadó. Budapest. p. 75.
- Redlin, S. C.** 1991. *Discula destructiva* sp. nov., cause of dogwood anthracnose. In: Mycologia 83. p. 633-642.
- Simmonds, J. H.** 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. In: Queensland's Journal of Agricultural Science 22. p. 437-459.
- Smith, V. I.** 1993. Infection of dogwood fruit by *Colletotrichum acutatum* in Connecticut. In: Plant Disease 77. p. 536.
- Strandberg, J. O.** 2001. A new disease of flowering dogwood caused by *Colletotrichum acutatum*. In: Plant Disease 85. p. 229.
- Strandberg, J. O. and Chellemi, D. O.** 2002. Limb dieback of flowering dogwood caused by *Colletotrichum acutatum*. In: Proc. Fla. State Hort. Soc. 115. p. 259-262.
- Sutton, B. C.** 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: J.A. Bailey and M. J. Jeger eds. *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Brit. Soc. For Plant Pathol., CAB International. p. 1-27.
- Tantardini, A., Calvi, M., Cavagna, B., Zhang, N. and Geiger, D.** 2004. First report in Italy of dogwood anthracnose on *Cornus florida* and *C. nuttallii* caused by *Discula destructiva*. In: Informatore Fitopatologico 54 évf. 12 sz.: p. 44-47.
- Than, P. P., Shivas, R. G., Jeewon, R., Pongsupasamit, S., Marney, T. S., Taylor, P. W. J. and Hyde, K. D.** 2008. Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds Fungal Diversity 28. p. 97-108.

- Tóth A., Petrőczy M. és Palkovics L.** 2011. A meggyantraknózis kórokozójának azonosítása és a védekezés lehetőségei. In: Kertészet és Szőlészet 60 évf. 11 sz.: p. 15-16.
- Vörös J.** 1957. Fungi imperfecti aus Ungarn, Sydowia, In: Ann. Mycol., Ser. II évf. 11 sz.: p. 133-137.
- Walker, J., Nikandrow, A. and Millar, G. D.** 1991. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in *Colletotrichum*. In: Mycological Research 95. p. 1175-1193.
- Wharton, P. and Diéguez-Uribeondo, J.** 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. In: Anales del Jardin Botánico de Madrid. 61 évf. 1 sz.: p. 3-22.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academy Press, New York. p. 315-322.
- Zhang, N. and Blackwell, M.** 2001. Molecular phylogeny of dogwood anthracnose fungus (*Discula destructiva* and the *Diaporthales*. In: Mycologia 93. p. 356-364.
- Zulfiqar, M., Brlansky, R. H. and Timmer, L. W.** 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. In: Mycologia 88. p. 121-128.

MELLÉKLETEK

1. melléklet: A nemzetközi adatbázisba elküldött An16 jelű izolátum hivatkozási száma és adatlapja, a nukleotid szekvenciával

Accession#: HE610587
 Status: confidential until 10-NOV-2011
 Description: Glomerella acutata genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone An16, isolate Barsonyos1

ID HE610587; SV 1; linear; genomic DNA; STD; FUN; 1161 BP.
 DT 08-NOV-2011 (Rel. 110, Created)
 DT 08-NOV-2011 (Rel. 110, Last updated, Version 0)
 DE Glomerella acutata genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA
 DE gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone An16, isolate Barsonyos1
 XX
 OS Glomerella acutata
 OC Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes;
 OC Hypocreomycetidae; Glomerellales; Glomerellaceae; Glomerella.
 RP 1-1161
 RA Palkovics L.;
 RL Submitted (06-NOV-2011) to the INSDC.
 RL Department of plant Pathology, Corvinus University Of Budapest, Menesi Road
 RL 44., H-1118, HUNGARY.
 RN [2]
 RA Petroczy M., Csomor ZS., Palkovics L.;
 RT "First report of Colletotrichum acutatum on Cornus mas in Hungary";
 RL Unpublished.

FH Key Location/Qualifiers
 FT source 1..1161
 FT /organism="Glomerella acutata"
 FT /host="Cornus mas"
 FT /isolate="Barsonyos1"
 FT /mol_type="genomic DNA"
 FT /country="Hungary:Barsonyos"
 FT /collection_date="Sep-2011"
 FT /clone="An16"
 FT /PCR_primers="fwd_name: ITS5, fwd_seq:
 FT ggaagtaaaagtcgtaacaa, rev_name: NL4, rev_seq:
 FT ggtccgtgtttcaagacgg"
 FT /db_xref="taxon:27357"
 FT misc_feature 1..1161
 FT /note="sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA
 FT gene, ITS2 and 28S rRNA gene"
 XX
 SQ Sequence 1161 BP; 283 A; 300 C; 325 G; 253 T; 0 other;

ggtctccggtt ggtgaaccag cggaggagtc attactgagt taccgctcta caaccctttg	60
tgaacataacc taaccgttgc ttcggcgggc aggggaagcc tctcgtgggc ggaccctccc	120
ggcgccggcc cgtcacggg ggcggagcgc ccgcccggagg aaaccaaact ctatttacac	180
gacgtctctt ctgagtggca caagcaaata attaaaactt ttaacaacgg atctcttgggt	240
tctggcatcg atgaagaacg cagcgaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt	300
gaatcatcga atctttgaac gcacattgag ctccgcagca ttctggcgag catgcctggt	360
cgagcgtcat tttaaaacc ctcaagcacc gcttggtttt tgggggcccc cacggccgac	420
gtgggcccctt aaaaggtagt ggcggaccct ccccgagacc tcctttgcgt agtaactaac	480
gtctcgcact gggatccgga gggactcttg cgttaaaacc cccaaatttt tttcagggttg	540
acctcggatc aggtaggact acccgctgaa cttaagcata tcaataagcg gaggaaaaga	600
aaccaacagg gattgcccc gtaacggcga gtgaagcggc aacagctcaa atttgaaatc	660
tggccccagg cccgagttgt aatttgcaga ggatgctttt ggccgcggtgc cttccgagtt	720
ccctggaacg ggacgccata gaggttgaga gcccgtacg gttggacacc aagcctttgt	780
aaagctcctt cgacgagtcg agtagtttgg gaatgctgct ctaaatggga ggtacatttc	840
ttctaagctt aaatattggc cagagaccga tagcgcacaa gtagagtgat cgaaagatga	900
aaagcacttt gaaaagaggg ttaaacagca cgtgaaattg ttaaaaggga agcgtttgtg	960
accagacttg cgtccggtga atcaccagc tctccgggtt ggggcacttc gccggcacag	1020
gccagcatca gcttgccgtc ggggacaaaa gcttcaggaa cgtggctcct ctcggggagt	1080
gttatagcct gttgcataat acccttcggc gggctgaggt acgcgctccg caaggatgct	1140
ggcgtaatgg tcatcagcga c	1161

Különböző színekkel jelöltük az ITS régió alkotóelemeit (18S rRNS gén, ITS1, 2,8S rRNS gén, ITS2, 28S rRNS gén).

2. melléklet: A BoxShade programmal készített nukleotid szekvencia összehasonlítás részlete az ITS régióban

aj301925	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCGACCC
aj301952	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCGACCC
Hajdudorog	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
Soskut	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301906	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301914	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301917	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301936	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301956	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301963	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301971	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301983	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301987	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC
aj301972	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTGACC
ef221831	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
ef221832	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301949	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301981	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301982	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301926	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301924	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301905	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301910	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301911	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301915	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301922	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301950	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301951	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301964	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
eu301722	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
eu301723	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
aj301932	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
ef175780	1	TAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCC
An16	1	CAACCCCTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGTGGGCGGACCC

aj301925	CTCCCGGCGCCGG	CCCCATCACGGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301952	CTCCCGGCGCCGG	CCCCATCACGGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
Hajdudorog	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
Soskut	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301906	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301914	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301917	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301936	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301956	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301963	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301971	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301983	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301987	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301972	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
ef221831	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
ef221832	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301949	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301981	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301982	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301926	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301924	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301905	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301910	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301911	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301915	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301922	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301950	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301951	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301964	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
eu301722	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
eu301723	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
aj301932	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
ef175780	CTCCCGGCGCCGG	CCCCACACAGGGG	ACGGGGCGCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA
An16	CTCCCGGCGCCGG	CCCCGTACAGGGG	CGGAGCGCCCCGCCGAGGAAACCAAACCTCTATTTTACA

aj301925	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301952	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
Hajdudorog	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
Soskut	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301906	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301914	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301917	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301936	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301956	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301963	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301971	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301983	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301987	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301972	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
ef221831	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
ef221832	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301949	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301981	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301982	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301926	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301924	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301905	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301910	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301911	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301915	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301922	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301950	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301951	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301964	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
eu301722	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
eu301723	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
aj301932	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
ef175780	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
An16	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG

aj301925
aj301952
Hajdudorog

aj301925	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301952	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
Hajdudorog	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
Soskut	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301906	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301914	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301917	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301936	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301956	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301963	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301971	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301983	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301987	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301972	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
ef221831	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
ef221832	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301949	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301981	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301982	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301926	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301924	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301905	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301910	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301911	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301915	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301922	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301950	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301951	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301964	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
eu301722	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
eu301723	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
aj301932	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
ef175780	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT
An16	AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTT

aj301925
aj301952
Hajdudorog

aj301925
aj301952
Hajdudorog

aj301925	CCTGTTGCACAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301952	CCTGTTGCACAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
Hajdudorog	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
Soskut	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301906	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301914	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301917	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301936	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301956	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301963	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301971	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301983	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301987	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
aj301972	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1061
ef221831	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
ef221832	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301949	CCTGTTGCACAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1062
aj301981	CCTGTTGCACAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1062
aj301982	CCTGTTGCACAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1062
aj301926	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1062
aj301924	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1062
aj301905	CCTGTTGTATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301910	CCTGTTGTATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301911	CCTGTTGTATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301915	CCTGTTGTATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301922	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301950	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301951	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301964	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
eu301722	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
eu301723	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
aj301932	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1064
ef175780	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1063
An16	CCTGTTGCATAATACCCCTTCGGCGGGCTGAGG	1069

Magyarázat a 2. számú mellékletéhez: Az ábrán szereplő nukleotid szekvencia az ITS régió részletét mutatja. A fekete háttérű szekvenciák az izolátumok közötti hasonlóságot, a fehér és szürke háttér különböző mértékű eltéréseket jelöl. A pontozott részek deléciót mutatnak más izolátumokhoz képest. A nukleotid szekvenciák előtt az izolátumok nevét, ill. azonosító számát tüntettük fel.