

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYKÓRTANI TANSZÉK



Tudományos diákköri dolgozat

Monilinia laxa és Monilinia fructicola izolátumok
fungicid rezisztenciája

Lantos Anna

Növényorvos szak, 2. évfolyam

Konzulens: Dr. Petróczy Marietta egyetemi adjunktus
Dr. Erdélyi Éva egyetemi docens
Dr. Palkovics László tanszékvezető egyetemi tanár

Budapest, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	4
1.1. Célkitűzések	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A <i>Monilinia laxa</i> és a <i>Monilinia fructicola</i> jelentősége	6
2.2. A <i>Monilinia laxa</i> és a <i>Monilinia fructicola</i> gazdanövényköre	6
2.3. A <i>Monilinia laxa</i> és a <i>Monilinia fructicola</i> által előidézett tünetek	7
2.4. A <i>Monilinia laxa</i> és a <i>Monilinia fructicola</i> biológiája	9
2.5. A <i>Monilinia laxa</i> és a <i>Monilinia fructicola</i> fajok elleni védekezés	10
2.5.1. Agrotechnikai módszerek	10
2.5.2. Kémiai növényvédelem	10
2.5.3. Növényvédő szerek hatékonysága a <i>M. laxa</i> és a <i>M. fructicola</i> ellen	11
2.6. A <i>M. laxa</i> és a <i>M. fructicola</i> fajok növényvédő szerekkel szembeni rezisztenciája ..	13
2.6.1. A Qoi rezisztencia	13
2.7. A <i>Monilinia laxa</i> és a <i>Monilinia fructicola</i> fajok azonosítása	15
2.7.1. Azonosítás morfológiai- és tenyészbélyegek alapján	15
2.7.2. Azonosítás molekuláris módszerekkel	16
3. Anyag és módszer	17
3.1. A vizsgálatok helyszíne és ideje	17
3.2. A vizsgálat anyaga	17
3.2.1. Az izolátumok	17
3.2.2. Táptalaj	18
3.2.3. Eszközök	18
3.2.4. Növényvédő szerek	18
3.2.5. Primerek, enzimek	19
3.3. A vizsgálat módszere	21
3.3.1. A kórokozók izolálása és a tenyészetek fenntartása	21
3.3.2. A morfológiai- és tenyészbélyegek értékelése	21
3.3.3. Molekuláris biológiai módszerekkel történő azonosítás	21
3.3.4. Patogenitás vizsgálata	23
3.3.5. Növényvédő szerekkel végzett hatásvizsgálatok	23
3.3.6. Citokróm b gén vizsgálata Real-time PCR módszerrel	26
4. Eredmények	28
4.1. A kórokozók azonosítása morfológiai bélyegek alapján	28
4.2. A kórokozók azonosítása molekuláris biológiai módszerrel	28
4.3. A kórokozók patogenitásának igazolása	29
4.4. Növényvédő szerekkel végzett <i>in vitro</i> hatásvizsgálatok	29
4.4.1. A tenyészetek növekedésére kifejtett hatás	29
4.4.2. A konídiumok csírázására kifejtett hatás	37
4.4.3. Citokróm b gén vizsgálatának eredményei	38
5. Eredmények megvitatása, következtetések	40
6. Összefoglalás	42
7. Köszönetnyilvánítás	44
8. Irodalomjegyzék	45

Rövidítések jegyzéke

bp	bázispár
DNS	dezoxiribonukleinsav
CTAB	cetil-trimetilammónium-bromid
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	kilobázis
<i>M.</i>	<i>Monilinia</i>
mRNS	messenger ribonukleinsav
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeráz láncreakció
PDA	Potato dextrose agar, Burgonya-dextróz agar
Qoi	Quinone Outside Inhibitor
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNAse	ribonukleáz

1. Bevezetés

A világ számos táján, így hazánkban is igen jelentős a csonthéjas gyümölcsök termesztése, Magyarországon jelenleg az összes gyümölcsstermesztés több mint egynegyedét teszi ki. Két *Monilinia* faj okoz a csonthéjasokon virág- és hajtáselhalást, valamint ezek a kórokozók gyümölcsrothadást és rákos sebeket is előidéznak a fákon. A virágelhalás és a gyümölcsrothadás súlyosan veszélyezteti az azévi termésmennyiséget, míg a hajtáselhalás és fertőzés továbbterjedése következtében kialakuló rákos sebek az évek során a fák kondíciójának fokozatos leromlását, más tényezőkkel együtt pedig a fák pusztulását okozhatják. A monilíniás megbetegedéssel szemben csonthéjas növényeink nagy része nem védhető meg eredményesen kémiai növényvédelem nélkül.

A *Monilinia laxa* kártétele hazánkban már régóta ismert. Régebben főleg a meggyültetvényekben lépett fel járványosan, míg napjainkban meggy mellett kajszin, mandulán, sőt egyes őszibarack és szilva fajtákon is súlyos megbetegedést idéz elő. Már a 2000-es évek elején felmerült, hogy hazánkban a faj új agresszívabb törzsei, patotípusai jelentek meg **(Rozsnyay és Vajna, 2001)**. A növényvédő szer paletta sokat változott az elmúlt évtizedekben. Egyre több felszívódó készítmény jelent meg a piacon, és a felhasználás is eltolódott a szisztemikus hatóanyagok irányába. Ezzel egyidőben pedig megjelentek a kórokozók rezisztens vonalai is. A járványok következtében fokozódó fungicidhasználat eredményeként pedig további ellenálló populációk megjelenésére számíthatunk.

A *Monilinia fructicola* újonnan bekerült, karantén kórokozó, amely 2007 óta bizonyítottan jelen van ültetvényeinkben. Elterjedése a növényvédelmi technológiát is módosítja, hiszen a gyümölcsérés időszakában elengedhetetlenné válik a növényvédő szerek használata a gyümölcsök megóvása érdekében.

Az integrált növényvédelem szükségszerű eleme a peszticidek használata és úgy tűnik ez az elkövetkezendő időkben sem fog változni, ezért kiemelkedő fontosságú hatékonyságuk megőrzése a lehető leghosszabb ideig. A környezetterhelés csökkentése érdekében számos készítmény engedélyokirata visszavonásra került. A választék csökkenése, valamint a megemelt dózisú növényvédő szer kijuttatások miatt egyre több kórokozó esetében alakul ki hatékonyságvesztés vagy rezisztencia bizonyos hatóanyagcsoportokkal szemben. Jelenleg széles körben kutatott terület a strobilurin típusú hatóanyagokkal szemben kialakuló rezisztencia, mert ez több gazdaságilag jelentős kórokozó esetében rövid időn belül kialakult. Világszerte számos készítménnyel szemben mutattak ki *Monilinia* fajoknál is rezisztenciát, többek közt a strobilurinokkal szemben is.

Időről időre szükséges a fungicidek hatékonyságának vizsgálata a gazdaságilag jelentős kórokozók esetében. A *M. fructicola* esetében még viszonylag kevés hatásvizsgálatot végeztek hazánkban, a *M. laxa* esetében pedig a túlzott fungicidhasználat következtében, a kórokozóban létrejövő változások miatt tartottuk fontosnak a kísérletek elvégzését. Eredményeink hozzájárulnak a kórokozók változékonyságának feltérképezéséhez, illetve a monilíniás betegség elleni védekezés hatékonyabbá tételéhez.

1.1. Célkitűzések

Vizsgálataink során a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- *Monilinia* izolátumok gyűjtése különböző gazdanövényekről és területekről.
- A kórokozók izolálása, azonosítása klasszikus mikológiai és molekuláris biológiai módszerekkel.
- Az izolátumok morfológiai- és tenyészbélyegeinek jellemzése.
- A kórokozók patogenitásának igazolása.
- Fungicidek hatásának tesztelése a tenyészetek növekedésére, valamint a konídiumok csírázására.
- A strobilurin típusú hatóanyagokkal szembeni rezisztenciáért leggyakrabban felelős, mutációt hordozó citokróm b gén molekuláris vizsgálata.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* jelentősége

Magyarországon két *Monilinia* faj okoz virág- és hajtáselhalást, melyek gyümölcsrothadást és rákos sebek kialakulását is eredményezik a fákon: a *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhl.) **Honey (1936)**, ivartalan alakja *Monilia laxa* (Ehrenb.) Sacc. & Voglino (**Saccardo, 1886**), valamint a *Monilinia fructicola* (Wint.) **Honey (1928)**, ivartalan alakja *Monilia fructicola* Batra (**Batra, 1991**).

Gróf és Révy (1929) a *Monilinia* fajokat már a 20. század elején a gyümölcsfák legjelentősebb betegségeként említi. **Feliciano és mtsai. (1987)** szerint a barnarothadást okozó *Monilinia* fajok a csonthéjasok legveszedelmesebb kórokozói, közülük is **Byrde és Willets (1977)** a *M. fructicola* kórokozót tartja a legjelentősebbnek.

A *M. laxa* nagyon régóta okoz járványokat szinte egész Európában (**Heald, 1933**), már **Balogh és Kovács (1974)** is a hazai csonthéjasok növényvédelmének meghatározó kórokozójaként említi. Korábban főleg a meggy ültetvényekben okozott jelentős gazdasági károkat, azonban az utóbbi évtizedekben járványosan lépett fel kajszin, szilván és mandulán is. A járvány következtében akár a virágok 60-90%-a is elpusztulhat (**Rozsnyay és Vajna, 2001**). Jelentős veszteségeket okozhat tárolás során is, fertőzve a leszüretelt gyümölcsöket (**Holb, 2005**).

A *M. fructicola* hazánkban újonnan megjelent kórokozó, melyet **Petróczy és Palkovics (2005)** azonosított először import őszibarack gyümölcsökről, majd két évvel később megjelent a hazai ültetvényekben is **Kiss (2007)**. Az EPPO A2-es listáján jelenleg is karantén károsítóként tartják számon (**Anonymus, 2012**). A kártétel mértékéről hazánkban még nincsenek adatok, de várhatóan a *M. fructicola* szerepe a virágfertőzésben csekély marad hazánkban, mert virágzáskor általában túl alacsony a hőmérséklet a fertőzés bekövetkezéséhez a kórokozó hőigényét tekintve (**Luo és mtsai., 2001**).

2.2. A *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* gazdanövényköre

A *Monilinia laxa* gazdanövényköre

A *Monilinia laxa* elsősorban a csonthéjas növényeket károsítja, de ritkán az almatermésűeket is megfertőzheti. **Tóth (2008)** szerint az összes csonthéjas fajon tüneteket idézhet elő. Meggyen (*Prunus avium* L.), őszibarackon (*Prunus persica* L.), kajszin (*Prunus armeniaca* L.), szilván (*Prunus domestica* L.), mandulán (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb) elsősorban a virágok és hajtások elhalásával okoz súlyos károkat (**Glits és mtsai., 1997**). Cseresznyén (*Prunus cerasus* L.) a termésrothadás okozza a jelentősebb veszteségeket (**Holb, 2006**).

A *M. laxa* vad fajokat, valamint számos dísz *Prunus* fajt, fajtát is képes megfertőzni. Kökényen (*Prunus spinosa* L.) gyümölcsrothadást okoz (Folk és Glits, 1993). Virágelhalást idéz elő egyes japánbirs fajokon (*Chaenomeles speciosa* (Sweet.) Nakai., *Chaenomeles x superba* (Frahm) Rehd.) (Petróczy és mtsai., 2005). Súlyos virág-, és hajtáselhalás jelentkezhet japán cseresznyén (*Prunus serrulata* Lindl.) és fajtáin ('Ichijo', 'Kanzan'), babarózsán (*Prunus triloba* Lindl.), törpemandulán (*Prunus tenella* Batsch.) (Wormald, 1954, Glits, 1993, Petróczy és mtsai., 2005). Griegel (2003) szerint japánbirs fajokon is okozhat a virágelhalás mellett hajtáselhalást. A vérszilva (*Prunus cerasifera* Ehrh. 'Nigra') terméseinek rothadásáért szintén részben ez a gomba felelős (Glits, 1998).

Almatermésűek közül előfordulhat alma (*Malus domestica* Borkh.) (Szabó és Nyéki, 1995), naspolya (*Mespilus germanica* L.), körte (*Pyrus communis* L.), birs (*Cydonia oblonga* Miller) (Batra, 1991), valamint ezüstös díszkörte (*Pyrus elaeagnifolia* Pall.) virágain (Wormald, 1954). A *Rosaceae* családon kívül, más növényeket is képes megbetegíteni. Griegel (2003) az aranyvessző fajokon (*Forsythia* spp.) okozott virág és hajtáselhalásról számol be, míg Pennycook (1989) szerint a szőlő (*Vitis* sp.) bogyóin is előidézhethet rothadást.

A *Monilinia fructicola* gazdanövényköre

A kórokozóra jellemző tünettípusok megjelenhetnek meggyen, cseresznyén, őszibarackon, kajszin, mandulán, szilván. Almán, körtén és birsen virág és hajtáselhalást okoz (Biggs és Northever, 1988). Babérmeggyen (*Prunus laurocerasus* L.) hajtáselhalást, bazsarózsán virágpusztulást okoz (Pirone, 1907). Wormald (1954) dísz *Pyrus* és *Prunus* fajokon, japánbirsén (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl.), valamint rózsán (*Rosa* sp.) okozott kártételéről számol be. További gazdanövényeiként említi a szakirodalom: a galagonyát (*Crataegus* sp.), a japán naspolyát (*Eriobotrya japonica* Lindl.) (OEPP/EPPO, 1988), szilvarózsát (*Prunus glandulosa* (Thumb.) Loisel.) (Shim és mtsai., 2007), papaját (*Carica papaya* L.) (Chan és mtsai., 1996), vadszedret (*Rubus fruticosus* L.) (Hinrichs-Berger és Müller, 2010) és a szőlőt (Visarathanonth és mtsai., 1988, Batra, 1991).

Magyarországon a következő gazdanövényeken jelent meg a kórokozó: őszibarack, nektarin, szilva, alma, körte és cseresznye (Kiss, 2007).

2.3. A *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* által előidézett tünetek

Wilson és Ogawa (1979) szerint tünetek alapján igen nehéz elkülöníteni a két kórokozót. A *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* egyaránt okozhatja a virágok és hajtások száradását, elhalását, a gyümölcsök rothadását (1. ábra), valamint fás részeken rákos sebek kialakulását. Az

első tünetek tavasszal a virágokon jelennek meg, apró, barna foltok formájában (**Kern, 1912**). Méretük gyorsan növekszik, majd az egész virág elbarnul, elszárad. Az elhalt virágok általában nem hullanak le, a vesszőre száradva hónapokig a fán maradnak. Gyakran a fertőzött virág melletti rügyek nem hajtanak ki, a fejlődésnek indult fiatal levelek leszáradnak (**Glits és mtsai., 1997**).



1. ábra: *Monilinia laxa* okozta virágelhalás meggyen (balra) és gyümölcsrothadás mirabolán terméseken (jobbra) (Fotó: Lantos, 2011)

A kórokozó a virágkocsányon keresztül bejut a vesszőbe, majd tovább terjed az idősebb részek felé. **Rozsnyay (2010)** szerint a gomba képes a kajszi hancs-, és farészében is fejlődni. A vesszőkön besüppedő, ovális foltok jelennek meg. Amerre a gomba micéliuma tovább növekszik, a terméskezdemények és a levelek elpusztulnak. Amennyiben a barnulás körülöleli a vesszőt, a fölötte található fás rész elhal. A kéreg alatti szövetek is elhalnak, majd az idősebb fás részeken rákos, nyílt sebek keletkeznek, amelyek az évek során folyamatosan növekednek (**Glits és Folk, 2000**).

A fertőzött részeken párás időben exogén sztrómák képződnek (**Glits és mtsai., 1997**), amelyeken gyakori a sporuláció (**Batra, 1991**). A két kórokozó elkülönítése leginkább a főtünetek (exogén sztrómák) megjelenése esetén lehetséges (**Kiss, 2007**).

Az elhalás helyén gyakran jelentkezik mézgásodás. Igen erős mézgaképződés figyelhető meg többek között meggyen, őszibarackon (**Tóth, 2008**), valamint rózsamandulán (**Griegel, 2003**).

A termések fertőződése a fejlődés bármely időszakában végbemehet (**Wormald, 1954**), fogékonyságuk a fertőzésre az érés előrehaladtával folyamatosan növekszik (**Moore, 1950**). A gyümölcsökön apró, rothadó foltok jelennek meg, majd ezek terjedni kezdenek. A gyümölcshéj alatt a hús is puhulni kezd, majd az egész termés elrothad. Száraz időben a fertőzött termések fokozatosan elveszítik nedvességtartalmukat, mumifikálódnak. Ezek a gyümölcsmúmiák a fán maradnak és a következő évben komoly fertőzési forrást jelentek (**Komlósi és Rátainé, 2002**). A

szüret után a tárolóban is továbbterjedhet a kórokozó. A tárolóban a monília fertőzés terjedését befolyásoló körülményeket **Thurzó (2008)** vizsgálta.

A két faj által okozott tünetek közti különbség a gyümölcsök fertőződésekor figyelhető meg. A *M. fructicola* az ép epidermiszen keresztül is képes megbetegíteni a gyümölcsöt. Így a rothadás látható sebzés nélkül, általában több pontból indul, igen gyorsan terjed (**Petróczy és Palkovics, 2005**). A *M. laxa* kórokozónak sebzésre van szüksége ahhoz, hogy a termésbe jusson. Sebzés keletkezhet rovarok, jégeső vagy egyéb mechanikai, fiziológiai hatás következtében. Amennyiben a termések összeérnek, a fertőzés áttöréséhez nincs szükség a héj sérülésére, az ép epidermiszen keresztül is áthatol a *M. laxa* micéliuma (**Folk és Glits, 1993**).

A sérült gyümölcsök moniliális rothadását egy harmadik faj is okozhatja a *Monilinia fructigena* (Aderh. and Ruhl.). Ennek a fajnak az exogén sztrómái sötét sárga színűek, jellemzően koncentrikus körökben jelennek meg, így könnyedén elkülöníthető a fenti két *Monilinia* fajtól (**Glits és Folk, 2000**).

2.4. A *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* biológiája

A *Monilinia laxa* apotéciumos alakja Európában ritkán képződik (**Glits és Folk, 2000**), hazánkban még nem találták meg. A *Monilinia fructicola* ivaros alakja gyakran megjelenik azokban az országokban ahol a kórokozó elterjedt. Az apotéciumokban képződő aszkuszok fertőzési forrásként szolgálnak, valamint biztosítják a kórokozó biológiai változatosságát, jobb adaptációs képességét is (**OEPP/EPPO, 1988**).

A moniliális betegséget okozó kórokozók többféle formában képesek áttelelni. Leggyakrabban gyümölcsmúmiák, azaz álszkleróciumok formájában marad fenn. (**2. ábra**). Kora tavasztól az álszkleróciumokon konídiumláncok képződnek, elsősorban ezek felelősek a tavaszi fertőzésért. Az ősszel képződött konídiumok is képesek átvészelni a telet. Egyes vizsgálatok szerint 8-10 órán keresztül elviselik a -20 °C-os hőmérsékletet is. Téli napokon, 0 °C fölötti hőmérsékleten további konídiumok képződnek (**Karova, 1974**). Másik fontos fertőzési forrás a növényben fennmaradó micélium. Tavasszal a fertőzött gallyakon, ágakon exogén sztrómák alakulnak ki, melyeken szintén konídiumláncok képződnek (**Ubrizsy, 1965**).

A konídiumok légmozgással vagy vízcsepp segítségével jutnak a gazdanövényre. A *Monilinia laxa* kórokozó 8-20 °C között, a *Monilinia fructicola* 20-25 °C közötti hőmérséklet tartományban fertőz (**Kiss, 2007**). **Luo és mtsai. (2001)** vizsgálatai során megállapították, hogy a *M. fructicola* virágfertőzéséhez a 22-26 °C az optimális hőmérséklet, 10 °C alatt nem fertőz. *M. laxa* kórokozónak 5-6 óra növényfelület nedvesség szükséges a fertőzéshez (**Sándor, 1974**). A *M. fructicola* mindössze 3-5 óra nedvesség esetén már jelentős fertőzést okoz, de amennyiben 3 óránál

kevesebb a növényfelületnedvesség még nagy mennyiségű inokulum esetén sem számíthatunk számottevő fertőzésre (**Wilcox, 1989**).



2. ábra: A meggyfán maradt gyümölcsmúmiák a legjelentősebb fertőzési források
(Fotó: Lantos, 2011)

2.5. A *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* fajok elleni védekezés

2.5.1. Agrotechnikai módszerek

A monilíniás betegség elleni küzdelemben a megelőzés meghatározó fontosságú. Mélyen fekvő, ködös területeken hamarabb jelenik meg a fertőzés, így ezeket a telepítés során kerülni érdemes. Fontos a szellős térállás és a koronaforma megfelelő kialakítása, valamint a fák optimális kondíciója (**Tóth, 2007**).

Régóta ismert, hogy a betegség kialakulásának elkerülése érdekében elengedhetetlen a fertőzési források eltávolítása (**Kern, 1912**). Rügyfakadás előtt távolítsuk el a fertőzött gallyakat, ágrészeket, gyümölcsmúmiákat az ültetvényből vagy forgassuk mélyen a talajba azokat. A tavaszi fertőzés után szintén távolítsuk el a fertőzött hajtásokat, virágokat.

2.5.2. Kémiai növényvédelem

A kémiai növényvédelem a tél végi lemosó permetezéssel kezdődik (**Kern, 1912**). A réz hatóanyagra érzékeny fajoknál (őszibarack, kajszli) feltétlenül rügyfakadás előtt végezzük el a kezelést, a kevésbé érzékeny fajoknál az időjárástól függően meg is ismételtethetjük (**Mező és Schweigert, 2005**).

A virágok megóvása érdekében tavasszal többszöri fungicides kezelés szükséges. **Maring és Lienshöft (2011)** kísérleteik alapján három időpontot határoztak meg a kijuttatás szempontjából: fehérbimbós állapotban (5%-os virágnylás), fővirágzáskor (90%-os virágnylás) és szíromhullás kezdetén. Az időjárástól függően egy-egy kezelés elhagyható, viszont ha csapadékos, hűvös az idő és vontatott a virágzás egy negyedik kezelés is szükséges lehet.

A gyakorlatban a virágfertőzés elleni védekezés igen hatékony, az ültetvényekben alig látható tünet **(Simon, 2007)**. Rengeteg készítmény áll rendelkezésre, megválasztásukkor nagy hangsúlyt kell helyezni az egyes kezelések során használt eltérő hatásmechanizmusú szerek alkalmazására, a hatáscsökkenés veszélye miatt **(Tóth, 2007)**. A hatáscsökkenés összefüggésbe hozható az évenkénti kezelések számával, ezt hazai tapasztalatok is alátámasztják **(Kaptás, 1994)**.

A gyümölcsök megóvásának alapja a gyümölcsöt károsító rovarok elleni védekezés **(Kern, 1912)**. Az időjárási tényezők hatására keletkezett sérüléseket (jégverés, esőzések utáni repedés) azonnal le kell zárni gombaölő szeres permetezéssel, mert a rothadásnak indult termékek, már nem menthetők meg. A felszívódó, transzlokálódó szerek is csak a felső sejtsorokig jutnak **(Tóth, 2007)**. Amennyiben a *Monilinia fructicola* kórokozó jelen van az ültetvényben a sérülésektől függetlenül a gyümölcsök kémiai védelme is szükséges. Ilyenkor az érőfélben lévő termékek védelme érdekében csak rövid élelmezés-egészségügyi várakozási idejű szerek használhatóak, nagy lémenyiséggel kijuttatva, nedvesítőszer hozzáadásával a gyümölcsök teljes lefedése érdekében **(Tóth, 2007)**.

2.5.3. Növényvédő szerek hatékonysága a *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* ellen

Thüringiában **Maring és Lienshöft (2011)** több éven át tartó vizsgálata során különböző növényvédő szereknek *Monilinia* fajokkal szembeni hatékonyságát vizsgálták. Leghatékonyabbnak a Switch bizonyult, amely hűvös és esős időben is hatékony, a Score-t is virágzáskori használatra ajánlják. A Flint és a Signum, mint két strobilurin típusú hatóanyagot tartalmazó szer, összehasonlításában a Flint bizonyult hatékonyabbnak. A Systhane 20 WP hatásának rövid időtartama miatt, a virágok permetezésére kevésbé alkalmas, inkább a termésképződés időszakában ajánlott használata **(1. táblázat)**. A szerzők szerint a Teldor 500 SC hatása virágzáskor korlátozott, mert csak rövid ideig képes megvédeni az állományt. Termés tárolása során viszont ezt a készítményt javasolják **(1. táblázat)**.

1. táblázat: A moniliniás fertőzés megelőzésére felhasználandó mennyiségek az egyes szerekből **Maring és Lienshöft (2011)** nyomán

Készítmény neve	Felhasználandó mennyiség hektáronként a koronamagasság egy méterére vonatkozóan
Flint	0,167 kg
Score	0,075 l
Signum	0,250 kg
Switch	0,300 kg
Systhane 20WP	0,225 l
Teldor 500 SC	0,500 kg

Mándoki és Varga (2011) Hódmezővásárhelyen, a Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Növény- és Talajvédelmi Igazgatóság Biológiai Laboratóriumában végeztek növényvédő szerek kísérleteket *Monilinia fructicola* izolátumokon. Kilenc gombaölő szer, illetve egy növényvédő szernek nem minősülő készítmény hatását elemezték, 5 hígításban tesztelve, mérgezett agarlemez módszerrel. A vizsgált készítményekkel folytatott tesztek igazolták, hogy a monilíniás betegségek ellen korábban alkalmazott szerek a karantén *Monilinia* faj ellen is hatékonyan bevethetők, a fungicidek közötti eredményességbeli különbségek, pedig szintén a korábbiakban tapasztalatokhoz hasonlóan alakultak.

A szerzők szerint kiemelkedő hatékonyságot mutatott a Topsin M 70 WDG, valamint a Folicur Solo. Szintén kiváló hatást értek el Rovral Aquaflow, Bravo 500, Orthocid 50 WP. Teldor 500 SC esetében, csak 1 ppm hígításnál indult fejlődésnek a gomba tenyésztete. A réztartalmú készítmények (Rézoxiklorid 50 WP, Bordói por, Sergomil-L 60) 100 ppm-es koncentrációban bizonyultak hatékonyak, a növényvédő szernek nem minősülő Sergomil-L 60 készítmény (almasavas réz-komplex) a réztartalmú készítmények között figyelemre méltó eredményt hozott. Az azoxistrobin hatóanyagú Amistar eredményeit tekintve gyengébb hatékonyság volt tapasztalható, 1 ppm hígításnál a kontrollhoz képest a telep növekedése 40%-os volt (**Mándoki és Varga, 2011**).

Sződi és mtsai. (2008) *Monilinia laxa* és *Monilinia fructigena* izolátumokat vizsgáltak fungicidérzékenységre. A vizsgálatok során 10 készítményt teszteltek, céljuk a tenyészetek növekedésének gátlásához szükséges legkisebb koncentráció meghatározása volt. Kísérleteiket paradicsomagar táptalajon végezték mérgezett agarlemez módszerrel.

A szerzők megfigyelései szerint a hatóanyagoknál a teljes gátláshoz szükséges koncentráció értéke az egyes izolátumoknál nagymértékben eltért, azonban ez nem függ össze sem a származási hellyel, sem a gazdanövénnel. Legjobb eredményt a benomil hatóanyagú Fundazol adta, ami 2 ppm-es hígításban is teljes mértékben gátolta a tenyészetek fejlődését (**2. táblázat**). A vinklozolin hatóanyagú Ronilan DF 2 ppm-es koncentrációban a legtöbb izolátum növekedését gátolta, míg az iprodion (Rovral 50 WP) és a fenarimol hatóanyagú Rubigan 12 EC 5 ppm koncentráció felett fejtette ki gátló hatását. A triadimefon (Bayleton), procimidon (Sumilex 50 WP) és a kaptán (Orthocid 50 WP) hatóanyagoknak a teljes gátláshoz többszörös mennyiség volt szükséges, de átlagosan nem haladta meg a 20 ppm-et. A boscalid (Cantus), pirimetanil (Mythos) és réz (Cuproxat FW) hatóanyagokból százas nagyságrendű dózisra volt szükség a gátló hatás eléréséhez, a réz hatóanyagból egyes izolátumoknál 1000 ppm fölötti dózis volt szükséges a teljes gátláshoz (**Sződi és mtsai., 2008; 2. táblázat**).

2. táblázat

Monilinia izolátumok növekedésének teljes gátlásához szükséges hatóanyag koncentrációk (Szódi és mtsai., 2008)

A gátláshoz szükséges legkisebb koncentráció (ppm)	Hatóanyagok
0-40	benomil, iprodion, fenarimol, triadimefon, vinklozolin, kaptán, procimidon
50-400	boscalid, pirimetanil
200-1050	réz

2.6. A *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* fajok növényvédő szerekkel szembeni rezisztenciája

A helytelen növényvédő szer használat következtében számos készítménnyel szemben alakult ki rezisztencia világszerte. Rezisztenciát mutattak ki mindkét kórokozónál a dikarboximid, benzimidazol, demetilázinhibitorok és a Qoi (quinone outside inhibitor) csoportokba tartozó szerekkel szemben (Talma és Shabi, 1982; Ritchie, 1983; Elemer és Gaunt, 1994; Sanoamuang és Gaunt, 1995; Thomidis és mtsai., 2009). Ma és mtsai. (2005) alkalmasnak találták a PCR-RFLP módszert a benzimidazol rezisztencia kimutatásához a *M. laxa* kórokozónál. Luo és mtsai. (2007a) vizsgálatai során *M. fructicola* izolátumokból Real-time PCR segítségével mutatták ki a béta-tubulin E198A mutációt, amely a benzimidazol hatóanyaggal szembeni rezisztenciáért felelős.

Hazánkban a 2000-es évek elején merült fel, hogy a *Monilinia laxa* kórokozónak új agresszívabb törzsei, patotípusai jelentek meg (Rozsnyay és Vajna, 2001). Ezt Szódi és mtsai. (2008) vizsgálatai is alátámasztották, melyek során *M. laxa* és *M. fructicola* kórokozók fungicidérzékenységét vizsgálták.

2.6.1. A Qoi rezisztencia

Az 1990 években kifejlesztett Qoi csoportba tartozó fungicidek tagjai a mitokondriális légzést gátolják. Hatásmód alapján ide tartozik a famoxadone, a fenamidone, valamint számos strobil hatóanyag, ezért is nevezik őket gyakran strobilurinoknak (Dula, 2007). Hazánkban 1998 óta alkalmazzák őket, jelenleg is több hatóanyag számos készítménye engedélyezett.

Több növénypatogén kórokozónál mutattak ki az utóbbi években Qoi rezisztenciát. Egy 2011-es kimutatás szerint világszerte összesen 37 kórokozó gombafajnál találtak rezisztens populációkat (Anonymus, 2011), Magyarországon először 2004-ben mutatták ki szőlő kórokozók (*Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*) esetében (Füzi, 2007).

Brent (1995) szerint monogénes rezisztencia alakul ki a strobilurinokkal szemben, azaz egyetlen gén megváltozása felelős a hatásvesztésért. Az ezzel a kérdéssel foglalkozó nemzetközi bizottság (FRAC - Fungicide Resistance Action Committee) a legnagyobb rezisztencia-rizikócsoportha sorolja őket, mivel a hatóanyagok piacra kerülése után 1-3 éven belül egyes kórokozóknál kialakulnak ellenálló populációk (**Kuck és Russell, 2006**). **Dula (2007)** felhívja rá a figyelmet, hogy könnyedén kialakulhat keresztrezisztencia is Qoi csoportba tartozó különböző készítmények között.

Az ellenállóság kialakulásáért a legtöbb esetben a mitokondriumban kódolt citokróm b génben bekövetkező pontmutáció felelős. A citokróm b gén a mitokondriális genomban található, mely egy sejtben, több kópiában is jelen van. Ha a kópiák közt eltérés van, ez a heteroplazmia jelensége, a kópiák között lehet olyan is melyben mutáció vagy mutációk történtek. A leggyakoribb és egyben legveszélyesebb a G143A (glicin-alanin csere) mutáció, itt a GGT kodon GCT kodorra változik. Ezen kívül több helyen létrejöhet a rezisztenciáért felelős aminosav változás (F129L, G137R) (**Miessner és Stammler, 2010**). Az utóbbiak következtében létrejövő változás gyengébb rezisztenciát, toleranciát eredményez. Korlátozott mértékű Qoi rezisztencia más mechanizmusok megváltozásával is létrejöhet, például alternatív respirációs utakon keresztül (**Grasso és mtsai., 2006; Fernández és mtsai., 2008**).

Monilinia fajokban létrejöhetnek a fent említett pontmutációk. A G143A mutáció létrejöttének valószínűsége igen alacsony a *M. laxa* és *M. fructicola* kórokozóknál, de más *Monilinia* fajoknál gyakran kialakul. **Miessner és Stammler (2010)** vizsgálatai szerint közvetlenül a G143-as kodont követő intron szekvencia miatt valószínűleg nem következik be mutáció, mert ez zavarná az mRNS érést, az intron kivágódását. A *M. fructigena* esetén az intron szekvencia nem itt található, így a mutáció kialakulása valószínűsíthető. **Hily és mtsai. (2011)** ugyanezeket állapították meg. Táptalajon piraclostrobin hatóanyag jelenlétében vizsgáltak *M. laxa* és *M. fructicola* izolátumokat és bizonyították a rezisztencia jelenlétét *M. fructicola* izolátumoknál. Azonban amikor a citokróm b gén mRNS-éről készült cDNS szekvenciát meghatározták egyik mutációt sem tudták azonosítani, sem a G143A, sem a kisebb jelentőségű F129L, sem a G137R mutációt. **Jiang és mtsai. (2009)** viszont a *Botrytis cinerea* kórokozó rezisztenciáját vizsgálva azt figyelték meg, hogy ha a G143A mutáció létrejött a citokróm b génben, akkor közvetlenül a pontmutációt követő 1205 bázis hosszúságú intron nem található meg a génben. Hasonló megállapításokra jutottak hazai szerzők is magyar *Botrytis cinerea* izolátumokkal kapcsolatban (**Asadollahi és mtsai., 2010**).

2.7. A *Monilinia laxa* és a *Monilinia fructicola* fajok azonosítása

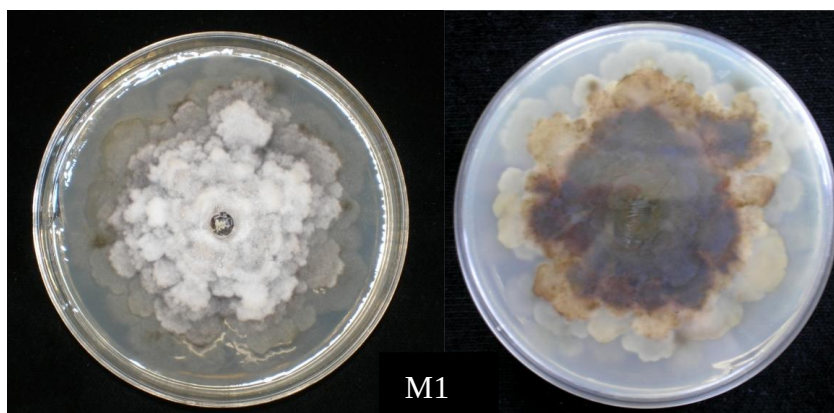
2.7.1. Azonosítás morfológiai- és tenyészbélyegek alapján

A *Monilinia* fajok exogén sztrómáinak mérete és színe fajra jellemző bélyeg (**Wormald, 1954**). A sztrómákon képződő képletek között megkülönböztetnek makro- és mikrokonídiumokat. A makrokonídiumok elágazó láncokban képződnek, holoblasztikus módon (**Willetts és Calonge, 1969**). Hosszúkásak vagy citrom alakúak, nagy tömegben az adott fajra jellemző színűek (**Byrde és Willetts, 1977**), csíratömlőjük hosszúsága szintén faji bélyeg (**van Leeuwen és van Kesteren, 1998**). A mikrokonídiumoknak nem a kórokozó terjedésében van szerepük, csírázásra képtelenek, **Byrde és Willetts (1977)** szerint tápanyagok raktározására szolgálnak.

Mindkét faj sztrómái aprók, szürke színűek, magasságuk 1 mm körüli, átmérőjük 0,5-0,75 mm (**Holb, 2003**). A *M. laxa* konídiumai kisebbek (11,5-17 x 8-11 µm), mint a *M. fructicola* konídiumai (14,5- 16 x 9,5-11 µm) (**OEPP/EPPO, 1988**).

A *Monilinia* fajok tenyésztésére alkalmas a burgonya-dextróz agar táptalaj (**Wormald, 1954**). A táptalajon fejlődő telepek morfológiája (növekedési erély, a telepek mintázottsága, színe, tagoltsága, sporuláció megjelenése) alapján elkülöníthetőek a fajok. Nem minden esetben lehetséges meghatározni az izolátumot egyértelműen a tenyészbélyegek alapján (**van Leeuwen és van Kesteren, 1998; De Cal és Melgarejo, 1999**), ezért az azonosítást molekuláris vizsgálatokkal kell alátámasztani (**OEPP/EPPO, 2009**).

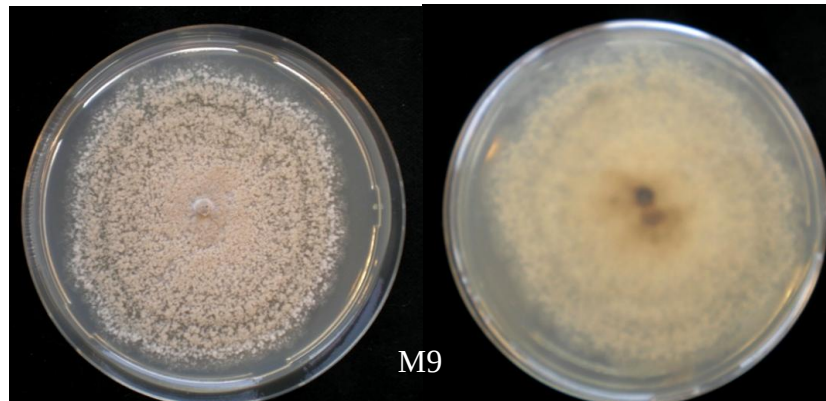
A *M. laxa* telepének növekedési sebessége (2-11 mm/nap) közel fele olyan gyors, mint a *M. fructicola* kórokozóé (**OEPP/EPPO, 2009**). A tenyészetek színe mogyoróbarna, sötétszürke, bennük sötét gyűrűzöttség és rozettáltság figyelhető meg (**Byrde és Willetts, 1977**). **Batra (1991)** leírása alapján szélük csipkés, szabálytalan alakú (**3. ábra**). Sporuláció csak ritkán jelenik meg.



3. ábra: *Monilinia laxa* kórokozóra jellemző tiszta tenyészet (M1-es izolátum)

(Fotó: Lantos, 2011)

A *M. fructicola* telepek átlagos növekedési erélye 9-20 mm/nap (OEPP/EPP0, 2009). Byrde és Willetts (1977) jellemzése alapján a tenyészetek színe mogyoróbarna, ép szélű, rozettáltság csak nagyon ritkán figyelhető meg (4. ábra). Szaporítóképletek gyakran, nagy mennyiségben képződnek, a tenyészetben koncentrikus körökben jelennek meg (Batra, 1991).



4. ábra: *Monilinia fructicola* kórokozóra jellemző tiszta tenyészet (M9-es izolátum)
(Fotó: Lantos, 2011)

2.7.2. Azonosítás molekuláris módszerekkel

Számos módszert dolgoztak ki a *Monilinia* fajok azonosítására, legnagyobb részük PCR (Polymerase chain reaction, Polimeráz láncreakció) alapú eljárás, de léteznek megbízható RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) módszerek is a meghatározásra (Pizzuolo és mtsai., 2006). Ioos és Frey (2000) fajspecifikus primereket terveztek a *M. laxa*, *M. fructicola* és a *M. fructigena* kórokozókra. A primerek a riboszómális RNS-t kódoló DNS-t emelnek ki, az ITS1, ITS2-régiót és a közöttük található 5,8S-gént, egy kb. 350 bázispár hosszúságú fragmentumot az egyes fajoknál. Boehm és mtsai. (2001) fajspecifikus PCR módszert dolgoztak ki a *M. laxa* és *M. fructicola* kórokozókra, a repetitív extrakromoszómális elemeket vizsgálva.

Ma és mtsai. (2003) és Luo és mtsai. (2007b) mikroszatellit primereket terveztek a *M. fructicola* kórokozóra, majd azt felhasználva nested PCR és Real-time PCR módszert dolgoztak ki a kórokozó diagnosztizálására. Côté és mtsai. (2004) multiplex PCR módszer segítségével azonosítottak *Monilinia* fajokat, egy ismeretlen funkciójú genomi rész segítségével. Gell és mtsai. (2007) Scar-markerek alapján terveztek primereket és használtak fel PCR módszerrel történő azonosításra. Egyéb a *M. fructicola* kórokozóra specifikus primereket is terveztek (Förster és Adaskaveg, 2000; Hughes és mtsai., 2000).

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgálatok helyszíne és ideje

A kórokozók izolálását, azonosítását, morfológiai és tenyészbélyegeinek jellemzését, a patogenitási tesztek, a növényvédő szerek hatékonyságával kapcsolatos vizsgálatokat, valamint rezisztenciával kapcsolatos molekuláris vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztem 2011-2012 során.

3.2. A vizsgálat anyaga

3.2.1. Az izolátumok

A monilíniás tüneteket mutató növényi részeket 2011. április-október között gyűjtöttük Magyarország különböző területeiről (**3. táblázat**). A hazai ültetvényekből nem sikerült a karantén *Monilinia* fajt izolálnunk, ezért bevontunk a vizsgálatba olasz importból származó szilvaterméseket is (M9), amelyekről a tünetek alapján feltételeztük, hogy a kórokozó *Monilinia fructicola* lehet (**5. ábra**).

3. táblázat

A vizsgálatok során felhasznált izolátumok jellemző adatai

Izolátum kódja	Gazdanövény	Növényi rész	Gyűjtés helyszíne	Gyűjtés ideje
M1	<i>Prunus avium</i>	virág és hajtás	Törökbálint	2011. 05.
M2	<i>Armeniaca vulgaris</i> 'Ceglédi óriás'	virág és hajtás	Szigetszentmiklós	2011. 04.
M3	<i>Prunus cerasus</i>	virág és hajtás	Baracska	2011. 05.
M4	<i>Prunus cerasus</i> 'Biggareau Burlat'	virág és hajtás	Sukoró	2011. 05.
M5	<i>Prunus cerasus</i>	virág és hajtás	Balassagyarmat	2011. 06.
M6	<i>Prunus vulgaris</i> 'Besztercei'	zöld termés	Gödöllő	2011. 06.
M7	<i>Prunus tenella</i>	virág és hajtás	Budapest	2011. 06.
M8	<i>Prunus cerasus</i>	virág és hajtás	Baja	2011. 06.
M9	<i>Prunus salicina</i>	termés	Budapest (olasz import)	2011. 11.



5. ábra: *Monilinia fructicola* jellegzetes mogyoróbarna sztrómái japánszilva terméseken (M9-es izolátum)
(Fotó: Lantos, 2011)

3.2.2. Táptalaj

A kórokozók izolálásához, fenntartásához és a fungicidekkel végzett hatásvizsgálatok során, steril burgonya-dextróz agar (PDA) táptalajt használtunk. 39 g szilárd PDA keveréket (Reanal Zrt.) oldottunk desztillált vízben, 1000 ml össztérfogatra hígítva.

3.2.3. Eszközök

A kórokozók vizsgálata során Leica MZ6 sztereomikroszkópot és Nikon Eclipse 50i citoplaszt mikroszkópot használtunk. A mikroszkópikus fotókat QImaging MicroPublisher 5.0 RTV típusú kamerával készítettük. Az izolátumok molekuláris azonosítása során Applied Biosystems 9700 típusú PCR-készüléket használtunk. A nukleinsav koncentrációt NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) készülékkel mértük meg. A strobilurin hatóanyagokkal szembeni rezisztencia vizsgálatok során StepOnePlus Real-time PCR (valós idejű PCR, Applied Biosystem) készüléket használtunk.

3.2.4. Növényvédő szerek

A két *Monilinia* faj ellen hazánkban engedélyezett növényvédő szerek hatékonyságát vizsgáltuk, valamint a strobilurin típusú hatóanyag csoportból azoxistrobint és trifloxistobint tartalmazó készítményeket is bevontuk a vizsgálatokba (**4. táblázat**). Utóbbi hatóanyag 2012-től engedélyezve van egyes csonthéjas kultúrákban.

4. táblázat

A felhasznált növényvédő szerek neve, hatóanyaga, gyártója és forgalmi kategóriája **Ocskó és mtsai. (2011)** nyomán

Növényvédő szer	Hatóanyag	Gyártó	Forgalmi kategória
Chorus 50 WG	500 g/kg ciprodinil	Syngenta	III.
Cupertine M	20% réz+ 8% mankoceb	Industrias Quimicas	III.
Flint Max	500 g/kg tebukonazol + 250 g/kg trifloxistrobin	Bayer	I.
Funguran-OH 50 WP	77% rézhidroxid	Spiess-Urania	III.
Mirage 45 EC	450 g/l prokloráz	Makhteshim	II.
Nordox 75 WG	86% réz(I)oxid	Nordox	III.
Orius 20 EW	200 g/l tebukonazol	Makhteshim	II.
Pluto 50 WP Rézoxiklorid	86% rézoxiklorid	Agri-Estella	III.
Quadris	250 g/l azoxisrobin	Syngenta	III.
Rovral Aquaflow	500 g/l iprodion	BASF	I.
Signum WG	270 g/kg boscalid + 70 g/kg piraklostrobin	BASF	II.
Switch 62,5 WG	250 g/kg fludioxonil + 75 g/kg ciprodinil	Syngenta	III.
Systhane Duplo	450 g/l miklobutanil	Dow AgroSciences	II.
Teldor 500 SC	500 g/l fenhexamid	Bayer	III.
Topsin-M 70 WDG	700g/kg tiofanát-metil	Tamico	I.
Vitra Rézhidroxid	77% rézhidroxid	Industrias Quimicas	III.

3.2.5. Primerek, enzimek

Primerek a *Monilinia* fajok azonosításához

A molekuláris meghatározáshoz *Monilinia* fajokra specifikus primereket használtunk. A primereket **Petróczy és mtsai. (2012)** tervezték egy ismeretlen feladatú, nem kódoló genomi szekvencia feltérképezésére.

UniMon_Forw: 5' – TTG AAT TCA TCG GCT TGG GAG CGG – 3'

UniMon_Rev: 5' – AAG GAT CCG AGC AAG GTG TCA AAA CTT CCA T – 3'

Primerek a rezisztencia vizsgálatához

A valós idejű PCR vizsgálatához két primer szettet rendeltünk:

A strobilurin rezisztenciát okozó pont mutációra tervezett primer szett:

Forward: 5'-ACT GAC GGG TGT CTG AAA TGA TAC TTA ATG-3'

TaqMan próba: 5'-GAC ATT TGA CCG TAA GGT AA-3'

Reverse: 5'-GCA GAA TAC AAA ATG TAG ATA CTG ACA TGT CAA TAG-3'

Általános primer szett (6. ábra):

Forward: 5'-ACT GAC GGG TGT CTG AAA TGA TAC TTA ATG-3'

TaqMan próba: 5'-GAC ATT TGA CCG TAA GGT AA-3'

Reverse: 5'-GCA GAA TAC AAA ATG TAG ATA CTG ACA TGT CAA TA-3'

5'-TCGCGACAGGCTGGGTC**ACTGACGGGTGTCTGAAATGATACTTAATG**TACAGTCG
AAGTATTTAGTTATAGAATATGACTAATAGAATATACGAATTCAAAGTTATTCTAGCTTT
TTATAAATGTCTTTTAATTTATATTAAGTATATTTGTATGTT**TTACCTTACGGTCAAATGT**
CGCTATGAGGTATTGACATGTCAGTATCTACATTTTGTATTCTGCCTGTTCTGCTGGGAT
TAACCAGATAAAAGGGTTATGGCTATGTTTATTGGGTTTA-3'

6. ábra: A *Monilinia laxa* citokrómb gén szekvenciájának részlete és a hozzá tervezett primerek (általános primer szett, piros színnel a forward, zölddel a TaqMan próba primert, kékkel a reverz primer helyét jelöltük a pozitív DNS szálon)

Enzimek

A polimeráz láncreakcióban felhasznált Taq polimeráz enzimet (5 u/μl) és annak pufferét, 10x-es Taq puffer+KCl-MgCl₂ (pH: 8,8 25 °C-on) a Fermentas cégtől szereztük be.

A Real-time PCR során Taqman Universal Master Mix II, with UNG-t (Applied Biosystems) használunk, amely tartalmazza a puffert, nukleotidokat és a polimeráz enzimet is.

3.3. A vizsgálat módszere

3.3.1. A kórokozók izolálása és a tenyészetek fenntartása

A monilíniás tüneteket mutató növényi részeket papírzacsókba gyűjtöttük, majd a vizsgálatokig 4 °C-on, hűtőszekrényben tároltuk. Az izolálás megkezdése előtt fénymikroszkóppal vizsgáltuk őket, szaporítóképleteket keresve. Amennyiben nem találtunk szaporítóképletet a növényi részen, 2-4 napra nedves kamrába helyeztük, a főtünet megjelenéséig. A megjelenő exogén sztrómákról steril lándzsátű segítségével konídiumokat emeltünk le, majd steril PDA táptalajra helyeztük őket.

A tenyészeteket 24 °C-on, sötétben, termosztátban inkubáltuk, majd egy hét elteltével tiszta tenyészeteket hoztunk létre belőlük. Az átoltás során dugófúróval 5 mm átmérőjű, micéliummal átszőtt táptalajkorongokat helyeztünk steril táptalajra. A tiszta tenyészeteket a fent említett körülmények között inkubáltuk, majd miután a tenyészet benőtte a Petri-csészét, hűtőszekrényben tároltuk őket.

3.3.2. A morfológiai- és tenyészbélyegek értékelése

A morfológiai bélyegek leírása során vizsgáltuk a monilíniás tüneteket mutató növényi részeken megjelenő exogén sztrómák méretét, színét, valamint a sztrómákon képződő konídiumok méretét, alakját.

A tenyészbélyegek vizsgálata során megállapítottuk a tenyészetek színét, mintázottságát, alakját, a képződött légmicélium mennyiségét, valamint, azt, hogy a táptalaj felületén jelentek-e meg szaporítóképletek. Kiszámoltuk továbbá a tenyészetek növekedési ütemét is (mm/nap).

3.3.3. Molekuláris biológiai módszerekkel történő azonosítás

A kórokozó molekuláris biológiai meghatározásához a minták örökítő anyagát vizsgáltuk. Az izolátumok tenyészetéből CTAB módszerrel vontuk ki a DNS-t, amelyet ezután polimeráz láncreakcióval vizsgáltunk.

Össznukleinsav kivonása

Az össznukleinsav kinyeréséhez a kórokozó tiszta, növekvő tenyészetének 5 mm-es korongjait (2 db) használtuk fel. A micéliumkorongokat lándzsátűvel leválasztottuk a táptalajról, majd dörzsmozsárban kvarchomok segítségével eldörzsöltük. 800 µl CTAB puffer hozzáadása után Eppendorf csövekbe öntöttük át az elegyet, majd 45 percig 65 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk. A nukleinsavak kinyeréséhez kloroform/izoamil-alkohol-extrakciót végeztünk, 24:1 arányú eleggyel.

A felső fázist tiszta Eppendorf csőbe átpipettáztuk, majd megismételtük az extrakciót, majd izopropanollal kicsaptuk a nukleinsavakat. Újabb 5 perces centrifugálást követően leöntöttük a felülúszót. A pallethez 70%-os etanolt adtunk, majd 5 perces centrifugálás után ismét leöntöttük a felülúszót. A pelletet szárítottuk, majd 30 µl 10 µg/ml RNase-t tartalmazó TE-oldatba szuszpendáltuk (Maniatis és mtsai., 1989).

Polimeráz láncreakció (PCR)

Reakciónként az alábbi összetételű, 50 µl végtérfogatú elegy szükséges:

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

A PCR készülékben az alábbi programot állítottuk be:

Az elsődleges denaturáció (94 °C-on 3 perc) után az alábbi ciklus ismétlődött 35-ször:

- 94 °C-on 3 percig DNS denaturációs szakasz,
- 55 °C-on 0,5 percig anellálási (primer kötési) szakasz,
- 72 °C-on 2 percig elongációs szakasz.

Végül 10 percig 72 °C-on az elmaradt szálak befejezésével lezárult a folyamat. A PCR terméket a későbbiekben -20 °C-on tároltuk.

A különböző hosszúságú szakaszok elválasztásához a PCR-termékeket GelRed-et tartalmazó 1%-os agaróz gélben futtattuk meg, a következő összetételben: 5 µl PCR-termék, 3 µl 1x-es festék.

A felhasznált primerpár a különböző *Monilinia* fajokból (*M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, *M. polystroma*) különböző hosszúságú fragmentumokat emel ki, amely felhasználható a fajszintű meghatározáshoz és a tenyészetek tisztaságának ellenőrzésére egyaránt. A primerek által kiemelt szakasz a *M. laxa* esetén 397 bázispár, a *M. fructicola* esetén 620 bázispár hosszúságú (Petróczy és mtsai., 2012).

3.3.4. Patogenitás vizsgálata

A Koch posztulátumok értelmében a betegséget okozó kórokozó tenyésztésének képesnek kell lennie megfertőzni fogékony gazdaszervezeteket és az eredetihez hasonló tüneteket kiváltani azokon. Ennek igazolása érdekében patogenitási tesztet végeztünk. A patogenitási teszthez, valamint a növényvédő szerek vizsgálatokban felhasznált konídiumok előállításához *Prunus domestica* 'Besztercei' terméseket használtunk fel, melyeket technológiai érettségben szüreteltünk egy törökbálinti házikertben 2011 és 2012 augusztusában. A szilvaterméseket fertőtlenítés céljából 1 percre 70%-os alkoholba helyeztük, majd steril desztillált vízben leöblítettük. Száradást követően használtuk fel őket.

Lamináris fülkében izolátumonként 10-10 termést fertőztünk meg. A gyümölcsökön steril lándzsával 'V' alakú sebet ejtettünk. Ez alá helyeztük a növekvő tenyészet széléből származó, 3 mm-es, micéliummal átszőtt táptalajkorongot (**7. ábra**). A kontroll esetében a fertőzött gyümölcsökhöz hasonlóan sebet ejtettünk az epidermiszen, amelybe steril PDA korongot helyeztünk. A fertőzött és a kontroll szilvákat nagyméretű, steril csíráztató edényekbe helyeztük, steril üveggolyókra. Az üveggolyók alá steril vizet töltöttünk, a páratartalom biztosítása érdekében.

A tüneteket 7 nap elteltével értékeltük. Megfigyeltük, hogy milyen tünetek jelennek meg a terméseken. Feljegyeztük a rothadás mértékét, az exogén sztrómák színét, mennyiségét, a képződött légmicélium mennyiségét, majd a kórokozót újra izoláltuk PDA táptalajon.



7. ábra: Szilva termés mesterséges fertőzése patogenitási teszthez, majd inkubálása nedves kamrában

(Fotó: Petróczy, 2011)

3.3.5. Növényvédő szerekkel végzett hatásvizsgálatok

A növényvédő szereket két szempontból vizsgáltuk: teszteltük a kórokozó micéliumának növekedésére, valamint a kórokozó konídiumainak csírázására gyakorolt hatásukat. Két koncentrációban vizsgáltuk a készítményeket (**5. táblázat**), az engedélyokiratban szereplő, termelők által is alkalmazott gyakorlati dózisban (**Ocskó és mtsai., 2011**), valamint ennek tízszeres

hígításában. A vizsgálatok adatait statisztikai módszerek és az SPSS programcsomag segítségével elemeztük, amiből következtethettünk az egyes szerek hatékonyságára, valamint az izolátumok szerekre való érzékenysége közötti különbségekre.

5. táblázat

A növényvédő szerek felhasznált dózis

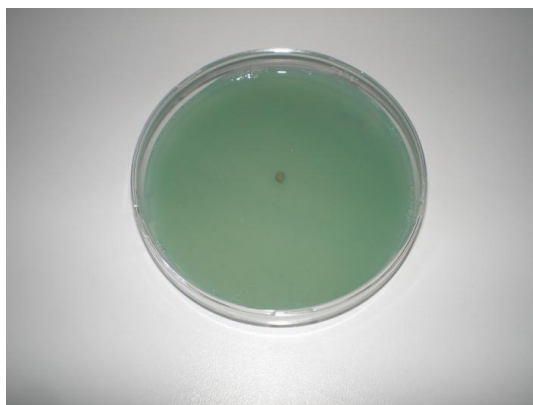
Növényvédő szer neve	Gyakorlati dózis (ml/l)	10x-es hígítás (ml/l)
Mirage 45 EC	0,50	0,05
Orius 20 EW	0,90	0,09
Quadris	1,00	0,10
Rovral Aquaflow	1,00	0,10
Systhane Duplo	0,13	0,013
Teldor 500 SC	1,00	0,10

Növényvédő szer neve	Gyakorlati dózis (g/l)	10x-es hígítás (g/l)
Chorus 50 WG	0,40	0,04
Cupertine M	5,00	0,50
Flint Max	0,45	0,045
Funguran-OH 50WP	3,00	0,30
Nordox 75 WG	1,70	0,17
Pluto 50 WP	0,75	0,075
Réxoxiklorid		
Signum WG	1,00	0,10
Switch 62,5 WG	0,8	0,08
Topsin-M 70 WDG	1,00	0,10
Vitra Rézhidroxid	2,50	0,25

3.3.5.1. A tenyészetek növekedésére kifejtett hatás

A növényvédő szerek tenyészetnövekedésre kifejtett hatását mérgezett agarlemez módszerrel vizsgáltuk. Kézmélet, steril táptalajhoz kevertük a készítményeket a kétféle dózisban. A megszilárdult táptalaj közepére 3 mm átmérőjű micéliummal átszőtt táptalajkorongot helyeztünk **(8. ábra)**, amely a kórokozó növekvő, tiszta tenyészeiből származott. A mérgezett táptalajú

tenyészetek mellé kontroll tenyészeteket is készítettünk, melyek nem tartalmaztak növényvédő szert. Izolátumonként és hígításonként 2-2 ismétlést készítettünk. A tenyészeteket 24 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk, míg a kontroll lemez felületét teljesen benőtte a gomba micéliuma. Ekkor értékeltük a mérgezett agarlemezeken a micélium növekedését. Milliméter pontossággal egymásra merőleges irányban, két átmérőt mértük.



8. ábra: Mérgezett agarlemez módszer kísérleti elrendezése (Fotó: Lantos, 2011)

3.3.5.2. A konídiumok csírázására kifejtett hatás

A vizsgálathoz szükséges konídiumokat szilvatermések mesterséges fertőzésével állítottuk elő a patogenitási tesztben leírt módon (**3.3.4. fejezet**), majd a csíráztató edényeket megvilágítás alá helyeztük a fitotronba, mert a *M. laxa* kórokozó esetében a fény elősegíti a konídiumok képződését.

Egy hét elteltével steril vizes szuszpenziót készítettünk a konídiumokból és Bürker-kamra segítségével 4×10^6 db/ml konídium koncentrációt állítottunk be. Eppendorf csövekbe 900 µl steril vízhez 100 µl konídium szuszpenziót adtunk, majd hozzákevertük a növényvédő szereket kétféle dózisban. A kezeletlen kontroll esetében a konídiumokat steril vízben csíráztattuk. A konídiumok csírázásának elősegítésére 24 órás, mesterséges megvilágítás alá helyeztük őket. Az eredményeket 36 óra elteltével értékeltük, kétszer 50 db konídium csírázását vizsgáltuk.

3.3.5.3. A hatásvizsgálatok értékelésénél alkalmazott statisztikai módszerek és programcsomag

Összehasonlító vizsgálatok

Az eredmények statisztikai kiértékelésére az SPSS 20 programcsomagot használtuk. Az SPSS felhasználóbarát statisztikai szoftver, mely klasszikus és modern statisztikai módszereket egyaránt tartalmaz. Előnye, hogy a feltételek hiányában nem használható hagyományos módszerek helyett más módszerek alkalmazására is lehetőséget kínál.

Összehasonlító vizsgálataink során a hagyományos, paraméteres módszerek (egytényezős varianciaanalízis) alkalmazásához néhány esetben kevés adat állt rendelkezésre a megbízható

következtetéshez és a minták adatainak normalitása, valamint a szóráshomogenitás gyakran sérült, ezért a nekik megfelelő nemparaméteres módszerek használata is indokolt volt. Az összehasonlításokat 95%-os szignifikancia szinten végeztük.

Többváltozós varianciaanalízist használtunk, mert több kvantitatív tulajdonság figyelembe vétele alapján (a kezelések hatékonysága) kívántuk kimutatni a 9 vizsgált izolátumra kifejtett hatás közötti különbségeket. Vizsgálatunk során a kezeletlen kontroll, 16 növényvédő szerrel, valamint a készítmények 10x-es hígításával való kezeléseket hasonlítottuk össze a tenyészetek micéliumának növekedésére, valamint az izolátumok konídiumainak csírázására gyakorolt hatás alapján. Az általános lineáris modell szimultán összehasonlítás módszere (multiple comparison) különösen a nemparaméteres esetben nagy jelentőségű, amikor szórásanalízisre, azaz normalitást feltételező eljárásra nem kerülhet sor. A varianciaanalízist kiegészítő középérték összehasonlító tesztek közül a **Tukey-féle** szignifikáns differencia ún. **post hoc analízist** végeztük, létrehozva az izolátumok (illetve növényvédő szerek) homogén csoportjait a növényvédő szerekre való érzékenységük (illetve szerek hatása) alapján. A csoporton belüli varianciák egyezőségét a **Levene-teszttel** ellenőriztük, és szükség esetén a mintaelem számok és szórások azonosságát nem feltételező **Games-Howell próbát** alkalmaztuk. Az analízis eredményeit táblázatos formában foglaltuk össze. A táblázatban különböző betűvel jelöltük a szignifikánsan különbözőket, az abc- sorrend a mért értékek növekvő sorrendjét jelzi.

A csoportosítás statisztikai módszere

A 9 vizsgált izolátum növényvédő szerekre való érzékenység szerinti csoportosítását **hierarchikus klaszteranalízissel**, az összehasonlításokat pedig **varianciaanalízissel** végeztük. A következtetéseket 95%-os szignifikanciaszinten vontuk le. A hierarchikus osztályozás esetében lépcsőről lépcsőre haladunk, és mindig két klaszter (készítmény-csoport) összevonásával csökkentjük a klaszterek számát. A kapott dendrogramról leolvasható az izolátumok közötti hasonlóság mértéke. Lehetőség nyílik annak megállapítására is, hogy mely készítmények (és milyen hígításuk) határozzák meg leginkább a különböző klaszterekbe való besorolást, illetve melyek azok, amelyek nem meghatározóak.

3.3.6. Citokróm b gén vizsgálata Real-time PCR módszerrel

A citokróm b génben, a 143-as aminosavban esetlegesen jelentkező (guanin → citozin) pontmutáció vizsgálatára, mely a strobilurin típusú hatóanyagokkal szembeni rezisztenciáért felelős, primereket terveztük a nemzetközi adatbázisban fellelhető szekvenciák alapján, a Real-time PCR vizsgálathoz. A primerek tervezése során a TaqMan próbát választottuk. A vizsgálathoz két primer

mixet rendeltünk **(3.2.5. fejezet)**. A szenz és a próba primer megegyezik minkét esetben. Különbség az antiszenz primerek esetében van a két primer szett között. Antiszenz primerből kettőt terveztünk, az egyik csak a pontmutációt tartalmazó mitokondriális DNS-ből emel ki egy 203 bp hosszúságú szakaszt, míg a másik egyaránt specifikus a mutációt hordozó és nem hordozó mitokondriális DNS-re.

A mutációra tervezett reverz primer 3' végén található utolsó bázisa (G) éppen komplementer a pontmutáció megváltozó bázisával (C), tehát csak abban az esetben tud az indítószekvencia tökéletesen kapcsolódni, ha a pontmutáció jelen van a mitokondriális DNS bizonyos hányadában. Ha egyáltalán nem található meg a mitokondriális DNS-ben a pontmutáció (G van az adott pozícióban), nem keletkezik PCR termék a reakció során, hiszen az indítószekvencia utolsó nukleotidja nem tud párosodni a célszekvenciával, így az enzim nem képes megkezdeni az átírást.

Annak megadására, hogy a mitokondriális DNS-ek hány százaléka hordozza a pontmutációt, szükséges az általános primer szett, amely valamennyi mitokondriális DNS-ből eredményez PCR terméket a mutáció meglététől függetlenül. Azonos feltételekkel egy időben végezve a mennyiségi polimeráz láncreakciót, a két érték arányából következtethetünk arra, hogy milyen mértékben hordozzák az egyes izolátumok a pontmutációt.

A kísérlet elvégzését megelőzően hígítási sort készítettünk a detektáláshoz szükséges optimális DNS koncentráció megállapításához, majd az előtesztelés után 5-10 ng/μl-ben állapítottuk meg a legmegfelelőbb értéket. Valamennyi izolátum esetében 3 ismétlést végeztünk a mérési hiba kiküszöbölésére. A negatív kontrollhoz DNS helyett steril vizet pipettáztunk.

A valós idejű PCR során az alábbi komponenseket mértük össze 10 μl végtérfogatra:

- 1 μl DNS
- 5 μl 2x Master Mix
- 0,5 μl primer mix
- 3,5 μl steril víz

A Real-time PCR készülékben az alábbi programot állítottuk be:

- 50 °C-on 2 perc: a polimeráz enzim hővel történő aktiválása
- 95 °C-on 5 perc: elsődleges denaturáció.

Majd 40 cikluson keresztül az alábbi két lépés ismétlődött:

- 95 °C-on 15 másodperc: denaturáció
- 60 °C-on 1 perc: anellálási + elongációs szakasz.

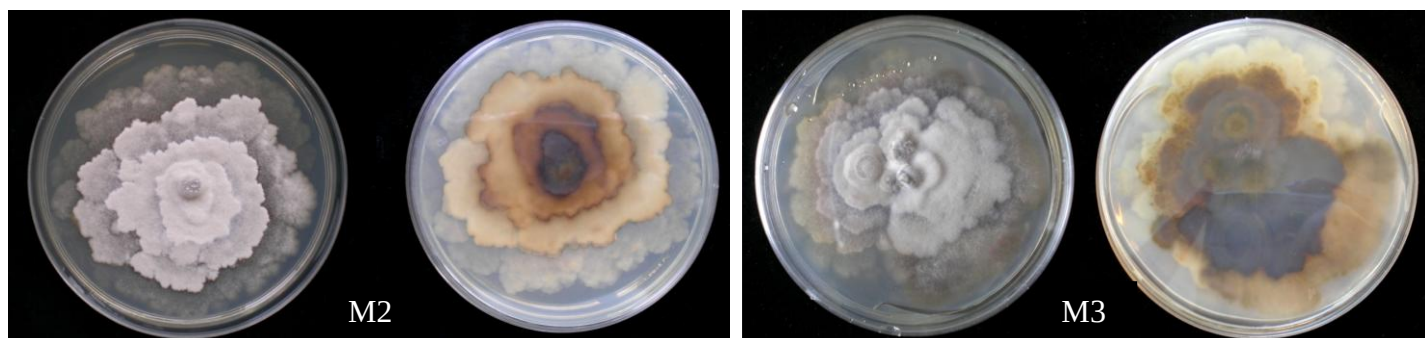
4. Eredmények

4.1. A kórokozók azonosítása morfológiai bélyegek alapján

Az M1-M8 izolátumok exogén sztrómái szürkésbarna színűek voltak, míg az M9-es izolátum esetében inkább világos mogyorószínűk. Mikroszkóp alatt vizsgálva a szaporítóképleteket megállapítottuk, hogy a láncokban képződő konídiumok egysejtűek, oválisak, a *Monilinia* fajokra jellemző méretűek.

Az izolátumok tiszta tenyészeinek jellemzése során, megjelenésüket tekintve két csoportra különültek el azokat. Az egyik csoportba a nyolc izolátumot (M1-M8) soroltunk, amelyeknél minden esetben a leoltási pontból kiinduló zonáltságot figyeltünk meg (**9. ábra**). A telepek barnás színűek és rozettált szerkezetűek voltak, felületükön változó mennyiségű, fehér légmicélium képződött. Szélük csipkés, néhány esetben ép volt. A tenyészetben konídiumképzést nem tapasztaltunk. Tenyészbélyegek alapján az M1-M8-as kóddal ellátott izolátumokat *Monilinia laxa*-ként azonosítottuk.

Az M9-es izolátum tenyészbélyegeit tekintve különbözött a többi izolátumtól. A tenyészetben szabályos gyűrűbe rendeződő zonáltság szintén megjelent, azonban rozettáltság nem alakult ki. A telep fonáka mogyoróbarna színű, széle ép volt. A tenyészet felületén, a fiatal növekvő szegély kivételével, nagy mennyiségben képződtek konídiumok. A tenyészet növekedési üteme igen gyors volt: 12,1 mm/nap. Az M9-es kóddal ellátott izolátumot tenyészbélyegei alapján *Monilinia fructicola* kórokozóként azonosítottuk.

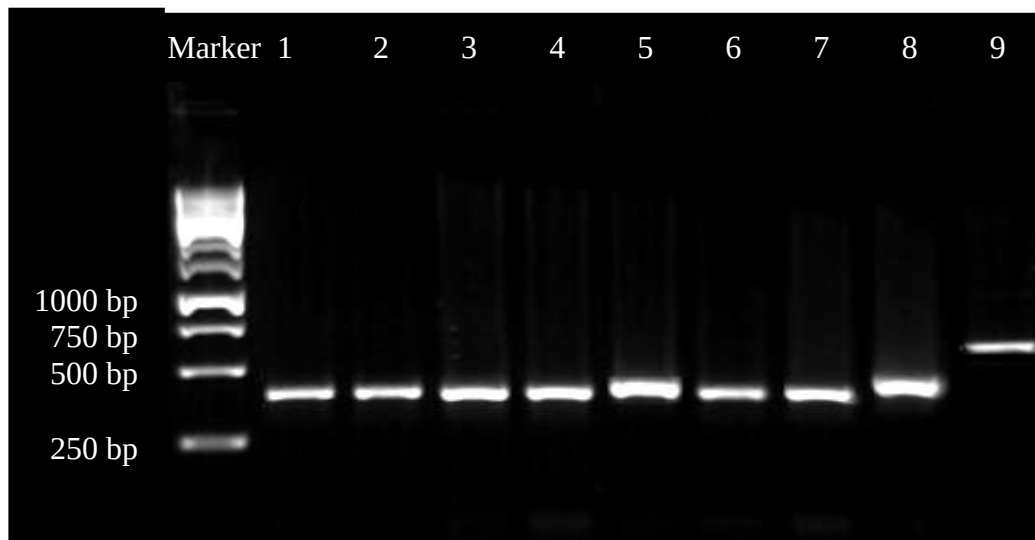


9. ábra: *Monilinia laxa* izolátumok tenyészbélyegei (Fotó: Lantos, 2011)

4.2. A kórokozók azonosítása molekuláris biológiai módszerrel

Az ismeretlen funkciójú genomi régió PCR vizsgálata során a primerpár az izolátumokból két különböző hosszúságú fragmentumot emelt ki: az M1-M8-as izolátumokból közel 400 bázispár hosszúságú szakaszt, míg az M9-es izolátumból kb. 600 bázispár hosszúságú szakaszt (**10. ábra**).

Azaz, a molekuláris azonosítás megerősítette a morfológiai azonosítás eredményeit: az első nyolc izolátum a *Monilinia laxa*, míg az M9-es izolátum a *Monilinia fructicola* fajhoz tartozik.



10. ábra: *Monilinia* izolátumok azonosítása egy ismeretlen funkciójú genomi régiójának PCR vizsgálatával

4.3. A kórokozók patogenitásának igazolása

A megbetegítőképesség vizsgálata során megállapítottuk, hogy valamennyi izolátum tipikus monilíniás tüneteket idézett elő az inokulált szilvaterméseken (**11. ábra**). Az inokulált termésekről sikeresen visszaizoláltuk a kórokozókat, teljesítve a Koch-féle posztulátum feltételeit. A kontroll gyümölcsök egészségesek maradtak az értékelés napjáig.



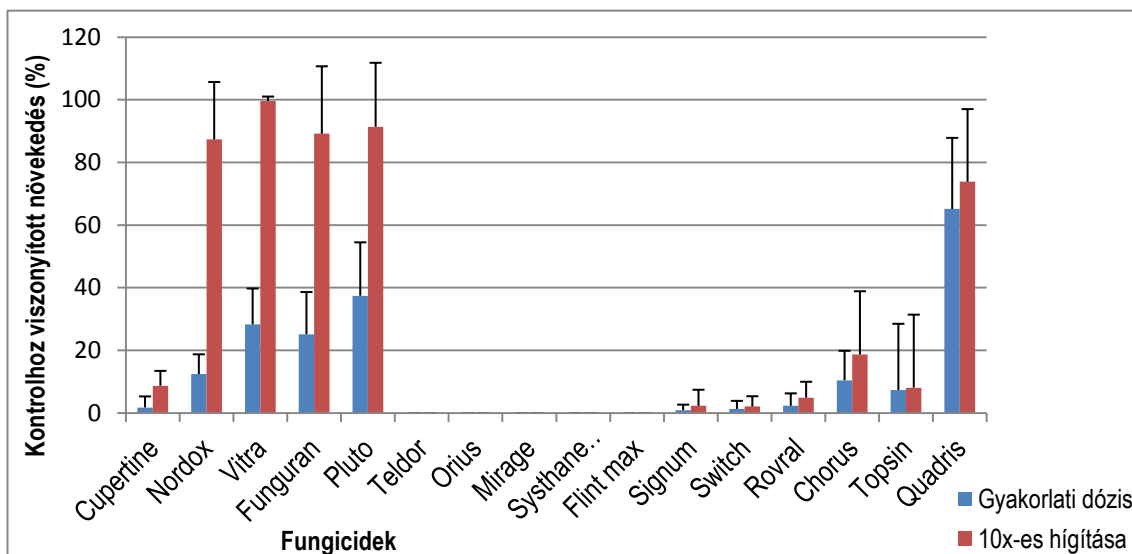
11. ábra: Az M7-es izolátummal mesterségesen fertőzött szilvatermések, az inokulációt követő 7. napon (Fotó: Lantos, 2011)

4.4. Növényvédő szerekkel végzett *in vitro* hatásvizsgálatok

4.4.1. A tenyészetek növekedésére kifejtett hatás

A mérgezett agarlemez módszer alkalmasnak bizonyult a növényvédő szerek micéliumnövekedésre kifejtett hatásának vizsgálatára (**13. ábra**). A készítmények tízszeres hígításánál a gátló hatás minden esetben csökkent a gyakorlati dózishoz képest, kivéve azokban az esetekben, ahol mindkét hígításban fungicid hatást tapasztaltunk (**12. ábra**). A növényvédő

szereknél a legtöbb esetben szignifikáns különbség nem volt kimutatható a két *Monilinia* fajra gyakorolt hatás között, így a két kórokozóra kifejtett hatásukat együttesen értékeltük az adott készítménynek.



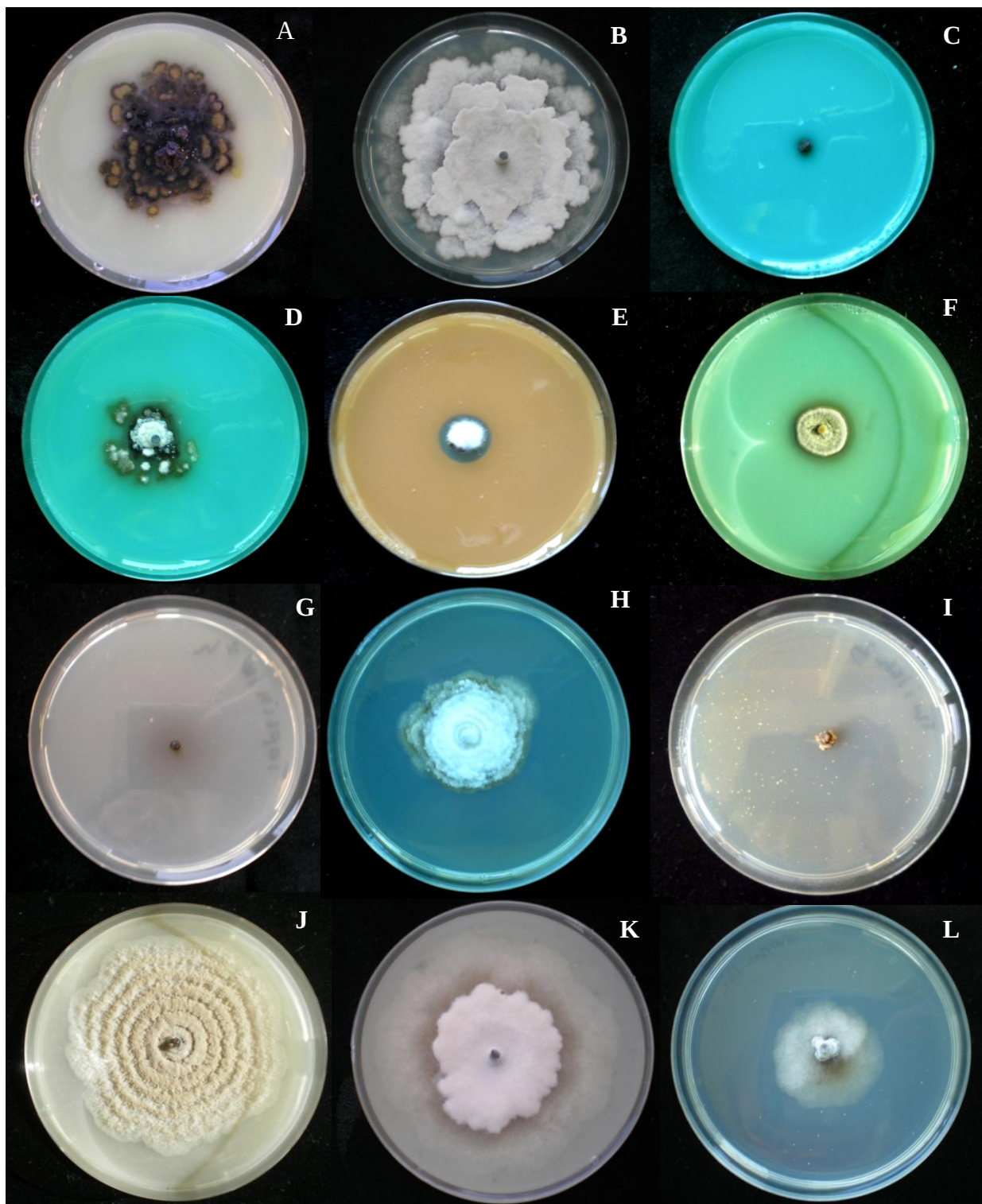
12. ábra: A növényvédő szerek gátló hatása a vizsgált *Monilinia* izolátumok micélium növekedésére (az összes izolátumból számított átlag és szórás értékekkel)

A kontakt és mélyhatású készítmények hatása a *Monilinia* izolátumok tenyésztőnövekedésére

A kontakt hatóanyagú készítmények közül a Cupertine M bizonyult a leghatékonyabbnak (**14. ábra**), amely réz mellett mankoceb hatóanyagot is tartalmaz. A gyakorlati dózis tízszeres hígítása is erősebben gátolta átlagosan a tenyészetek növekedését, mint a kizárólag réz hatóanyagú készítmények gyakorlati dózisa.

A rezet tartalmazó szerek közül a réz(I)oxid hatóanyagú Nordox 75 WG fejtette ki a legerősebb gátló hatást. Hasonló hatékonyságú a két rézhidroxid hatóanyagot tartalmazó Vitra Rézhidroxid és Funguran-OH 50 WP. Legkevésbé a rézoxiklorid hatóanyagú Pluto 50 WP Rézoxilklorid gátolta a micélium növekedését. Fontos megemlíteni, hogy az általunk vizsgált réz hatóanyagú készítmények gátló hatása tízszeres hígításban jelentősen lecsökkent (nem haladta meg a 15%-ot), ezért kijuttatáskor fokozottan ügyelni kell a dózis pontos beállítására és a megfelelő borítottság elérésére (**15. ábra**). A mélyhatású, fenhexamid hatóanyagú Teldor 500 SC mindkét hígítása teljes mértékben gátolta a tenyészetek növekedését.

Összevetve az izolátumokat az összes többi izolátumtól eltérő eredmény legtöbbször az M6-as izolátum és az M9-es izolátum esetében kaptunk, azaz ezekre az izolátumokra hatottak legkülönbözőbben a szerek gyakorlati dózisban (**6. táblázat**). A tízszeres hígítások vizsgálatánál kiemelném, hogy a Vitra Rézhidroxid minden esetben olyan kevésbé gátolta a növekedést, hogy azok között szignifikáns különbség nem is volt kimutatható (**6. táblázat**).



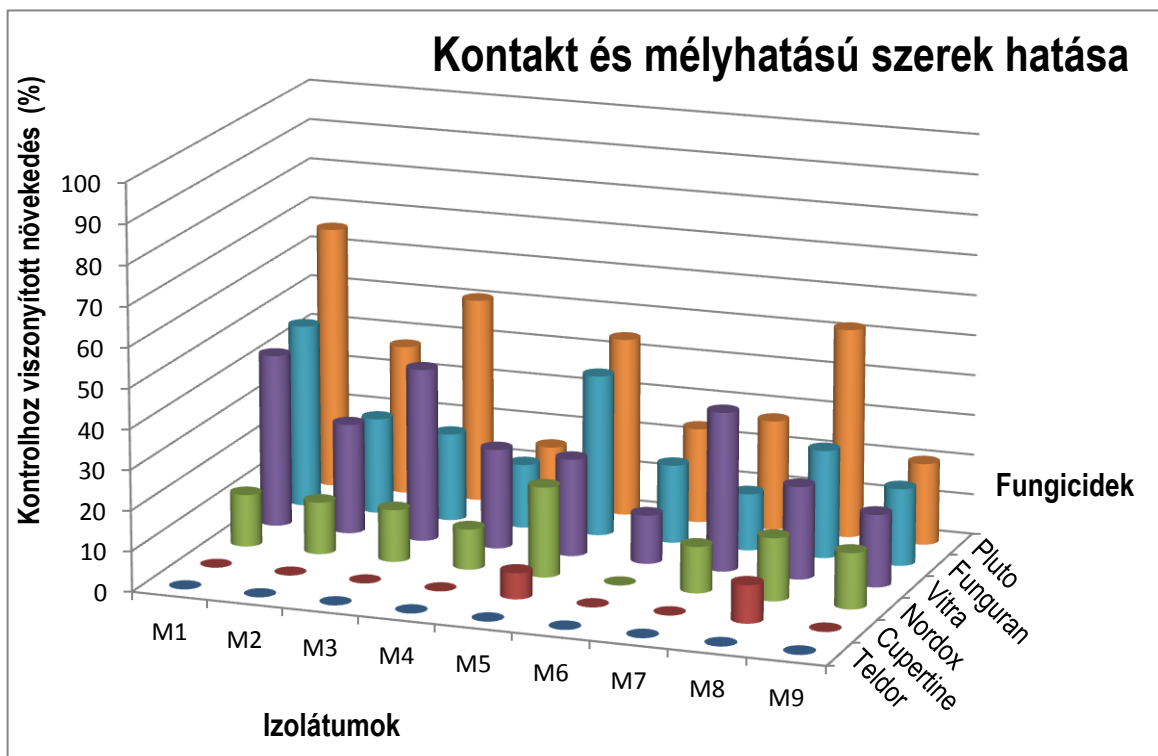
13. ábra: Növényvédő szerek hatása a *Monilinia* izolátumok növekedésére (Fotó: Lantos: 2011)

Magyarázat:

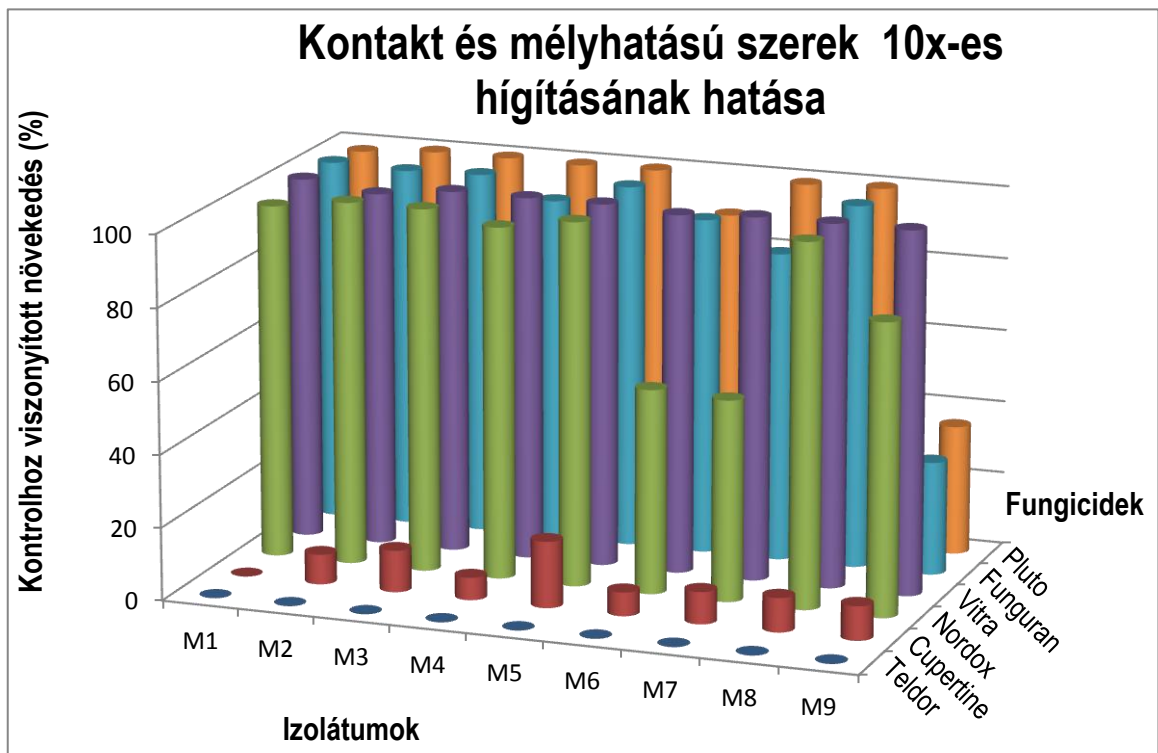
A: M1- Pluto
B: M2- Pluto 10x hígítás
C: M6- Cupertine
D: M2- Funguran

E: M7- Nordox
F: M9- Vitra
G: M4- Topsin
H: M8- Systhane Duplo
10x hígítás

I: M3- Switch
J: M9- Topsin
K: M7- Quadris
L: M5- Chorus



14. ábra: Kontakt és mélyhatású szerek gyakorlati dózisának gátló hatása a *Monilinia* izolátumok tenyészeinek növekedésére



15. ábra: Kontakt és mélyhatású szerek tízszeres hígításának hatása az egyes izolátumok tenészeinek növekedésére

6. táblázat

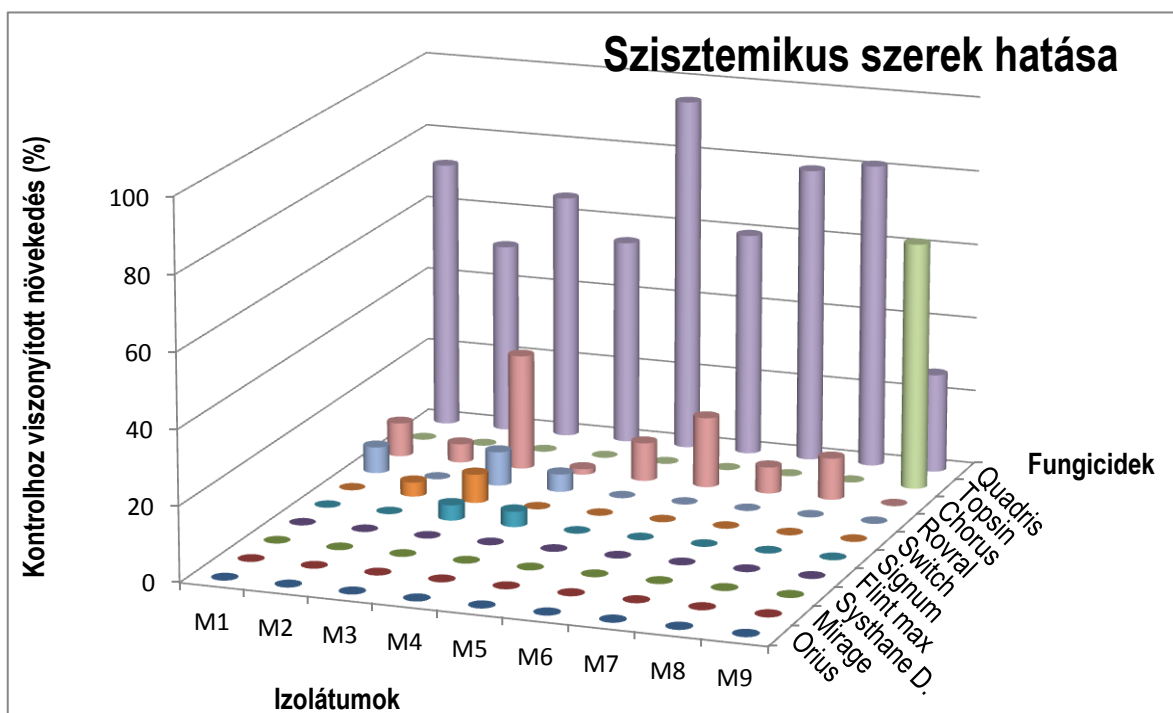
Az izolátumok összehasonlítása a készítményekre való érzékenységük alapján

	Cupertine	Nordox	Vitra	Funguran	Pluto	Cupertine 10x-es	Nordox 10x-es	Vitra 10x-es	Funguran 10x-es	Pluto 10x-es
M1	c	b	c	c	c	a	c	a	d	e
M2	abc	b	b	abc	c	bc	c	a	d	bc
M3	e	b	c	ab	c	d	c	a	d	cd
M4	ab	b	b	a	c	a	c	a	cd	a
M5	c	c	b	bc	c	e	c	a	d	cd
M6	d	a	a	ab	b	bc	a	a	c	ab
M7	bc	b	c	a	c	bcd	a	a	b	ab
M8	c	bc	ab	abc	c	cd	c	a	d	de
M9	a	b	ab	ab	a	cd	b	a	a	a

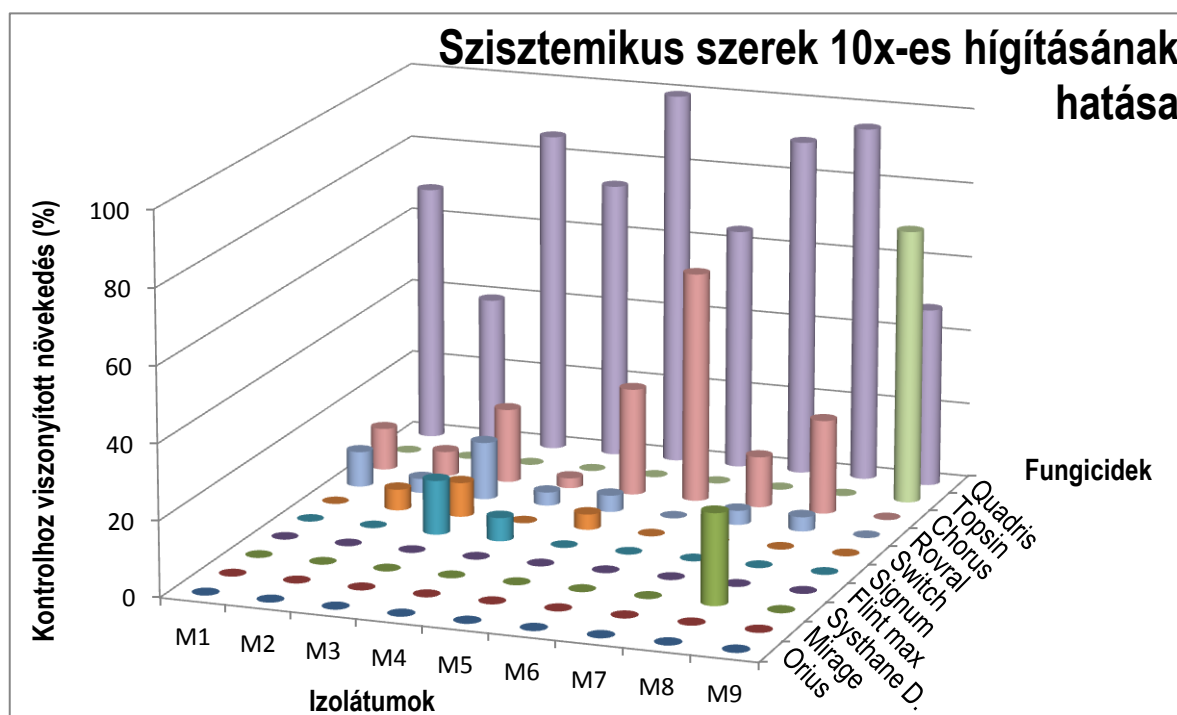
Magyarázat: a többváltozós varianciaanalízis és az általunk alkalmazott kiegészítő módszerek használatával kapott elemzés eredményének értékelésénél, a betűk abc-sorrendje a kontrollhoz viszonyított növekedés mértéke szerinti növekedést jelzi. A növényvédő szerek alatti oszlopokban, ahol a cellákban ugyanaz a betű látható, ott az izolátumokra gyakorolt hatás között nincs szignifikáns különbség. Két mintát szignifikánsan különbözónak akkor tekintünk, ha nem szerepel ugyanolyan betű a cellákban. Az összes többi izolátumtól szignifikánsan eltérő értékeket a táblázatban piros színnel jelöltem.

A szisztémikus hatású készítmények hatása a *Monilinia* izolátumok tenyésztőnövekedésére

A szisztémikus hatású készítmények közül a triazol származékok rendelkeznek a legerősebb gátló hatással (**16. ábra**). Fungicid hatással rendelkező - vagyis a mérgezett agarlemezre leoltott micéliumkorongon elpusztult a gomba - az Orius 20 EW, Flint Max, Mirage 45 EC és a Systhane Duplo gyakorlati dózisban, valamint annak tízszeres hígításában is. Egyedül az M8-as izolátum volt képes fejlődni a Systhane Duplo tízszeres hígításával kezelt táptalajon, de ekkor is egynegyedére csökkentette a telep növekedését a készítmény (**17. ábra**). A Signum WG, Switch 62,5 WG és Rovral Aquaflow készítmények alkalmazásakor több izolátum telepei is növekedésnek indultak, de minden esetben 90%-nál nagyobb mértékben gátolták a növekedést.



16. ábra: Szisztemikus szerek gyakorlati dózisának hatása a tenyészetek növekedésére



17. ábra: Szisztemikus szerek tízszeres hígításának hatása az egyes izolátumok tenyészeinek növekedésére

A Chorus 50 WG a *Monilinia fructicola* kórokozó izolátumának (M9) fejlődését teljes mértékben gátolta tízszeres hígításban is, míg *Monilinia laxa* kórokozó izolátumai (M1-M8) különböző mértékben fejlődtek rajta. A Topsin-M 70 WDG, a Chorus 50 WG-vel ellentétben a

Monilinia laxa kórokozó tenyészeinek fejlődését gátolta, míg a *Monilinia fructicola* tenyészetének növekedését gyakorlati dózisban csak 66%-kal, tízszeres hígításában mindössze 28%-kal csökkentette. A *Monilinia* fajok ellen nem engedélyezett Quadris gátolta legkevésbé a kórokozók fejlődését, valamint ennek a készítménynek a hatása ingadozott a legjobban az egyes izolátumok közti összehasonlításban. Gyakorlati dózisban 5-74%-os gátló hatást fejtett ki.

A szisztemikus szerek (7. táblázat) kevesebb szignifikánsan eltérő csoportba oszthatók, mint a kontakt készítmények (6. táblázat), azaz egységesebben hatnak az izolátumokra. Az összes többi mintától eltérő adat legtöbbször az M3-as izolátumnál szerepel: erre az izolátumra hatnak legkülönbözőbben a szisztemikus szerek különböző hígításai. A *M. fructicola* izolátum (M9) esetén a Topsin-M 70 WDG kivételével, szignifikáns különbség a *M. laxa* izolátumokhoz (M1-M8) képest nem mutatható ki (7. táblázat).

7. táblázat

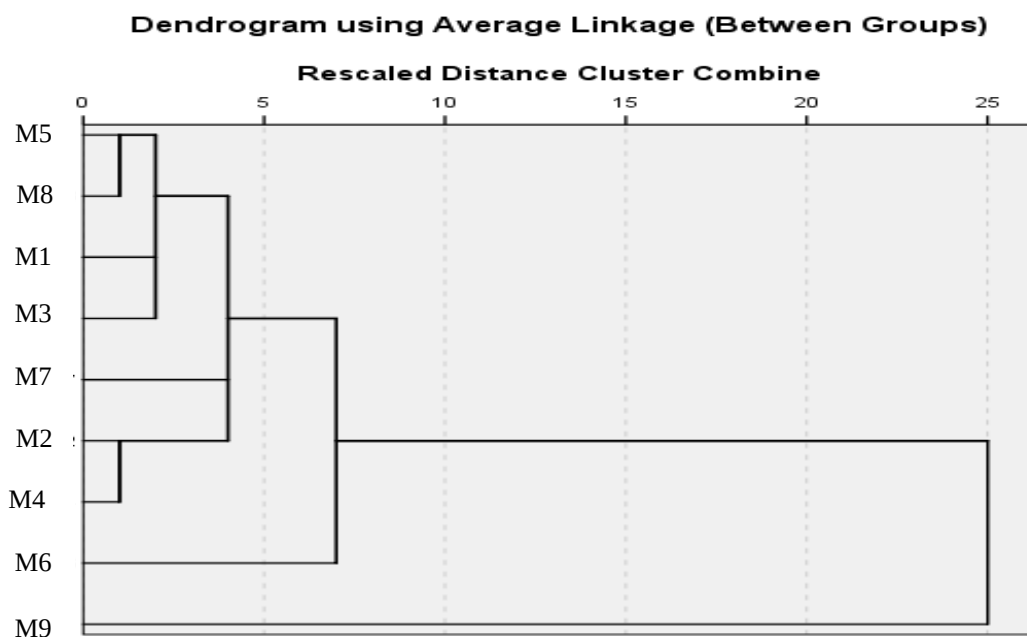
Az izolátumok összehasonlítása a készítményekre való érzékenységük alapján

	Signum	Switch	Rovral	Chorus	Topsin	Quadris	Systhane D. 10x	Signum10x	Switch 10x	Rovral 10x	Chorus 10x
M1	a	a	b	c	a	bc	a	a	a	bc	ab
M2	a	b	a	abc	a	ab	a	a	c	ab	ab
M3	b	c	b	e	a	bc	a	c	d	c	ab
M4	b	a	ab	ab	a	ab	a	b	a	ab	a
M5	a	a	a	c	a	c	a	a	b	ab	b
M6	a	a	a	d	a	b	a	a	a	a	c
M7	a	a	a	bc	a	bc	a	a	a	ab	ab
M8	a	a	a	c	a	bc	b	a	a	a	ab
M9	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a

Magyarázat: a többváltozós varianciaanalízis eredményének értékelésénél, a betűk abc-sorrendje a szórás mértéke szerinti növekedést jelzi. Függőleges oszlopokban, ahol ugyanaz a betű látható, ott az izolátumokra gyakorolt hatás között nincs szignifikáns különbség. Két mintát szignifikánsan különbözónak akkor tekintünk, ha nem szerepel ugyanolyan betű a cellákban. Az összes többi izolátumtól szignifikánsan eltérő értékeket a táblázatban piros színnel jelöltem.

A klaszter analízis során az izolátumok érzékenységeinek hasonlóságát vizsgáltuk a különböző növényvédő szerekre az összes mérési eredmény figyelembe vételével, azaz az összes tesztelt készítmény mindkét hígításának eredményeit összegezve (**18. ábra**).

A dendrogram elemzésből kiderült, hogy az M5-ös az M8-as izolátumok, valamint az M2-es az M4-es izolátumok mutatják a legnagyobb hasonlóságot egymással a fungicidek hatékonyságának mértékében. A *Monilinia laxa* izolátumok (M1-M8) közül az M6-os izolátum reagál a legkülönbözőbb módon a növényvédő szerek kezelésekre, mint ezt már a készítmények gyakorlati dózisának önálló vizsgálatánál is megfigyelhettük. Az izolátumok közül az M9-es különül el leginkább a többi izolátumtól, azaz a *Monilinia fructicola* eltérőbben reagált az egyes fungicides kezelésekre, mint a *Monilinia laxa* izolátumok. A csoportosítás varianciaanalízisének eredményeként kiderült, hogy az izolátumok közötti különbségek kialakításában a Quadris gyakorlati dózisának, valamint a Funguran-OH 50 WP és a Pluto50 WP Rézoxiklorid tízszeres hígításának van a legnagyobb szerepe.



18. ábra: A klaszteranalízis során, az egyes készítmények izolátumok növekedésére gyakorolt hatása alapján megállapított hasonlóságok és eltérések ábrázolása dendrogramon

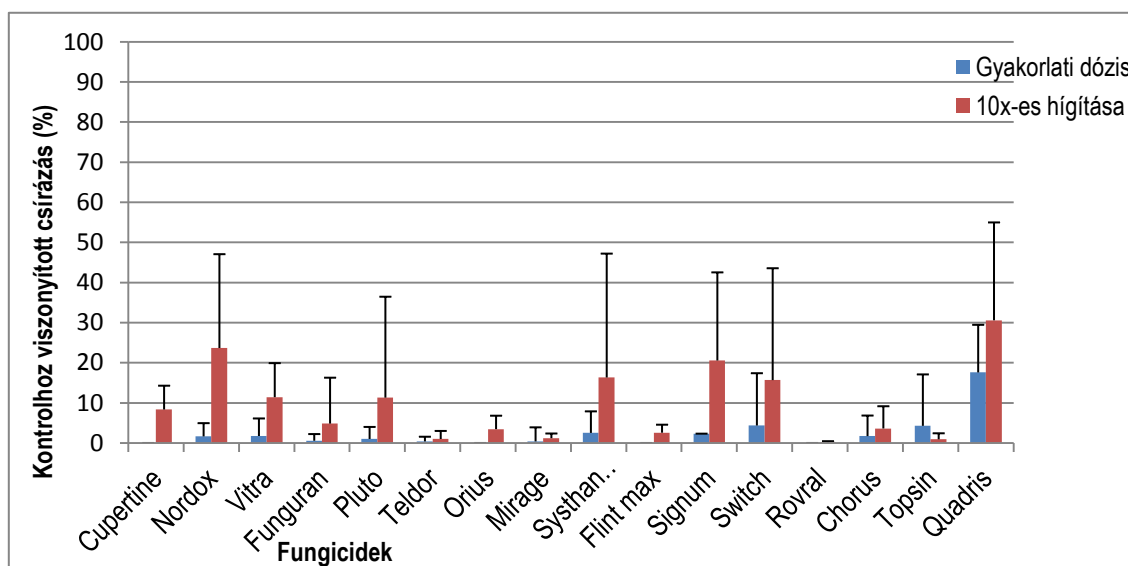
Magyarázat: A vízszintes vonalak hosszúsága a minták különbözőségének mértékét jelzik, míg függőleges vonallal a hasonlóknak tekinthetők (az egy csoportba tartozók) vannak összekötve, a hasonlóság a kiindulási ponttól való távolság növekedésével csökken.

4.4.2. A konídiumok csírázására kifejtett hatás

A növényvédő szerek konídiumok csírázására kifejtett hatását értékelve megállapítható, hogy gyakorlati dózisban minden készítmény erőteljesen gátolta a csírázást, egyik izolátum konídiumainak kontrollhoz viszonyított csírázása sem érte el a 20%-ot, csak a Quadris esetében (**19. ábra**). Tízszeres hígításban igen eltért a készítmények hatása az egyes izolátumokra, melyre a nagy szórásokból is következtethetünk.

Az egyes készítmények hatásának vizsgálatakor nem készítettünk ismétléseket, így nem tudtunk varianciaanalízist végezni, valamint az egyes mintákra kifejtett hatásokat sem ábrázoltuk egyetlen adat alapján. A két *Monilinia* faj között sem figyeltünk meg eltéréseket a konídiumok csírázásában.

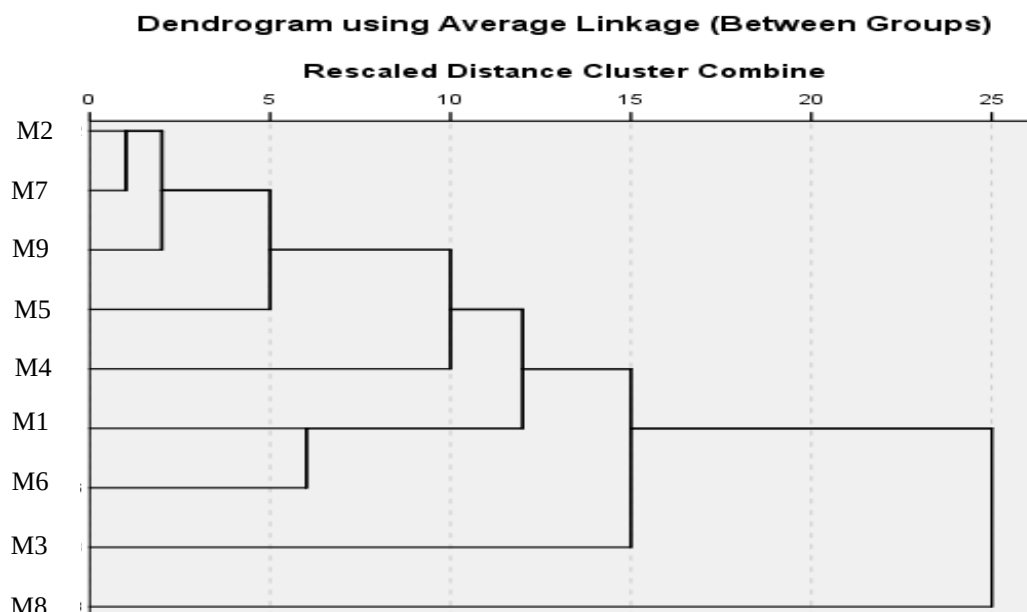
Vizsgáltuk az izolátumok hasonlóságát az alapján, hogy hogyan reagáltak (a konídiumcsírázás tekintetében) az egyes kezelésekre. A dendrogram szerint az M2-es és az M7-es izolátum hasonlít a legjobban egymásra, majd az M9-es izolátum áll hozzájuk legközelebb (**20. ábra**). A további izolátumok között nem figyelhető meg nagyobb mértékű hasonlóság, sem egymáshoz, sem a három előbb említett izolátumhoz képest. A legkülönbözőbben az M8-as izolátum a reagált a kezelésekre.



19. ábra: Fungicidek gátló hatása a konídiumok csírázására
(az összes mintából számított átlag és szórás értékekkel)

A növényvédő szereknek a két *Monilinia* faj konídiumainak csírázására kifejtett hatásában nem figyelhetők meg akkora különbségek, mint a micéliumra kifejtett hatásban. Azonban ennek bizonyítására további *M. fructicola* izolátumok vizsgálatára lenne szükség.

Az összes izolátum adataira végzett varianciaanalízis alapján a Switch 62,5 WG és Systhane Duplo készítmények gyakorlati dózisa és azok tízszeres hígításában mért értékek befolyásolták leginkább a különbségek kialakulását.



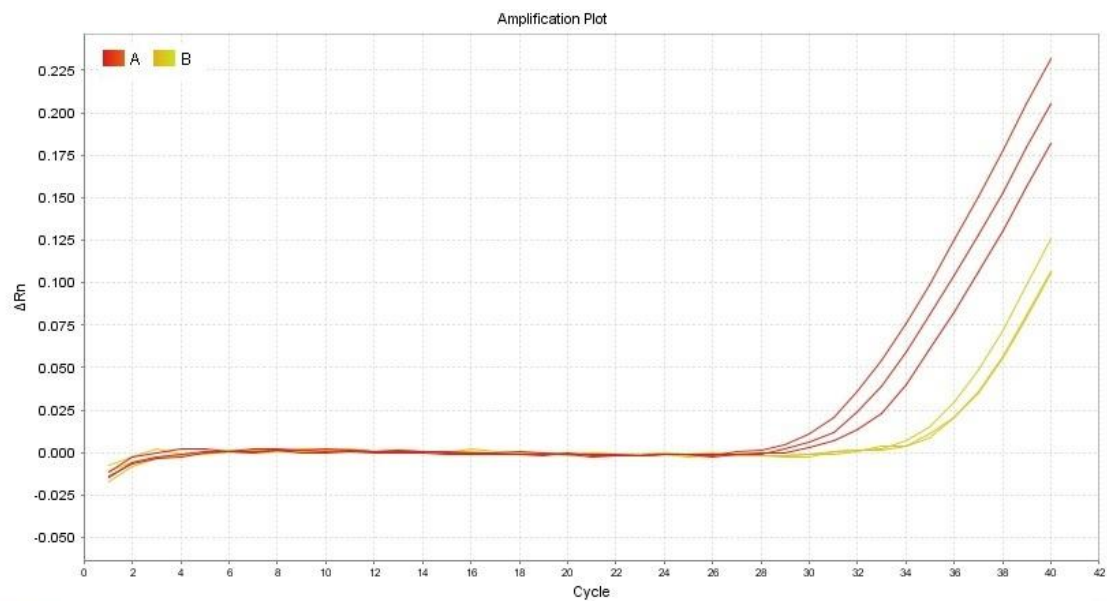
20. ábra: A klaszter analízis során, az egyes készítmények izolátumok konídiumainak csírázására gyakorolt hatása alapján megállapított hasonlóságok ábrázolása dendrogramon

Magyarázat: A vízszintes vonalak hosszúsága a minták különbözőségét jelzik, a függőleges vonallal összekötött minták hasonlósága a kiindulási ponttól való távolság növekedésével csökken.

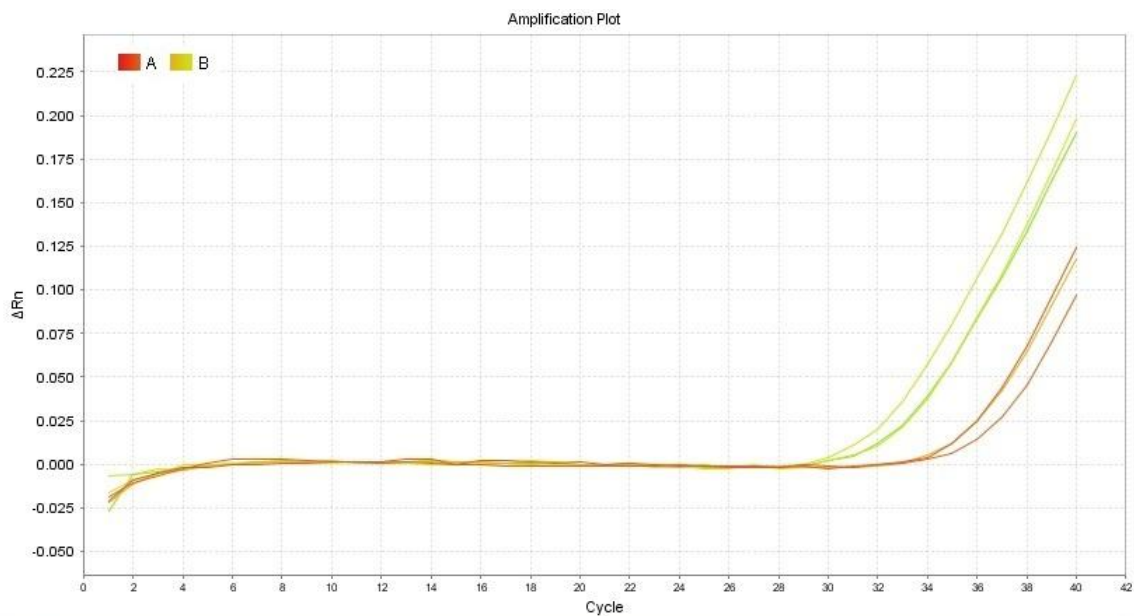
4.4.3. Citokróm b gén vizsgálatának eredményei

A mitokondriumban kódolt citokróm b gén valós idejű PCR vizsgálata során az általunk tervezett primerek megfelelően működtek. A negatív kontroll esetén nem keletkezett PCR termék. A vizsgált *M. laxa* izolátumok mindegyikéből sikerült kimutatni, a PCR termék megjelenésével a rezisztenciát biztosító pontmutációt tartalmazó gén jelenlétét, melyre a pontmutációt specifikusan felismerő primert terveztük.

Megállapítottuk, hogy a Petri-csészében az egyes izolátumoknál tapasztalt gátlóhatásbeli különbséget a mennyiségi polimeráz láncreakció eredményei megerősítették. Az izolátumonként három ismétlésben elvégzett PCR vizsgálatoknál az M1-es és az M5-ös izolátumok, amelyek magasabb szintű azoxistrobin rezisztenciával rendelkeztek táptalajon, görbéi hamarabb kezdtek emelkedni, vagyis a detektálható PCR termékek már a 28-29. ciklusnál megjelentek, míg pl. az M4-es és M6-os izolátumok, amelyek telepnövekedésénél nagyobb gátló hatást figyeltünk meg, görbéi később emelkedtek, a detektálható PCR termékek csak a 33-34. ciklusnál jelentek meg (**21., és 22. ábra**).



21. ábra: Az M1 (piros) és az M6 (zöldessárga) izolátumok görbéi három ismétlésben a valós idejű PCR-t követően



22. ábra: Az M4 (piros) és az M5 (zöldessárga) izolátum görbéi a valós idejű PCR-t követően

5. Eredmények megvitatása, következtetések

Az izolátumok fajsztípus meghatározása során morfológiai és tenyészbélyegek vizsgálatával, valamint a molekuláris azonosítással megegyező eredményre jutottunk, azonban **De Cal és Melgarejo (1999)** megfigyeléseihez csatlakozva, a polimeráz láncreakciót elengedhetetlennek tartjuk a *Monilinia* fajok meghatározása során. A morfológiai bélyegek vizsgálata során nehézségekbe ütköztünk a fajok azonosításánál a sztrómák alapján. Bár **Kiss (2007)** szerint megfigyelhető színbeli és megjelenésbeli eltérés a két faj exogén sztrómája között, ez alapján nem lehet egyértelműen azonosítani a kórokozókat. Konídiumaik egysejtűek, oválisak, láncokban képződtek, méretük is megegyezett **Byrde és Willetts (1977)** megfigyeléseivel.

A *M. laxa* kórokozó tenyészteti rosettált szerkezetűek, mintázatuk gyűrűzött, felületükön változó mennyiségű, fehér légmicélium képződött. Szaporítóképletek megjelenését nem tapasztaltuk. A jellegzetes mogyoróbarna, sötétszürke alapszínű telepek (**Byrde és Willetts, 1977**) mellett több izolátumnak is világosbarna, narancssárgás színű telepei fejlődtek. Növekedésük 2,8-6,4 mm/nap között változott, amely a szakirodalomban megjelölt értékek (2-11 mm/nap) közé esik (**OEPP/EPPO, 2009**). A *M. fructicola* tenyésztete jól elkülönült a *M. laxa* izolátumokétól, mert rosettáltság nem alakult ki, valamint felületén nagy mennyiségű szaporítóképlet jelent meg, koncentrikus körökbe rendeződve, ahogy ezt **Batra (1991)** leírásában is olvashatjuk. Színe mogyoróbarna volt. A *M. fructicola* tenyésztete gyors növekedésű (12,1 mm/nap), ami megfelel az **OEPP/EPPO (2009)** által megadott értékeknek (9-20 mm/nap).

A molekuláris azonosítás során az ismeretlen feladatú, nem kódoló genomi szekvencia vizsgálatára tervezett primerek által kiemelt PCR termékek nagysága megegyezik a **Petróczy és mtsai. (2012)** által publikált értékekkel, így az izolátumokat egyértelműen tudtuk azonosítani.

Mándoki és Varga (2011) kísérleteivel megegyezően a mérgezett agarlemez módszer alkalmasnak bizonyult növényvédő szerek hatásának értékelésére a *Monilinia* fajok micéliumnövekedésének tekintetében. A vizsgálatba bevont fungicidek elemzésekor a legtöbb esetben szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni a két *Monilinia* fajra gyakorolt hatásuk között. Ez megegyezik **Mándoki és Varga (2011)** eredményeivel, miszerint a *M. laxa* ellen korábban alkalmazott szerek a karantén *Monilinia* faj ellen is hatékonyan bevetethők.

A 16 készítmény közül fungicid hatást tapasztaltunk az Orius 20 EW, Mirage 45 EC, Systhane Duplo, Flint Max, Signum WG és a Teldor 500 SC készítmények gyakorlati dózisában. **Mándoki és Varga (2011)** szintén kimutatta a Teldor 500 SC és a Rovral Aquaflo, valamint **Sződi és mtsai. (2008)** az iprodion (Rovral 50 WP) hatóanyag kiváló hatékonyságát. **Mándoki és Varga (2011)** kísérleteiben is az azoxistrobin hatóanyag (Amistar, Quadris) gátolta a

leggyengébben a tenyészetek növekedését, ahogy azt mi is megfigyeltük. A Chorus 50 WG és a Topsin-M 70 WDG esetén jelentős különbségeket mutattunk ki a *M. laxa* és a *M. fructicola* kórokozókra kifejtett hatásban. Ezzel ellentétben **Mándoki és Varga (2011)** nem figyeltek meg különbséget a készítmények kapcsán.

Maring és Lienshöft (2011) németországi ültetvényekben végzett *in vivo* kísérleteiben a Chorus 50 WG hatékonyságának fokozásához, az engedélyezett dózis másfélszeresét (0,3 kg/ha a koronamagasság egy méterére vonatkozóan) ajánlják kijuttatásra. Kísérleteink során a Chorus 50 WG igen hatékonynak bizonyult, a gyakorlati dózis tízszeres hígításában is, a legtöbb esetben teljes mértékben gátolta a micélium növekedését, így *in vitro* vizsgálataink alapján hazánkban nem tartjuk indokoltnak a magasabb dózis használatát. A vizsgált réz hatóanyagú készítmények esetében azonban kijuttatáskor fokozottan ügyelni kell a megfelelő borítottság elérésére és a dózis precíz beállítására, mert gátló hatásuk tízszeres hígításban nem haladja meg a 15%-ot.

A konídiumok csírázását is az Orius 20 EW, a Mirage 45 EC, a Systhane Duplo, a Flint Max, a Signum WG és a Teldor 500 SC készítmények gátolták a legerőteljesebben. A készítmények a konídiumok csírázását hatékonyabban gátolják, mint a telepek növekedését, bár jóval nagyobb szórás figyelhető meg az egyes izolátumokra kifejtett hatásuk tekintetében.

A mitokondriális citokróm b gén egy sejtben sok kópiában van jelen. Valós idejű PCR technika alkalmazásával sikerült kimutatnunk a strobilurin rezisztenciáért felelős pontmutációt tartalmazó DNS kópiát a *M. laxa* izolátumokból. A kísérletek elvégzéséig nem érkezett meg az a primer szett, mely alkalmas a heteroplazmiában résztvevő mutáns és vad típusú citokróm b gén együttes kimutatására, így nem tudtuk megállapítani az egyes izolátumoknál a vad és a mutáns gén kópiaszámának arányát. Azonban az egyes izolátumok mérgezett agarlemezen tesztelt strobilurin érzékenysége korrelált a valós idejű PCR vizsgálat eredményeivel, ahol a mutáns kópia jelenlétét vizsgáltuk.

Több szerző a *M. laxa* esetében nem valószínűsíti a mutáció létrejöttét, a pontmutációt közvetlenül követő intron szekvencia jelenléte miatt. Véleményük szerint a mutáció hatására nem történik meg az intron kivágódása, így működésképtelen fehérje jönne létre (**Miessner és Stammler, 2010; Hily és mtsai., 2011**). **Jiang és mtsai. (2009)** viszont a *Botrytis cinerea* kórokozó strobilurin rezisztenciáját vizsgálva, azonosították a pontmutáció jelenlétét, ugyanakkor az ezt követő intron szekvencia nem volt megtalálható a génben a vad típushoz képest. Így további vizsgálatok elvégzése szükséges a *M. laxa* izolátumokban történt pontmutáció, szekvencia meghatározással történő azonosításához, ill. a mutáció szekvenciakörnyezetének, az intron meglétének vagy esetleges hiányának azonosítására.

6. Összefoglalás

A csonthéjasok monilíniás virág- és hajtáselhalást okozó *Monilinia laxa* kórokozó mellett 2007-től a *Monilinia fructicola* karantén kórokozó is megjelent a hazai ültetvényekben. A kórokozó hazai elterjedése a növényvédelmi technológiát is módosítja, hiszen a gyümölcserés időszakában elengedhetetlenné válik a fungicidek használata. A kórokozó ellen hatékony növényvédő szerek kapcsán pedig kevés hazai adat áll rendelkezésre. A *M. laxa* okozta járványok következtében fokozódó peszticid felhasználás miatt fenn áll a veszélye az ellenálló populációk kialakulásának, ezért időről időre szükség van a fungicidek hatékonyságának vizsgálatára.

Munkánk során 9 *Monilinia* izolátumot gyűjtöttünk, PDA táptalajon izoláltuk őket, majd igazoltuk patogenitásukat. A morfológiai és tenyészbélyegek alapján, valamint molekuláris azonosítással 8 izolátumot *M. laxa* kórokozóként, míg 1 izolátumot *M. fructicola* kórokozóként határoztunk meg. A laboratóriumi hatásvizsgálat során teszteltük 16 növényvédő szer gyakorlati dózisának, valamint tízszeres hígításának hatékonyságát egyrészt a *Monilinia* fajok micélium növekedésére mérgezett agarlemezen, másrészt konídiumainak csírázására. A vizsgált készítmények közül a legkevesbé hatékonyak az azoxistrobin hatóanyag bizonyult, és bár az azoxistrobin nincs engedélyezve csonthéjas kultúrákban, más engedélyezett strobilurin típusú hatóanyagok kapcsán felvetődhet a strobilurin rezisztencia kialakulásának veszélye. Valós idejű PCR módszerrel vizsgáltuk a Qoi rezisztenciáért leggyakrabban felelős mutációt, a citokróm b gén 143-as aminosavában bekövetkező pontmutációt (guanin ~~citozin~~).

Fungicid hatást tapasztaltunk mind a telepek növekedésére kifejtett hatás, mind a konídiumok csírázására kifejtett hatás tesztelésekor az Orius 20 EW, Mirage 45 EC, Systhane Duplo, Flint Max, Signum WG és a Teldor készítmények gyakorlati dózisában, valamint a legtöbb izolátum esetében a gyakorlati dózis tízszeres hígításában egyaránt. Két készítménynél figyeltünk meg jelentős különbséget a két *Monilinia* fajra kifejtett hatás között. A Chorus 50 WG a *M. fructicola* kórokozó izolátumának fejlődését teljes mértékben gátolta tízszeres hígításban is, míg a *M. laxa* kórokozó izolátumai fejlődtek rajta. A Topsin-M 70 WDG a *M. laxa* kórokozó tenyészetének fejlődését gátolta, míg a *M. fructicola* tenyészetének növekedését gyengén gátolta. A konídiumok csírázásának vizsgálatánál nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a két fajra kifejtett hatás között.

A kontakt szerek közül a Cupertine M bizonyult a leghatékonyabbnak, gyakorlati dózisának tízszeres hígítása is erősebben gátolta átlagosan a tenyészetek növekedését, mint a kizárólag réz hatóanyagú készítmények gyakorlati dózisa. A réz hatóanyagú szerek közül a Nordox 75 WG fejtette ki a legerősebb gátló hatást. Hasonló hatékonyságú a két rézhidroxid hatóanyagú Vitra

Rézhidroxid és Funguran-OH 50 WP, legkevésbé gátolta a fejlődést a rézoxiklorid hatóanyagú Pluto 50 WP Rézoxiklorid. A Quadris gyakorlati dózisa gátolta legkevésbé a kórokozók fejlődését és konídiumaiknak csírázását, valamint ennek a készítménynek a hatása ingadozott a legjobban az egyes izolátumok közti gátlás erősségében.

Valós idejű PCR technika alkalmazásával a *M. laxa* izolátumokból sikerült kimutatnunk a strobilurin rezisztenciáért felelős, a mitokondriális DNS-ben kódolt citokróm b gén, pontmutációt hordozó DNS kópiáját. Az egyes izolátumok mérgezett agarlemezen tesztelt strobilurin érzékenysége korrelált a valós idejű PCR vizsgálat eredményeivel. További vizsgálatok elvégzése szükséges a *M. laxa* izolátumokban történt pontmutáció, szekvencia meghatározással történő azonosításához, ill. a mutáció szekvenciakörnyezetének vizsgálatához.

7. Köszönetnyilvánítás

Dolgozatom elkészítése során nyújtott segítségéért köszönettel tartozom Dr. Palkovics László tanszékvezető úrnak, aki témaválasztásomat és dolgozatom tudományos megalapozását segítette.

Rengeteg segítséget kaptam Dr. Petróczy Mariettától, aki témavezetőként irányította munkámat. Köszönettel tartozom neki a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségéért, értékes tanácsaiért és türelméért.

Köszönöm Dr. Erdélyi Éva tanárnőnek bátorítását és a statisztikai elemzésben nyújtott segítségét.

8. Irodalomjegyzék

1. **Anonymus** (2011): List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides. (Updated 16/12/11). Qoi Working Group, FRAC. [http:// www.frac.info](http://www.frac.info)
2. **Anonymus** (2012): EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests (version 2012-09) <http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>
3. **Asadollahi M., Fekete É., Fekete E., Karaffa L., Irinyi L. and Sándor E.** (2010): Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok citokrómban gátló gátló diverzitása. Acta Agraria Debreceniensis 2010 (39): 18-21. p.
4. **Balogh S. és Kovács V.** (1974): Növényvédelmi technológiák. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. 238. p.
5. **Batra, L. R.** (1991): World species of *Monilinia* (Fungi): Their ecology, biosystematics and control. Mycologia Memoir 16: 135 p.
6. **Biggs, A. R. and Northover, J.** (1988): Influence of temperature and wetness duration on infection of peach and sweet cherry by *M. fructicola*. Phytopathology 78: 1352-1356. p.
7. **Brent, K. J.** (1995): Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph 1: 48. p.
8. **Byrde, R. J. W. and Willets, H. J.** (1977): The brown rot fungi of fungi. Their biology and control. Oxford: Pergamon Press. 156. p.
9. **Boehm, E. W. A., Ma, Z. and Michailides, T. J.** (2001): Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. Phytopathology. 91 (5): 428–439. p.
10. **Chan, H. T. és Tsai, H. T.** (1996): Thermal Death Kinetics of Some Common Postharvest Pathogens of Papaya. HortScience. 31 (6): 998-1002. p.
11. **Côté, M. J., Tardif, M. C. and Meldrum, A. J.** (2004): Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* and *M. polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. Plant Disease. 99 (11): 1219–1225. p.
12. **De Cal, A. and Melgarejo, P.** (1999): Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. Plant Disease. 83 (1): 62-65. p.
13. **Dula B.** (2007): A fungicidrezisztencia kérdésköre, különös tekintettel a lisztharmatgombákra. Növényvédelem. 43 (6): 253-259. p.
14. **Elemer, P. A. G. and Gaunt, R. E.** (1994): The biological characteristics of dicarboximide-resistant isolates of *Monilinia fructicola* from New Zealand stone-fruit orchards. Plant Pathology. 43 (1): 130–137. p.
15. **Feliciano, A., Feliciano, A. J. and Ogawa, J. M.** (1987): *Monilinia fructicola* resistance in the peach cultivar Bolinha. Phytopathology. 77: 776-780. p.

16. **Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., de Vicente, A. and Pérez-García, A.** (2008): Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Int Microbiol.* 11(1): 1-9. p.
17. **Folk Gy. és Glits M.** (1993): Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 195, 172. p.
18. **Förster, H. and Adaskaveg, J. E.** (2000): Early brow rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* 90: 171–178. p.
19. **Füzi I.** (2007): A biztonság mindenek előtt. *Növényvédelmi Tippek.* 1-2: 32-34. p.
20. **Gell I., Cubero, J. and Melgarejo, P.** (2007): Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology* 103: 2629–2637. p.
21. **Glits M.** (szerk): (1993): Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 155-256. p.
22. **Glits M., Kuroli G., Horváth J. és Petróczi I.** (1997): Növényvédelem. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 510-513, 544. p.
23. **Glits M.** (1998): *Monilia* fajok előfordulása díszfákön és díszcserjéken. Lippai János – Vas Károly Nemzetközi Tud. Ülésszak, Növényvédelmi Szekció, Budapest. 308-309. p.
24. **Glits M. és Folk Gy.** (2000): Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 206-208. p.
25. **Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A. and Gisi, U.** (2006): Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag Sci.* 62 (6): 465-72. p.
26. **Griegel, A.** (2003): Kertgyógyítás. Díszfák, díszcserjék betegségei és kártevői. Silvanus Díszfaiskola Kft. Budapest. 63, 73. p.
27. **Gróf B. és Révy D.** (1929): Növénykórtan. Budapest. Pátria Irodalmi Vállalat és Nyomdai Részvénytársaság. 61-64. p.
28. **Hily J. M., Singer S. D., Villani S. M. and Cox K. D.** (2011): Characterization of the cytochrome b (cyt b) gene from *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruit and its significance in the development of QoI resistance. *Pest Manag Sci.* 67 (4): 385-396. p.
29. **Hinrichs-Berger, J. and Müller, G.** (2010): *Julius-Kühn-Archiv.* 428: 235-236. p.
30. **Heald, F. D.** (1933): *Manual of Plant Diseases.* New York and London: McGraw-Hill Book Company. 540. p.
31. **Hegyí T. és Mező G.** (2002): A kajszi védelme. *Növényvédelem.* 38 (7): 359. p.
32. **Holb I. J.** (2003): The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.): I. Important features of their biology. *International Journal of Horticultural Science.* 9: 23-36.

33. **Holb I. J.** (szerk.) (2005): A gyümölcsösök és a szőlő ökológiai növényvédelme. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 163. p.
34. **Holb I. J.** (2006): Possibilities of brown rot management in organic stone fruit production in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*. 12 (3): 87–91. p.
35. **Honey, E. E.** (1928): The monilioid species of *Sclerotinia*. *Mycologia*. 20: 127-157. p.
36. **Honey, E. E.** (1936): North American species of *Monilinia*. I. Occurrence grouping and life-histories. *American Journal of Botany* 23: 100-106. p.
37. **Hughes, K. J. D., Fulton, C. E., McReynold, D. and Lange, C. R.** (2000): Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. Wageningen: EPPO Conferences on diagnostic techniques for plant pests. 1–4: 54. p.
38. **Ioos, R. and Frey, P.** (2000): Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 106: 373–378. p.
39. **Jiang J., Ding L., Michailides T. J., Li H. and Maa Z.** (2009): Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 72–76. p.
40. **Kaptás T.** (1994): A szőlő szürkerothadásáról. *Gyakorlati Agrofórum*. 5: 22–23. p.
41. **Karova, V.** (1974): Proucsvanija vörhu *Monilinia laxa* Ehr. i Bioetologia. *Gradin. Loz. Nauka Szofija*. 11 (2): 27-33. p.
42. **Kern H.** (1912): A gyümölcsfák monilia-betegsége. Pallas könyvsajtó. Budapest. 1-2. p.
43. **Kiss A.** (2007): Új *Monilia* faj veszélyezteti a gyümölcsösöket. *Agrofórum*. 18 (8): 34–35. p.
44. **Komlósi É. és Rátainé V. R.** (2002): A meggy védelme. *Növényvédelem*. 38 (9): 479-483. p.
45. **Kuck, K. H. and Russell, P. E.** (2006): FRAC: Combined resistance risk assessment. *Asp Appl Biol* 78, 3-10. p.
46. **Luo, Y., Morgan, D. P. and Michailides, T. J.** (2001): Risk Analysis of Brown Rot Blossom Blight of Prune Caused by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology*. 91 (8): 759-68. p.
47. **Luo, Y., Ma, Z. and Michailides, T. J.** (2007a): Quantification of allele E198A in beta-tubulin conferring benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* using real-time PCR. *Pest Manag Sci*. 63 (12): 1178-84. p.
48. **Luo, Y., Ma, Z., Reyes, H. C., Morgan, D. and Michailides, T. J.** (2007b): Quantification of airborne spores of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards of California using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 118: 145–154. p.
49. **Ma, Z., Luo, Y. and Michailides, T. J.** (2003): Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. *Journal of Phytopathology*. 151: 312–322. p.

50. **Ma, Z., Yoshimura, M. A., Holtz, B. A. and Michailides, T. J.** (2005): Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Manag Sci.* 61 (5): 449-57. p.
51. **Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E. F.** (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual.*- Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
52. **Maring, E. and Lienshöft, H.** (2011): *Obstbau.* 4.
53. **Mándoki A. és Varga A.** (2011): Országos mezőgazdasági szakfolyóirat. 15. (4): 12-13.p.
54. **Mező G. és Schweigert A.** (2005): Rendszeres megelőző védekezések a meggy monilíniás betegsége ellen. *Gyakorlati Agrofórum.* 16. (1): 33-34. p.
55. **Miessner, S. and Stammler, G.** (2010): *Monilinia laxa, M. fructigena* and *M. fructicola*: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. *Journal of Plant Diseases and Protection.* 117 (4): 162–167. p.
56. **Moore, M. H.** (1950): Brown rot of apples: fungicide trials and studies of relative importance of different wound agents. *Journal of Horticultural Science* 25: 225-234. p.
57. **Ocskó Z., Erdős Gy. és Molnár J.** (2011): *Növényvédő szerek, termésnövelő anyagok.* Reálszisztéma Dabasi Nyomda Zrt. Budapest. 8-488. p.
58. **OEPP/EPPO** (1988): Data sheets on quarantine organisms No. 153, *Monilinia fructicola*. *OEPP/EPPO Bulletin* 18: 509-512. p.
59. **OEPP/EPPO** (2009): *Monilinia fructicola*. *OEPP/EPPO Bulletin* 39 (3): 337-343. p.
60. **Pennycook, S. R.** (1989): *Plant diseases recorded in New Zealand.* Auckland: Pl. Dis. Div., D.S.I.R. 6224. p.
61. **Petróczy M., Glits M. és Palkovics L.** (2005): *Monilia* fajok díszfákon és díszcserjéken. *Növényvédelem.* 41 (6): 247-254. p.
62. **Petróczy M. és Palkovics L.** (2005): A *Monilinia fructicola* karantén kórokozó hazai megjelenése és azonosítása import őszibarackon. *Növényvédelem.* 41 (12): 603–608. p.
63. **Petróczy M., Szigethy A. and Palkovics L.** (2012): *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics, and molecular analysis. In: *Trees: Structure and Function* 26 (1): 153-164. p.
64. **Pirone, P. P.** (1907): *Deasies and pests of ornamental plants.* New York, Chichester, Brisbane, Toronto: John Wiley and sons. 565. p.
65. **Pizzuolo, P. H., Chilosi, G., Balmas, V., Aleandri, M. P., Vitale, S., Luongo, L., Corazza, L. and Margo, P.** (2006): Variations in the molecular and physiological characteristics and the virulence of *Monilinia fructicola, M. fructigena* and *M. laxa* isolates. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 139–152. p.

66. **Ritchie, D. F.** (1983): Mycelial growth, peach fruit-rotting capability, and sporulation of strains of *Monilinia fructicola* resistant to dichloran, iprodione, procimidone and vinclozolin. *Phytopathology*, 73: 44–47. p.
67. **Rozsnyay Zs.** (2010): A kajszibarackfák hirtelen pusztulásának, gutaütésének okai. *Agrofórum Extra* 21 (33): 62-63. p.
68. **Rozsnyay Zs. és Vajna L.** (2001): *Monilinia* járvány a csonthéjas ültetvényekben. *Kertészet és szőlészet*. 29: 8-10.p.
69. **Saccardo, P. A.** (1886): *Sylloge Hyphomycetum. Sylloge Fungorum*. 4: 1-807. p.
70. **Sanoamuang, N. and Gaunt, R. E.** (1995): Persistence and fitness of carbendazim- and dicarboximide-resistant isolates of *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey in flowers, shoots and fruit of stone fruit. *Plant Pathology*. 44 (3): 448–457. p.
71. **Sándor F.** (szerk.) (1974): *Növényvédelmi technológiák*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 244.p.
72. **Shim, M. Y., Jeon, Y. J. and Kim, S. H.** (2007): Characterization of a Brown Rot Fungus Isolated from Dwarf Flowering Almond in Korea. *Mycobiology*. 35 (1): 30-35. p.
73. **Simon Z.** (2007): A meggy gombás eredetű gyümölcsrothadásai. *Kertészet és szőlészet*. 56 (32): 17-18. p.
74. **Szabó Z. és Nyéki J.** (1995): A *Monilia laxa* és a *Venturia carpophila* súlyosbodó kártétele a szilván. Keszthely: Növényvédelmi Fórum 1995. Összefoglalók 38 p.
75. **Szódi Sz., Rozsnai Zs., Rózsa E. és Túróczi Gy.** (2008): Susceptibility of sour cherry cultivars to isolates of *Monilia laxa* (Ehrenbergh) Saccardo et Voglino. *International Journal of Horticultural Science*. 14 (1–2): 83–87. p.
76. **Ubrizsy G.** (1965): *Növénykórtan*. Akad. Kiadó. Budapest. 331. p.
77. **Talma, K. and Shabi, E.** (1982): Characterization of a dicarboximide-fungicide-resistant laboratory isolate of *Monilinia laxa*. *Phytoparasitica*. 10 (4): 241-245. p.
78. **Thomidis, T., Michailides, Th. and Exadaktylou, E.** (2009): Contribution of pathogens to peach fruit rot in northern Greece and their sensitivity to iprodione, carbendazim, thiophanate-methyl and tebuconazole fungicides. *Journal of Phytopathology*. 157: 194-200. p.
79. **Thurzó S.** (2008): Cseresznyefajták terméshezása, minősége és tárolhatósága. Debreceni Egyetem, Agrár és Műszaki Tudományok Centruma. Debrecen. 15-16.p.
80. **Tóth Á.** (2007): A fungicidhasználat szempontjai a csonthéjasok moníliás betegségei ellen. *Agrofórum Extra* 19: 63-64. p.
81. **Tóth M.** (2008): Gyümölcsfélék és a szőlő kiskerti védelme. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 70-100.p.

82. **van Leeuwen, G. C. M. and van Kesteren, H. A.** (1998): Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. Canadian Journal of Botany 76: 2042–2050. p.
83. **Visarathanonth, N., Kakishima, M. and Harada, Y.** (1988): Brown rot of grape berry caused by *M. fructicola*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 54: 238-241. p.
84. **Wilcox, W. F.** (1989): Influence of environment and inoculum density on the incidence of brown rot blossom blight of sour cherry. Phytopathology. 79: 530-534. p.
85. **Willetts H. J. and Calogne F. D.** (1969): Spore development in the brown rot fungi (*Sclerotinia* spp.). New Phytologist 68: 123–131. p.
86. **Wilson, E. E. and Ogawa, S. M.** (1979): Fungal, bacterial and certain nonparasitic diseases of fruit and nut crops in California. University of California, Division of Agricultural Science. Barkeley. 145. p.
87. **Wormald, H.** (1954): The brown rot diseases of fruit trees. Her Majesty's Stationery Office, London. 1-113. p.