

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYKÓRTANI TANSZÉK



Tudományos diákköri dolgozat

**Mi áll az örökzöld növények súlyos hajtás- és
ágelhalásának hátterében?**

Németh Nóra
Növényorvos MSc II. évfolyam

Konzulensek:

Dr. Petróczy Marietta egyetemi adjunktus

Dr. Palkovics László tanszékvezető egyetemi tanár

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
1.1. Célkitűzés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A kórokozók rendszertani besorolása és elnevezése	5
2.1.1. A <i>Seiridium cardinale</i> rendszertani besorolása és elnevezése	5
2.1.2. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> rendszertani besorolása és elnevezése	5
2.2. A kórokozók jelentősége	6
2.2.1. A <i>Seiridium cardinale</i> jelentősége	6
2.2.2. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> jelentősége	6
2.3. A kórokozók földrajzi elterjedése	7
2.3.1. A <i>Seiridium cardinale</i> földrajzi elterjedése	7
2.4. A kórokozók gazdanövényköre	8
2.4.1. A <i>Seiridium cardinale</i> gazdanövényköre	8
2.4.2. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> gazdanövényköre	8
2.5. A gazdanövényeken okozott tünetek	9
2.5.1. A <i>Seiridium cardinale</i> okozta tünetek	9
2.5.2. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> okozta tünetek	10
2.6. A kórokozók biológiája	12
2.6.1. A <i>Seiridium cardinale</i> biológiája	12
2.6.2. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> biológiája	12
2.7. A kórokozók morfológiai jellemzői	12
2.7.1. A <i>Seiridium cardinale</i> termőtestjeinek és konídiumainak morfológiai jellemzői	12
2.7.2. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> termőtestjeinek és konídiumainak morfológiai jellemzői	14
2.7.3. A <i>Seiridium cardinale</i> tenyészetének morfológiai jellemzői	14
2.7.4. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> tenyészetének morfológiai jellemzői	15
2.8. A fonalas gombák molekuláris azonosítása	16
3. Anyag és módszer	17
3.1. Vizsgálat helye és ideje	17
3.2. Vizsgálat anyaga	17
3.2.1. Izolátumok	17
3.2.2. Kórokozók	18
3.2.3. Táptalajok	18
3.2.4. Primerek, enzimek, vegyszerek, kitek	18

3.2.5. Eszközök	19
3.3 A vizsgálat módszere.....	19
3.3.1. Mintagyűjtés, tárolás	19
3.3.2. A kártétel felmérése.....	20
3.3.3. A kórokozók izolálása táptalajon.....	20
3.3.4. Patogenitási teszt	21
3.3.6. Morfológiai és tenyészbélyegek vizsgálata.....	22
3.3.7. Molekuláris biológiai vizsgálatok.....	22
4. Eredmények	26
4.1. A <i>Seiridium cardinale</i> okozta tünetek, a kórokozó azonosítása és jellemzése	26
4.1.1. A <i>Seiridium cardinale</i> okozta tünetek	26
4.1.2. A <i>Seiridium cardinale</i> morfológiai azonosítása és jellemzése	27
4.1.3. Patogenitási teszt	29
4.1.4. A <i>Seiridium cardinale</i> molekuláris azonosítása és jellemzése	30
4.2. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> okozta tünetek, a kórokozó azonosítása és jellemzése	31
4.2.1. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> okozta tünetek.....	31
4.2.2. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> morfológiai azonosítása és jellemzése	32
4.2.3. Patogenitási teszt	35
4.2.4. A <i>Pestalotiopsis funerea</i> molekuláris azonosítása és jellemzése	35
5. Eredmények megvitatása, következtetések, javaslatok	37
5.1. Tünetek, a kórokozók terjedése és a betegség lefolyása	37
5.2. A kórokozók izolátumainak morfológiai és tenyészbélyegek.....	38
5.3. A kórokozók izolátumainak molekuláris azonosítása és jellemzése	38
5.4. A kórokozók szerepe a leylandi ciprusok hajtás- és ágelhalásában	39
6. Összefoglalás.....	40
7. Köszönetnyilvánítás	41
8. Irodalomjegyzék.....	42

1. Bevezetés

Világszerte, így hazánkban is egyre nagyobb teret hódítanak a dísnövények között az örökzöldek. Közterületeken és magánkertekben egyaránt közkedvelt és kényelmes megoldás a tuják vagy a ciprusfélék ültetése, hiszen a téli nyugalmi időszakban is élvezhetjük a lomb díszítőértékét. Telepítésük során azonban számolnunk kell bizonyos kockázati tényezőkkel. Számos abiotikus faktor - elsősorban a szélsőséges időjárás - nehezíti a telepítést, mert ezek az örökzöldek jórészt nem őshonosak Magyarországon. Emellett gondolnunk kell a biotikus tényezőkre is, így az örökzöld dísnövényeken előforduló kórokozókra és kártevőkre. Európa szerte gyakori tünetet a hajtás- és ágelhalás jelensége, amely rontja az állományok díszítőértékét, sőt a növények pusztuláshoz is vezethet. A hazai faiskolák gyakran külföldről (főleg mediterrán országokból) szerzik be a szaporítóanyagot, így fenn áll a veszélye új kórokozók behurcolásának és elterjedésének. Ciprusféléken a külföldi szakirodalmak elsősorban a *Pestalotiopsis funerea* és a *Seiridium cardinale* kórokozókat tartják felelősnek az okozott károkért. Az utóbbi hazai megjelenésre és járványszerű terjedésére **Orlóci (2011)** hívta fel a figyelmet, aki a tünetek alapján azonosította a kórokozót.

A növényvédelem a két kórokozó ellen több szempontból sem egyszerű. Az érintett állományok egy része közterületen, illetve közutak mentén található. Jelenleg nincs engedélyezett közterületen kijuttatható fungicid, csak eseti engedéllyel alkalmazhatók bizonyos készítmények, igen szigorú előírások mellett. Kémiai növényvédelemre a díszfaiskolákban nyílt lehetőségek, bár elsősorban csak a kórokozók terjedését lehet ezáltal megelőzni, hiszen még a felszívódó készítmények sem jutnak be hatékonyan a fás részekbe.

Az örökzöld növények és közülük is elsősorban a leylandi ciprus kórokozóival kapcsolatban, igen kevés hazai adat áll rendelkezésre. Munkánk során elsősorban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az Európa-szerte súlyos károkat okozó *Seiridium cardinale* valóban megjelent-e és elterjedt-e hazánkban.

1.1. Célkitűzés

A vizsgálatok során célul tűztük ki annak megállapítását, hogy a biotikus tényezők közül, mely kórokozók felelősek az örökzöld növények közül, elsősorban a leylandi ciprus ágelhalásáért és pusztulásáért. Célul tűztük ki a kártétel felmérését a növényállományban, a kórokozók izolálását táptalajon, továbbá azok azonosítását és jellemzését morfológiai és molekuláris módszerrel.

2. Irodalmi áttekintés

A szakirodalom alapján a ciprusfélék ágelhalásával leggyakrabban kapcsolatba hozható három faj a *Seiridium cardinale*, a *Seiridium cupressi* és a *Seiridium unicorne*, ám elterjedésüket és virulenciájukat tekintve, a *Seiridium cupressi* és a *Seiridium unicorne* jelentősége elmarad a *Seiridium cardinale* kórokozóhoz képest (**Boeswinkel, 1983; Graniti, 1986; Barnes és mtsai., 2001; Hood és mtsai., 2009**). Egy másik, a *Pestalotiopsis* nemzetségből származó kórokozót, a *Pestalotiopsis funerea*-t is gyakran összefüggésbe hozzák az említett betegséggel (**Madar és mtsai., 1991; Li és mtsai., 1996**). A szakirodalmak számos okot neveznek meg, amely az örökzöld növények hajtás- és ágelhalását okozhatják, azonban a továbbiakban a növénykórtani szempontból két legjelentősebbet, a *Seiridium cardinale* és a *Pestalotiopsis funerea* kórokozókat részletezem.

2.1. A kórokozók rendszertani besorolása és elnevezése

2.1.1. A *Seiridium cardinale* rendszertani besorolása és elnevezése

A *Seiridium cardinale* (Wagener) Sutton & Gibson kórokozó az Ascomycota törzsbe, a Sordariomycetes osztályba, az Amphisphaeriaceae családba, azon belül is a *Seiridium* nemzetségbe tartozik (**MycoBank, Index Fungorum**). A kórokozót *Coryneum cardinale* néven először **Wagener (1928; 1939)** írta le Kaliforniában. **Sutton és Gibson (1972)** a későbbiekben *Seiridium cardinale*-ként határozták meg. A kórokozó ivaros alakját, amely a *Leptosphaeria* nemzetségbe tartozik, **Hansen (1956)** Kalifornia középső részén, elhaló és elhalt növényi részeken figyelte meg egyszer, azonban a teleomorf alak jellemzése meglehetősen hiányos.

2.1.2. A *Pestalotiopsis funerea* rendszertani besorolása és elnevezése

A *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert rendszertanát tekintve az Ascomycota törzsbe, a Sordariomycetes osztályba, az Amphisphaeriaceae családba és a *Pestalotiopsis* nemzetségbe tartozik (**MycoBank, Index Fungorum**). A kórokozóról Desmazières tett először említést *Pestalotia funerea* néven az 1800-as évek közepén. A *Pestalotiopsis funerea*

elnevezést **Steyaert (1949)** használta először. A *Pestalotiopsis* nemzetség ivaros alakjai a *Pestalospaeria* nemzetségbe tartoznak, a teleomorf alaknak azonban nincs jelentősége a kórokozók biológiájában (**Barr, 1975**).

2.2. A kórokozók jelentősége

2.2.1. A *Seiridium cardinale* jelentősége

Wagener (1939) leírása szerint a gomba akkoriban súlyos ágelhalást, kéregelhalást és növénypusztulást okozott Amerikában ciprus és tuja fajokon. **Barthelet és Vinot (1944)** a *Seiridium cardinale* okozta súlyos megbetegedésekről számol be Európában. **Beresford és Mulholland (1982)** szerint a gomba gyakran megbetegíti az új-zélandi ciprus fajokat, jelentős károkat idézve elő. **Graniti (1986)** a ciprus legfontosabb kórokozójaként nevesíti, mely a faiskolában, a telepített és az őshonos állományokban egyaránt súlyos gazdasági károkat okoz, majd néhány évvel később „újabb ökológiai katasztrófaként” említi a megbetegedéseket és felhívja a figyelmet a kémiai növényvédelem szükségességére (**Graniti, 1993**). **Barnes és mtsai. (2001)** adatai alapján három *Seiridium* faj - köztük a *Seiridium cardinale* - ciprusfélék ezreinek az elhalását okozza a mediterrán régióban. **Pedron és mtsai. (2007)** szerint a kórokozó világszerte elterjedt, amely veszélyezteti az erdőket, és a termesztett dísciprusokat egyaránt. **Orlóci (2011)** a kórokozó járványszerű terjedésről beszámol be, amely a magyarországi állományok mindegyikét érinti. A ciprusfélék közül a x *Cupressocyparis leylandii* és a *Cupressus macrocarpa* a legfogékonyabbak (**Beresford és Mulholland, 1982**).

2.2.2. A *Pestalotiopsis funerea* jelentősége

Mordure (1976) szerint a gomba szórványos hajtáselhalást okoz, mely rontja a ciprusok díszítőértékét. **Pirone (1978)** szerint a *Pestalotiopsis* fajok gyengültségi paraziták, melyek csak kisebb kártételt idéznek elő a ciprusféléken. Ezzel szemben **Hopkins és McQuilken (2000)** rámutat arra, hogy a kórokozó súlyos károkat is okozhat a cserepes állományokban. **Gonthier és Nicolotti (2002)** megfigyelései szerint a *Pestalotiopsis funerea* okozott súlyos megbetegedést fiatal leylandi ciprusokon egy olaszországi faiskolában. A kórokozó Európában és Amerikában is rendkívül elterjedt, az ágak szöveteinek besüppedését,

nekrózisát okozza (Veser, 2002; 2003). Jeewon és mtsai. (2004) a ciprusfélékről a leggyakrabban izolált kórokozóként említik.

2.3. A kórokozók földrajzi elterjedése

2.3.1. A *Seiridium cardinale* földrajzi elterjedése

A kórokozót elsőként **Wagner** írta le Kaliforniában (1928; 1939). Azóta a *Seiridium cardinale* világszerte elterjedt. **Sutton és Gibson (1972)** feltételezése szerint a fertőzés Új-Zélandról indult. Más kutatók szerint Észak-Amerikából terjedt el a kórokozó a világ többi részére. Ezt a hipotézist támasztja alá **Della Rocca és mtsai. (2011)** a β -tubulin gén filogenetikai vizsgálatáról szóló tanulmánya. A kórokozó napjainkra már majdnem az összes kontinensen megtalálható (**Anonymus, 2012; Farr and Rossman, 2012**):

EPPO régió: Algéria, Horvátország, Ciprus, Franciaország, Németország, Görögország, (Kréta), Írország, Izrael, Olaszország, Montenegró, Marokkó, Portugália, Szerbia, Spanyolország, Tunézia, Törökország, Egyesült Királyság (Anglia, Észak-Írország) (1. ábra)

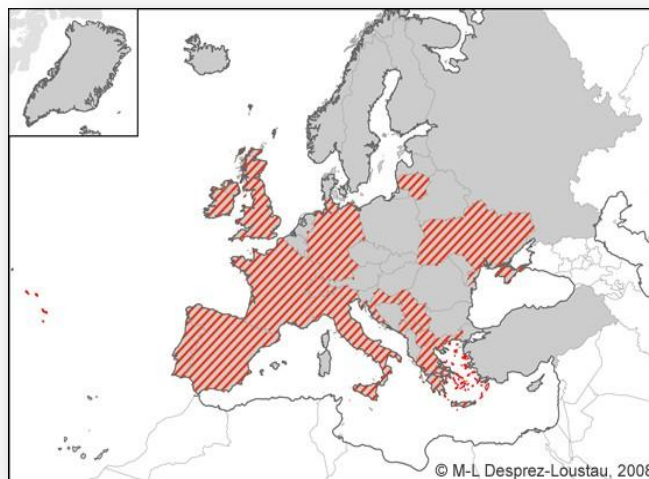
Afrika: Tunézia, Algéria, Marokkó, Dél-Afrika

Ázsia: Izrael, Szíria

Észak-Amerika: Kanada, Amerikai Egyesült Államok (Alaszka, Kalifornia, Oregon)

Dél-Amerika: Argentína, Costa Rica

Ausztrália és Óceánia: Ausztrália (Nyugat-Ausztrália), Új-Zéland (északi és déli szigetek).



1. ábra: A *Seiridium cardinale* európai elterjedése

(Forrás: <http://www.europe-aliens.org/speciesFactsheet.do?speciesId=50646#>)

2.3.2. A *Pestalotiopsis funerea* földrajzi elterjedése

A Föld minden kontinensén találkozhatunk a *Pestalotiopsis funerea* által okozott tünetekkel (Farr és Rossman, 2012):

EPPO régió: Olaszország, Franciaország, Egyesült Királyság, Hollandia, Belgium, Spanyolország, Görögország, Oroszország, Izrael, Montenegró, Szerbia.

Afrika: Kenya, Zambia, Tanzánia, Rodézia, Zaire, Dél-Afrikai Köztársaság.

Ázsia: Japán, India, Kína, Pakisztán.

Észak-Amerika: Amerikai Egyesült Államok, Kanada

Dél-Amerika: Ekvádor

Ausztrália és Óceánia: Ausztrália, Új-Zéland.

2.4. A kórokozók gazdanövényköre

2.4.1. A *Seiridium cardinale* gazdanövényköre

A kórokozó a nyitvatermők törzsébe tartozó növényeken okoz tüneteket. Az USDA (United States Department of Agriculture) adatbázisa alapján, az alábbi növényeket betegíti meg: *Calocedrus decurrens*, *Cedrus* sp., *Chamaecyparis lawsoniana*, *Chamaecyparis nootkatensis*, *Chamaecyparis* sp., x *Cupressocyparis leylandii*, *Cupressus arizonica*, *Cupressus arizonica* var. *arizonica*, *Cupressus leylandii*, *Cupressus macrocarpa*, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*, *Cupressus sempervirens* var. *stricta*, *Cupressus torulosa*, *Juniperus chinensis*, *Juniperus sabina*, *Juniperus virginiana*, *Platycladus orientalis*, *Protea* sp., *Thuja occidentalis*, *Thuja orientalis*, *Thuja plicata* (Farr és Rossman, 2012).

2.4.2. A *Pestalotiopsis funerea* gazdanövényköre

A *Pestalotiopsis funerea* a nyitvatermőkön kívül számos zárvatermő növényen okozhat tüneteket az USDA adatbázisa szerint. Gazdanövényei: *Abies bracteata*, *Abies nordmanniana*, *Acanthopanax sciadophylloides*, *Agathis australis*, *Araucaria araucana*, *Araucaria bidwillii*, *Araucaria excelsa*, *Cassia tora*, *Chamaecyparis lawsoniana*, *Chamaecyparis nootkatensis*, *Chamaecyparis obtusa*, *Chamaecyparis thyoides*, *Coffea arabica*, *Cryptomeria japonica*, *Cunninghamia sinensis*, *Cupressocyparis leylandii*,

Cupressus arizonica, *Cupressus lusitanica*, *Cupressus macrocarpa*, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus* sp., *Cupressus torulosa*, *Cytisus scoparius*, *Diospyros kaki* var. *domestica*, *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus cloeziana*, *Eucalyptus gigantea*, *Eucalyptus globosus*, *Eugenia smithii*, *Flacourtia ramontchii*, *Gardenia* sp., *Hakea sericea*, *Libocedrus decurrens*, *Libocedrus plumosa*, *Mangifera indica*, *Myrtus* sp., *Nothofagus truncata*, *Pandanus tectorius*, *Pinus banksiana*, *Pinus canariensis*, *Pinus densiflora*, *Pinus halepensis*, *Pinus khasya*, *Pinus koraiensis*, *Pinus muricata*, *Pinus palustris*, *Pinus patula*, *Pinus radiata*, *Pinus resinosa*, *Pinus roxburghii*, *Platanus occidentalis*, *Platycladus orientalis*, *Quercus pyrenaica*, *Ribes* sp., *Spartium junceum*, *Spartium* sp., *Syringa vulgaris*, *Thuja occidentalis*, *Thuja plicata*, *Thujopsis dolabrata*, *Typha angustata*, *Vitis vinifera* (**Farr és Rossman, 2012**).

2.5. A gazdanövényeken okozott tünetek

2.5.1. A *Seiridium cardinale* okozta tünetek

A fertőzött fák tipikus tünetei a koronán, és a fás részeken figyelhetők meg. A fertőzés következtében a hajtásokon sárgásbarna vagy vöröses színű elhalás jelenik meg (**2. ábra**), amely a hajtáscsúcs vége felé halad (**Sutton és Gibson, 1972**). A fertőzés következtében a hajtások, ágak teljesen elhalhatnak. **Graniti (1986)** szerint a fás részeken rákos sebek jelennek meg, amelyet gyantafolyás kísér (**3. ábra**). A rákos elváltozások a törzsön és az idős fás részeken lassan növekszenek, a fiatal részeken azonban gyorsan végbemegy az elhalás (**Panconesi és Raddi, 1991**).

A *Seiridium cardinale* szaporítóképletei acervuluszban képződnek, amelyek epidermisszel fedettek, ezért kezdetben szabad szemmel nem láthatóak (**Goidánich, 1964**). Enyhe, nedves időjárás hatására az epidermisz felszakadásával azonban a sötét színű acervuluszok láthatóvá válnak a fertőzött növényi részeken (**Barnes és mtsai., 2001**).



2. ábra: *Seiridium cardinale* okozta hajtás- és ágelhalás több éves leylandi ciprus sövényen
(Forrás: http://meta.arsia.toscana.it/meta/meta?id_news=291)



3. ábra: Erős mézgafolyás *Seiridium cardinale* által fertőzött növény törzsén
(Forrás: <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?t=85182>)

2.5.2. A *Pestalotiopsis funerea* okozta tünetek

A kórokozó a ciprusféléken szöveti nekrozist és részleges vagy teljes hajtáselhalást idéz elő (Bajo és mtsai., 2008). A levelek sárgulnak, majd barnán elhalnak (4. ábra). A fertőzés következtében a hajtások elhalnak, gyakran a hajtás csúcsától befelé haladva (Dennis, 1995). A kórokozó kezdetben epidermisz fedett acervuluszokat képez a fertőzött növényi részekben, (Goidánich, 1964; Graniti, 1986), amelyek az epidermisz felszakadása után szabad szemmel is jól láthatóvá válnak (Ellis és Ellis, 1997). A szerzők említik, hogy a fekete pontszerű képletek elszórtan helyezkednek el a fertőzött növényi részekben (5. ábra). Nedves körülmények között a termőtestből fekete színű konídiummassza (6. ábra) tör elő (Bánhegyi és mtsai., 1985).



4. ábra: *Pestalotiopsis funerea* okozta megbetegedés következtében elhaló hajtásvégek
(Forrás: <http://apps.rhs.org.uk/advicesearch/profile.aspx?pid=733>)



5. ábra: A *Pestalotiopsis funerea* acervuluszai
(Forrás: <http://www.zdravgozd.si/prirocnik/slika.aspx?idslika=3e7f47e4-5833-420d-a985-f11beff266d7>)



6. ábra: A *Pestalotiopsis funerea* acervuluszaiból „kacsszerűen” előtörő konídiummassza
(Forrás: <http://www.flickr.com/photos/31564507@N02/>)

2.6. A kórokozók biológiája

2.6.1. A *Seiridium cardinale* biológiája

A *Seiridium cardinale* konídiumai általában a szél, esetleg vektorok segítségével terjednek és jutnak el a növényekhez. A kórokozót szű bogarak, mint pl. *Phloeosinus* spp. és *Orsillus* spp. is terjesztik (Pedron és mtsai., 2007). A kórokozó terjedését elősegítheti a magas páratartalom és az enyhe időjárás, ezért a fertőzésre a téli-tavaszi időszakban fokozottan számíthatunk. Ellis és Ellis (1997) szerint a konídiumok a fertőzött, elhalt és egészséges növényi részekben egyaránt képesek fennmaradni a téli nyugalmi időszakban.

2.6.2. A *Pestalotiopsis funerea* biológiája

Espinoza és mtsai. (2008) elsődleges fertőzési forrásként a konídiumokat említik. Wright és mtsai. (1998) megállapították, hogy a *Pestalotiopsis* fajok vagy csak sebzésen keresztül tudnak fertőzni, vagy olyan növényeket fertőznek, amelyek korábban stressz hatásnak voltak kitéve.

2.7. A kórokozók morfológiai jellemzői

2.7.1. A *Seiridium cardinale* termőtestjeinek és konídiumainak morfológiai jellemzői

A *Seiridium cardinale* termőtestei, az acervuluszok, elszórtan helyezkednek el a fertőzött növényi részekben. A fekete képletek a növények hajtásain és fás részein jelennek meg, gyakran sebzések környékén vagy az ágak, hajtások törzs közeli részénél (Graniti, 1986). Kezdetben epidermisz fedi őket, amelyek hamar felszakadnak. A termőtestek kör vagy szabálytalan alakúak lehetnek, megnyúlt sejtek alkotják (Morgan-Jones és mtsai., 1972). Az acervuluszok átmérője 250-300 µm (Goidánich, 1964; Sutton, 1980).

A kórokozó konídiumai holoblasztikusan képződnek az acervuluszokban (Graniti, 1986). A konídiumok megnyúltak, kissé görbültek, faluk sima, általában 5 szeptummal tagoltak, egyesével képződnek (Morgan-Jones és mtsai., 1972). A konídiumok 6 sejtből állnak, amelyekből a 4 középső vastag falú és sötétbarna színű (7. ábra). A két szélső zárósejt vékonyfalú, kúp alakú, rendszerint világosabb színű vagy átlátszó. A zárósejtekhez gyakran 1

μm hosszúságú függelék kapcsolódik (Sutton, 1980). A konídiumok méreteit tekintve a szakirodalomban hasonló értékek találhatók (1. táblázat). A *Seiridium cardinale* a konídiumok morfológiája alapján elkülöníthető a másik két *Seiridium* fajtól (8. ábra), a *Seiridium unicorne*-től és a *Seiridium cupressi*-től (Barnes és mtsai., 2001). Chou (1989) leírása alapján a konídiumok mérete és alakja nagyon hasonló a három fajt tekintve, különbségek csak a zárósejteken elhelyezkedő függelékek meglétében vagy hiányában mutatkoznak (8. ábra).

1. táblázat

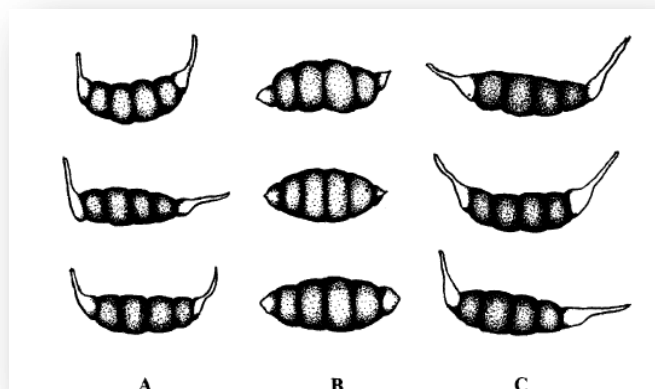
Seiridium cardinale konídiumainak méretei egyes szerzők adatai alapján

Konídiumok hosszúsága (μm)	Konídiumok átmérője (μm)	Szerző
23	8,5	Goidánich (1964)
21-30	8-9	Sutton (1980)
21-30	8-9	Brandenburger (1985)
21-26	8-10,5	Graniti (1986)
18-30	8-11	Ellis és Ellis (1997)
20-29	8-10	Tsopelas és mtsai. (2007)



7. ábra: A *Seiridium cardinale* konídiumai

(Forrás: <http://www.earthtimes.org/nature/california-fungus-kills-cypress-trees-worldwide/1328/>)



8. ábra: A - *Seiridium unicorne*, B - *Seiridium cardinale*, C - *Seiridium cupressi* konídiumai
(Forrás: Barnes és mtsai., 2011)

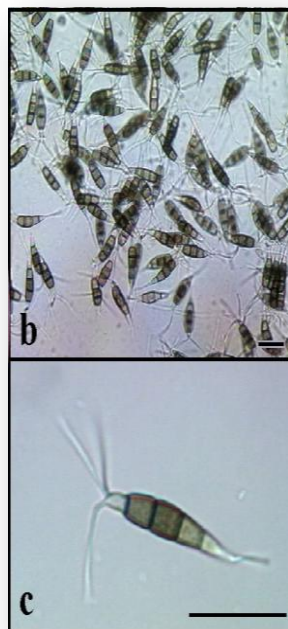
2.7.2. A *Pestalotiopsis funerea* termőtestjeinek és konídiumainak morfológiai jellemzői

A *Pestalotiopsis funerea* acervuluszokat képez. A gyakran szabályos kör alakú termőtestek a fertőzött növényi részeken elszórtan, gyakran csoportokban helyezkednek el, és kedvező feltételek mellett előtörnek az epidermisz alól (Morgan-Jones és mtsai., 1972). A szerzők azt is említik, hogy a konídiumképzés az acervuluszokban igen bőséges. Az acervuluszok fekete színűek, méretük 200-300 μm (Goidánich, 1964).

A konídiumok egyesével képződnek, megnyúltak, orsó alakúak és 3-5 harántfallal tagoltak (Morgan-Jones és mtsai., 1972). A csúcsi sejtek kúp alakúak, átlátszóak. A konídiumok apikális végükön 2-5 nyúlványban végződnek, melyek 10-27 μm hosszúak lehetnek (Ellis és Ellis, 1997). Ainsworth és mtsai. (1973) szerint a bazális végeken egy nyúlvány található, amely jóval rövidebb az apikálisnál, 5-14 μm hosszúságú (9. ábra). A zárósejtek rendszerint világosabbak, mint az öt középső sejt, melyek olajbarnák (Brandenburger, 1985). A konídiumok méreteit tekintve az egyes szakirodalmak hasonló értékeket említene (2. táblázat).

2.7.3. A *Seiridium cardinale* tenyészetének morfológiai jellemzői

Burgonya-dextróz agaron a tenyészetek széle ép, felületükön légmicélium képzés figyelhető meg (Danti és mtsai., 2009). A tenyészetek fonáki oldala lazacszínű, amely gyakran a leoltási ponthoz közel idővel megsürkül vagy megbarnul (Sutton és Gibson, 1972; Tsopeles és mtsai., 2007). A *Seiridium cardinale* tenyészbélyegei alapján nem különíthető el teljes bizonyossággal a többi *Seiridium* fajtól (Chou, 1989).



9. ábra: A *Pestalotiopsis funerea* konídiumai
(Forrás: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2820/3/Fig2.jpg>)

2. táblázat

A *Pestalotiopsis funerea* konídiumainak méretei egyes szerzők adatai alapján

Konídiumok hossza (μm)	Konídiumok szélessége (μm)	Irodalom
22	5	Goidánich (1964)
22-32	7-13	Mordue (1976)
22-32	6-8	Bánhegyi és mtsai. (1985)
22-32	7-13	Brandenburger (1985)
25-33	8-13	Ellis és Ellis (1997)

2.7.4. A *Pestalotiopsis funerea* tenyészetének morfológiai jellemzői

Mordue (1976) szerint a *Pestalotiopsis funerea* tenyésze burgonya-dextróz agaron szinte teljesen fehér, felületén légmicélium képződés figyelhető meg. A tenyészet felszínén néhány hét elteltével fekete micélium tömörülések jelentkeznek (**10. ábra**). A tenyészetek széle teljesen ép.



10. ábra: *Pestalotiopsis funerea* tenyésztete burgonya-dextróz agaron
(Forrás: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2820/3/Fig2.jpg>)

2.8. A fonalas gombák molekuláris azonosítása

A fonalas gombák molekuláris jellemzéséhez elsősorban a riboszomális RNS-eket kódoló DNS-en elhelyezkedő ITS (Internal Transcribed Spacer) régiókat vizsgálják, ill. az ezt követő 28S rDNS-t. Ez a régió a következő részekből áll: 18S rDNS, ITS1, 5,8S rDNS, ITS2 és a 28S rDNS-t (White és mtsai., 1990). Az ITS régió viszonylag konzervált régiónak tekinthető, ezért alkalmas univerzális primerek tervezésére és használatára, amelyek alkalmasak a fonalas gombák többségéből PCR (Polimerase Chain Reaction, Polimeráz láncreakció) segítségével ezt a régiót megsokszorozni (White és mtsai., 1990; O'Donnell, 1993). Mindemellett azonban ez a régió alkalmas az egyes fajok elkülönítésére is a legtöbb esetben, így erről a régióról található a legtöbb szekvencia adat a különböző adatbázisokban. Viljoen és mtsai. (1993) munkájuk során a riboszomális DNS ITS régiójának egy részét vizsgálták, és következtettek a *Seiridium* nemzeten belüli filogenetikai kapcsolatokra. Megállapították, hogy a kórokozók széles morfológiai diverzitást mutatnak, így feltétlenül szükséges a molekuláris azonosítás is a pontos, fajszintű meghatározásához. A *Pestalotiopsis* fajok molekuláris azonosításához Hu és mtsai. (2007) az ITS régió és a β -tubulin gén együttes vizsgálatát javasolták. Liu és mtsai. (2010) szerint azonban azt ITS régió önmagában is alkalmas a *Pestalotiopsis* nemzetségbe tartozó fajok elkülönítésére.

3. Anyag és módszer

3.1. Vizsgálat helye és ideje

A mintagyűjtést 2011-2012-ben végeztük, közterületi állományokból és magánkertekből, az ország több pontjáról. A fertőzött növényanyag vizsgálata, a kórokozók azonosítása és jellemzése a Budapesti Corvinus Egyetem, Növénykórtan Tanszékének laboratóriumában történt.

3.2. Vizsgálat anyaga

3.2.1. Izolátumok

Munkám során 11 különböző izolátumot gyűjtöttünk, melyek örökzöld dísznövényekről - elsősorban leylandi ciprusról - származnak (3. táblázat).

3. táblázat

Az izolátumok neve, gazdanövénye, a gyűjtés helyszíne és éve

Izolátum neve	Gazdanövény	Gyűjtés helyszíne	Gyűjtés éve	Megjegyzés
N1	× <i>Cupressocyparis leylandii</i>	Budapest	2011	fiatal sövény
N2/1	× <i>Cupressocyparis leylandii</i>	Csorna	2011	idős útszéli állomány
N2/2	× <i>Cupressocyparis leylandii</i>	Csorna	2011	idős útszéli állomány
N3	<i>Thuja occidentalis</i> 'Smaragd'	Budapest	2011	házikerti 15 éves egyed
N4	× <i>Cupressocyparis leylandii</i>	Budapest	2012	idős állomány (temető)
N5	× <i>Cupressocyparis leylandii</i>	Szombathely	2012	idős egyed (parkoló)
N6	× <i>Cupressocyparis leylandii</i>	Budapest	2012	idős egyed (házikert)
N7	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	Budapest	2012	házikert
N8	<i>Cupressus macrocarpa</i>	Budapest	2012	házikert
N9	× <i>Cupressocyparis leylandii</i>	Siófok	2012	fiatalabb növény (kert)
N10	× <i>Cupressocyparis leylandii</i>	Budakeszi	2012	15-20 éves (közterület)

3.2.2. Kórokozók

A mintagyűjtést követő vizsgálatok során a *Seiridium* és a *Pestalotiopsis* nemzetségekbe tartozó kórokozókat vizsgáltuk. Az elhalt részeken gyakran előforduló szaprofita fajokkal nem foglalkoztunk.

3.2.3. Táptalajok

Burgonya-dextróz agart (PDA, Reanal) használtunk a kórokozók leoltásához, tenyésztéséhez és fenntartásához (39 g PDA, 1000 ml végtérfogatra desztillált vízzel kiegészítve). A transzformálás során 2TY (4 g tripton; 2,5 g yeast extract; 1,25 g NaCl 250 ml végtérfogóban) és ampicillines LB táptalajt [2,5 g tripton; 1,25 yeast extract; 2,5 g NaCl 250 ml végtérfogóban + 500 µl (50µg/ml) ampicillin], a mini preparátum készítéséhez szilárd és folyékony ampicillines LB táptalajt használtunk.

3.2.4. Primerek, enzimek, vegyszerek, kitek

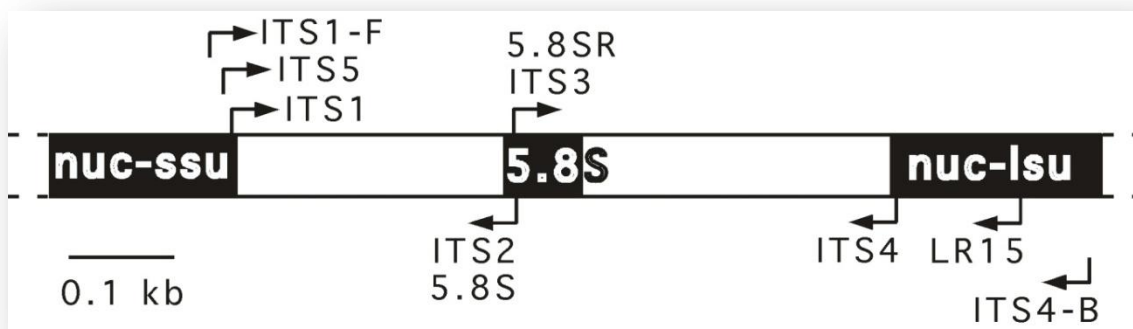
Primerek

A polimeráz láncreakció során univerzális primereket használtunk, amelyek az ITS régió egy részét sokszorozzák meg (11. ábra).

ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-3')

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White és mtsai., 1990).



11. ábra: Az ITS régió és primerei

(Forrás: http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/Protocols_Folder/Primers/Primers.htm)

Enzimek, vegyszerek, kitek

A PCR-hez: rekombináns *Taq* DNS polimeráz enzim (5 u/μl); puffere: 10x-es *Taq* puffer +KCl - MgCl₂, pH: 8,8. A ligáláshoz: T4 DNS ligáz enzim (5 u/μl); puffere: 10x-es T4 DNS ligáz puffer pH: 7,8. A plazmidot tartalmazó baktérium kolóniák kék-fehér szín szelekciójához IPTG-t [10 μl (100 mM/ml)] és Xgal-t [40 μl (10 mg/ml)] használtunk, melyeket előzetesen a táptalajon szélesztettünk. Az inzertet a plazmidból FastDigest *EcoRI* (10 u/μl) restrikciós endonukleázzal vágtuk ki. Az enzim puffere: 1x FastDigest zöld puffer pH: 7,5. Az enzimeket a Fermentas cégtől vásároltuk.

A PCR-terméket Roche-tól vásárolt High Pure PCR Product Purification Kit-tel tisztítottuk. A szekvenáláshoz Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-tel (BIO RAD) tisztítottuk a rekombináns plazmidokat.

3.2.5. Eszközök

A kórokozók izolálásához az általánosan használt fém- és üvegeszközök mellett, 85 mm átmérőjű, steril műanyag Petri-csészéket használtunk. A kórokozók morfológiai jellemzéséhez Leica MZ6 sztereomikroszkópot és Nikon Eclipse 50i citoplaszt mikroszkópot alkalmaztunk. A mikroszkópikus fotókat QImaging MicroPublisher 5.0 RTV típusú kamerával készítettük. Az egykonídiumos tenyészeteket Carl Zeiss Jena inverz mikroszkóp segítségével állítottuk elő. A molekuláris biológiai vizsgálathoz Applied Biosystem 9700 típusú PCR-készüléket használtunk. A nukleinsavak koncentrációját NanoDrop 2000c készülékkel mértük meg.

3.3 A vizsgálat módszere

3.3.1. Mintagyűjtés, tárolás

A mintagyűjtés során a tüneteket mutató ágakat lehetőség szerint egészséges résszel együtt metszettük le. A vizsgálat megkezdéséig a mintákat papírzacskókban, a laboratórium hűtőszekrényében 4 °C-on tároltuk.

3.3.2. A kártétel felmérése

A csornai és az Új- Köztemetőben lévő növényállományokban 100-100 véletlenszerűen kiválasztott hajtást megvizsgálva, a növényi részeket betegségkategóriákba soroltuk, majd a Townsend és Heuberger képlete alapján betegségfokot számítottunk (Gartner, 1971).

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

A Townsend-Heuberger betegségfokot az alábbi képlet segítségével számítottuk ki:

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

ahol:

P – betegségfok

n – a növényrészek száma kategóriánként

v – kategória érték (6)

Z – a legmagasabb kategória értéke

N – a vizsgált összes növényrész száma

3.3.3. A kórokozók izolálása táptalajon

A fertőzött növényanyagon található termőtesteket mikroszkóp alatt megvizsgáltuk. A termőtestekből steril lándzsátű segítségével szaporítóképleteket emeltünk le burgonya-dextróz agarra. Majd a növekedésnek indult tenyészetek széléből 5 mm-es steril dugófűrő segítségével, micéliummal átszőtt korongot emeltünk át steril burgonya-dextróz agar táptalajra.

Abban az esetben, amikor a fenti módszerrel nem sikerült a kórokozót izolálnunk, egy konídiumos tenyészetet állítottunk elő. A fertőzött növényi részen megjelenő

szaporítóképletekből konídiumokat mostunk steril vízbe és konídiumszuszpenziót készítettünk. A konídiumszuszpenzióból pipetta segítségével egy steril Petri-csészébe 20 µl-t cseppentettünk, majd 1 ml kézmeleg burgonya dextróz agarral a lehető legvékonyabban szélesztettük. A megszilárdulást követően inverz mikroszkóp segítségével egyedi konídiumokat vágunk ki láng felett kihúzott vékony üvegbot segítségével, majd steril táptalajra helyeztük őket. A tiszta tenyészetet sötétben, 24 °C-on inkubáltuk.

3.3.4. Patogenitási teszt

A patogenitási teszteket eredeti gazdanövényhez tartozó fajon végeztük. Etanolos (70%) fertőtlenítést követően a hajtásokat steril vízzel öblítettük le. A hajtások fás részein steril szikével izolátumonként 3-3, a belső szövetekig hatoló sebzést ejtettünk (**12. ábra**). Növekvő tiszta tenyészet széléből micéliummal átszőtt táptalaj korongot helyeztünk a sebzésbe, amelyet végül Parafilmmel zártunk le. A nem fertőzött kontroll esetében a hajtásokat steril táptalaj korongokkal inokuláltuk. A mesterségesen fertőzött hajtásokat vízbe helyeztük és üvegburával letakartuk. A tüneteket 19-21 nap elteltével értékeltük.



12. ábra: Leylandi ciprus hajtások inokulálása patogenitási teszthez
(Fotó: Petróczy, 2012)

3.3.6. Morfológiai és tenyészbélyegek vizsgálata

Sztereomikroszkóppal megfigyeltük a fertőzött növényi részeken a termőtestek elhelyezkedését, színét és jellemzőit. Amennyiben a hajtásokon, ágakon a főtünet nem jelentkezett, az érintett hajtást néhány napra nedves kamrába helyeztük a szaporítóképletek megjelenéséig.

Vizsgáltuk a konídiumok színét, alakját, sejtszámát és egyéb jellemzőit. Izolátumonként 100-100 konídium hosszát és átmérőjét mértük meg QCapture Pro 6.0 programcsomag segítségével.

A tenyészetek színét, mintázottságát, szélét, alakját megvizsgálva azonosítottuk a kórokozókra jellemző tenyészbélyegeket. Az izolátumok tiszta tenyészein két egymással derékszöget bezáró átmérőt mértünk. Az értékekből kiszámítottuk az egyes izolátumok átlagos növekedési ütemét (mm/24h).

3.3.7. Molekuláris biológiai vizsgálatok

Néhány kiválasztott izolátum esetében elvégeztük a kórokozók morfológiai azonosítását és jellemzését.

Össznukleinsav kivonás CTAB módszerrel

A DNS kinyeréséhez négy napos tenyészeteket használtunk. A gomba tenyészetéből 8 mm átmérőjű korongot emeltük le a táptalajról és dörzsmozsárban kvarchomok segítségével eldörzsöltük. 800 µl CTAB puffer (2% CTAB; 1,4M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM TRIS-HCl pH: 8; 0,2% 2-ME) hozzáadása után tovább homogenizáltuk, majd az így kapott elegyet Eppendorf csövekbe töltöttük és 40 percig inkubáltuk 65 °C-os hőmérsékleten. A nukleinsav tisztítását kloroform/izoamil-alkohol 24:1arányú elegyével végeztük. Centrifugálást követően izopropanollal csaptuk ki a nukleinsavakat. A pelletet újabb centrifugálás után 70%-os etanollal mostuk, majd beszárítottuk. Az össznukleinsavat 30 µl 10 µg/ml RNase-t tartalmazó TE-oldatban oldottuk vissza (**Maniatis és mtsai., 1989**).

PCR (Polimeráz-láncreakció) vizsgálat

A vizsgálathoz összemért komponensek 50 µl végtérfogatra:

- 1 µl DNS (0,5 µg)
- 1 µl primer (20 pmol)
- 1 µl primer (20 pmol)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 5 µl 10x *Taq* puffer (+ KCl – MgCl₂)
- 0,5 µl *Taq* polimeráz enzim (5 u/µl)
- 2 µl 5 mM dNTPs (nukleotidok: A, G, C, T)
- 36,5 µl steril víz

A PCR ciklus során a kórokozó DNS elsődleges denaturálása 94 °C-on 3 percig, majd a ciklusokon belül 94 °C-on 30 s-ig történt. Az indítószekvenciaként szolgáló oligonukleotid kapcsolódása 55 °C-on 30 s-ig, majd a lánchosszabbítás 2 percig 72 °C-on zajlott. A 30 ciklus végeztével, az elmaradt szálak befejezésére került sor (72 °C, 10 percig). A PCR terméket ezt követően 1%-os GelRed-et tartalmazó agaróz gélben futtattuk. A PCR terméket a High Pure PCR Product Purification Kit-tel tisztítottuk meg, a gyártó utasításait követve.

Transzformálás *E. coli* DH 5-*a* törzsébe

A tisztított PCR-terméket pGEM-T Easy vektorba ligáltuk. A ligáláshoz 4 µl steril H₂O-t, 1 µl plazmidot (pGEM-T Easy), 1 µl puffert (T4 DNS ligáz 10x-es puffere), 1 µl enzimet (T4 DNS ligáz enzim, 5 u/µl), 3 µl inzertet (tisztított PCR-termék) mértük össze 10 µl végtérfogatra, majd egy egész éjszakán át 4 °C-on ligáltuk.

A kompetens sejtet, melyet -70 °C-on tároltunk jégen kiolvastottuk, majd a ligátumot is jégre helyeztük. A felolvadt kompetens sejtet a ligátumhoz mértük, 30 percig hagytuk jégen állni, majd egy percig 42 °C-on tartottuk. Ezt követően azonnal jégre tettük és öt percig állni hagytuk, majd hozzáadtunk 500 µl antibiotikum-mentes 2TY folyékony táptalajt, és összeforgattuk. 37 °C-on egy órán át ráztuk. Ezalatt az idő alatt ampicillin tartalmú LB szilárd táptalajra 10 µl IPTG-t (10 mM/ml) és 40 µl XGAL-t (10 mg/ml) szélesztettünk. A munkát csak a szélesztett komponensek száradását követően folytattuk. A rázás után az előkészített táptalajra 100 µl, ill. 50 µl-t kientünk a már felszaporodott baktérium tenyészetből. Száradás után a lemezeket 37 °C-ra helyeztük. A kolóniákat egy éjszakán át növesztettük.

Minipreparátum készítése és az inzert beépülésének ellenőrzése

Tizenkét egyedi fehér kolóniából 2–2 ml folyadékkultúrába (ampicillines LB) leoltottunk, és egy éjszakán keresztül 37 °C-on ráztattuk. A baktériumkultúrát Eppendorf csövekbe töltöttük szobahőmérsékleten 2 percig centrifugáltuk. A felülúszó leöntését követően, a pelletet lecsepegtettük és hozzáadtunk 200 µl „A” oldatot (15 mM TRIS HCl pH: 8; 10 mM EDTA; 50 mM glükóz), Vortex segítségével összeráztuk, majd öt percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezután hozzámértünk 400 µl „B” oldatot (0,2 M NaOH; 1% SDS), kézzel összeforgattuk, hozzáadtunk 300 µl „C” oldatot (60 ml 5 M Na-acetát; 11,5 ml ecetsav; 28,5 ml steril desztilláltvíz) majd ezzel is összeforgattuk. Öt perces jégen állás után, ismételen öt percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf csőbe töltöttük, így öt percig centrifugáltuk, majd a felülúszót ismét új Eppendorf csőbe töltöttük, és hozzámértünk 600 µl izopropanolt. Az izopropanollal összeforgattuk és öt percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. Leöntöttük a felülúszót, majd lecsepegtetést követően a pellethez hozzáadtunk 200 µl „D” oldatot (0,1 M Na-acetát pH: 7; 0,05 M TRIS HCl pH: 8), ezt 10 percig hagytuk szobahőmérsékleten állni, majd Vortex segítségével ráztuk, végezetül 400 µl etanollal öt percig centrifugáltuk. A felülúszót előntöttük és a pelletet beszárítottuk. Utolsó lépésként a pelletet visszaoldottuk 50 µl RNase TE oldatban [1 ml 10x TE, 9 ml steril H₂O, 10 µl RNase (10 mg/ml)].

A Minipreparátum módszerrel tisztított rekombináns klónok plazmidjaiból *EcoRI* enzimmal ellenőriztük a PCR-termék beépülését. Az emésztéshez 3 µl plazmidot (0,5 µg); 1 µl 10x *EcoRI* puffert; 0,2 µl *EcoRI* enzimet (10 u/µl) és 5,8 µl steril desztillált vizet mértük össze 10 µl végtérfogatra. Az Eppendorf-csöveket 10 percen át 37 °C-on inkubáltuk. A mintákat 1%-os GelRed-et tartalmazó agaróz gélben megfuttattuk, és ellenőriztük, a megfelelő hosszúságú inzert kivágódását.

Plazmid tisztítása szekvenáláshoz

A kiválasztott klónt újra felszaporítottuk 2 ml (ampicillines LB) folyadékkultúrában (37 °C, egész éjszakás rázatás). A baktériumkultúrákat Eppendorf csövekbe töltöttük, majd 3 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. Ezután Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel (BIO-RAD) a gyártó utasításai szerint tisztítottuk. Szekvenciameghatározásra 12 µl tisztított rekombináns plazmidot küldtünk.

Nukleinsav szekvencia meghatározása és analízise

A kiválasztott klónt szekvenciáját ABI 3500 (Applied Biosystems) típusú szekvenáló automatával, és ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kittel határoztattuk meg, M13 reverse és M13-20 forward primerekkel, a Szegedre BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiai Intézetben. A szekvencia azonosításához az EMBL/GeneBank adatbázist illetve annak BLAST programját használtuk fel. A szekvenciák összehasonlítását, filogenetikai törzsfák megrajzolását és a megbízhatóság becslésére szolgáló bootstrap analízist a CLC Sequence Viewer 6.5.3. szoftverrel végeztük.

A NCBI adatbankból a következő hivatkozási számokon található izolátumok szekvenciáit gyűjtöttük ki a filogenetikai analízishez: AF377299, AF405305, AF409996, AF409995, AF377289, AY838893, EF055197, HQ608011, AF405299.

4. Eredmények

A 10 helyszínről gyűjtött mintákról 8 esetben sikerült bizonyítani, hogy a hajtás- és az ágelhalásnak növénykórtani oka is van. Két kórokozó fordult elő a tüneteket mutató növényeken: a *Seiridium cardinale* és a *Pestalotiopsis funerea*. A Csornáról származó leylandi ciprus ágakról (N2/1, N2/2) mindkét kórokozót azonosítottunk. Az N9-es és az N10-es minták esetében nem sikerült kórokozót izolálni a növény belső szöveteiből, és szaporítóképletet sem találtunk a tüneteket mutató részeken, így valószínűsíthető, hogy abiotikus tényezők állnak az elhalás hátterében. A két említett kórokozón kívül, gyakran találoztunk szaprofita gombákkal az elhalt növényi részeken: elsősorban *Alternaria* fajokkal és egy esetben egy *Cladosporium* nemzetségbe tartozó gombával.

4.1. A *Seiridium cardinale* okozta tünetek, a kórokozó azonosítása és jellemzése

A *Seiridium cardinale* kórokozót két esetben azonosítottunk: a Csornáról származó N2/2 és a Szombathelyről származó N5 minta esetében. Mindkét esetben idősebb leylandi ciprus növényekről izoláltuk a gombát.

4.1.1. A *Seiridium cardinale* okozta tünetek

A kórokozó a szombathelyi és a csornai növényeken igen súlyos károkat okozott. Az állományban már messziről látszottak a „zászlósan” elhaló hajtások (**13. ábra**). Az adott évi fiatal hajtásokon éppúgy megjelent a tünet, mint a többéves idősebb ágakon. A fás részek esetében erőteljes mézgafolyást és rákos sebeket is megfigyeltünk (**14. ábra**).



13. ábra: Vörösesbarnán elhaló hajtások és ágak (Csorna)
(Fotó: Németh, 2011)

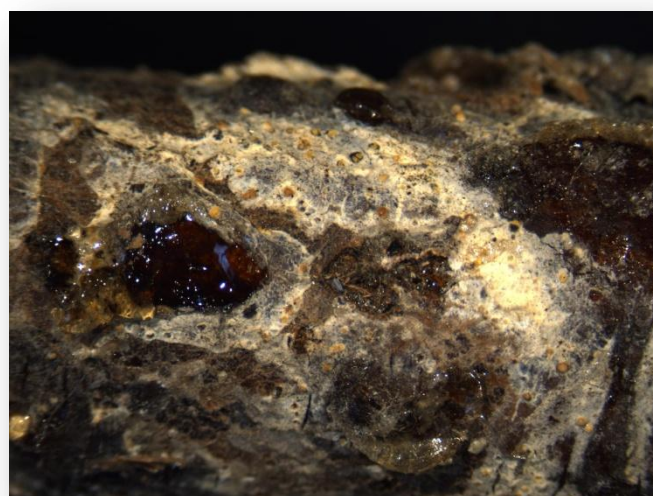


14. ábra: Rákos seb és mézgafolyás a fertőzött fás részeken, a csornai növényeken
(Fotó: Palkovics, 2011)

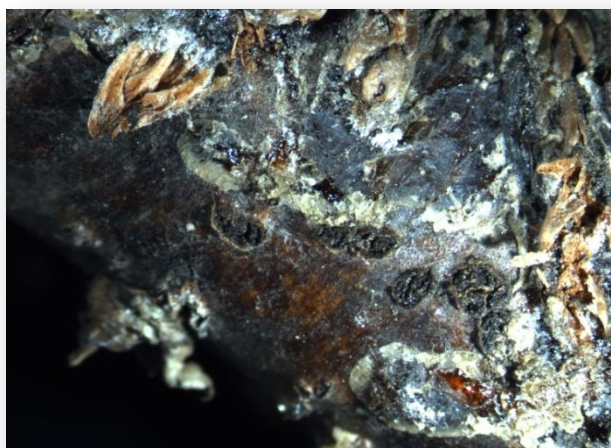
A csornai állomány több egyedből áll, amelyeken eltérő mértékben jelentkeztek a tünetek. Egyes egyedeken a fertőzési gyakoriság megközelítette az 40%-ot, míg más egyedeknél még kevésbé volt előrehaladott a betegség. Az állomány egészére vetített betegségfok értéke Csornán 26,33 volt 2011-ben.

4.1.2. A *Seiridium cardinale* morfológiai azonosítása és jellemzése

Az N2/2 és az N5 minták esetében az idősebb fás részeken elszórtan, valamint a rákos sebek környékén gyakran csoportosan, fekete színű acervuluszokat figyeltünk meg (15. és 16. ábra). Az acervuluszok mérete néhány száz μm -tól átmérőtől egészen 1 mm-ig terjedt. A termőtestekben szeták képződését nem tapasztaltuk.



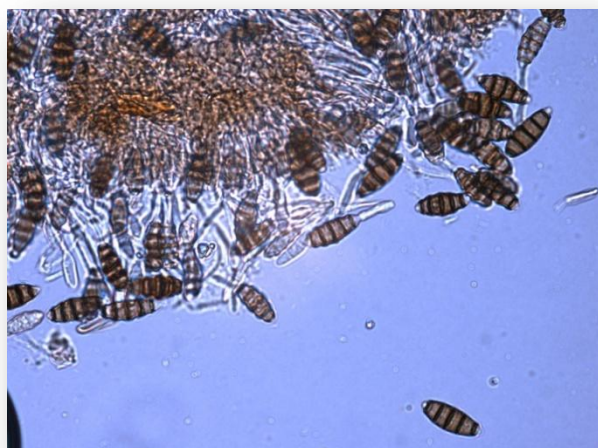
15. ábra: Acervuluszok a fás részeken (N5 izolátum)
(Fotó: Németh, 2011)



16. ábra: Fekete acervuluszok a rákos sebek mentén (Fotó: Németh, 2012)

nyúlványok láthatók. Hosszúságuk és átmérőjük változatos. (4. táblázat)

Az N2/2 és az N5 minták esetében a *Seiridium cardinale* kórokozóra jellemző konídiumokat figyeltünk meg az acervuluszokban (17. ábra). A konídiumok hosszúkasak, orsó alakúak, 6 sejtűek voltak (18. ábra). A 4 középen elhelyezkedő sejt sötétebb barna színű, mint az apikális és bazális véget lezáró csúcsi sejtek (18. ábra). A záró sejtek kúposak és világos színűek, rajtuk gyakran



17. ábra: N5 izolátum acervulusza, konídiumokkal (Fotó: Petróczy, 2011)



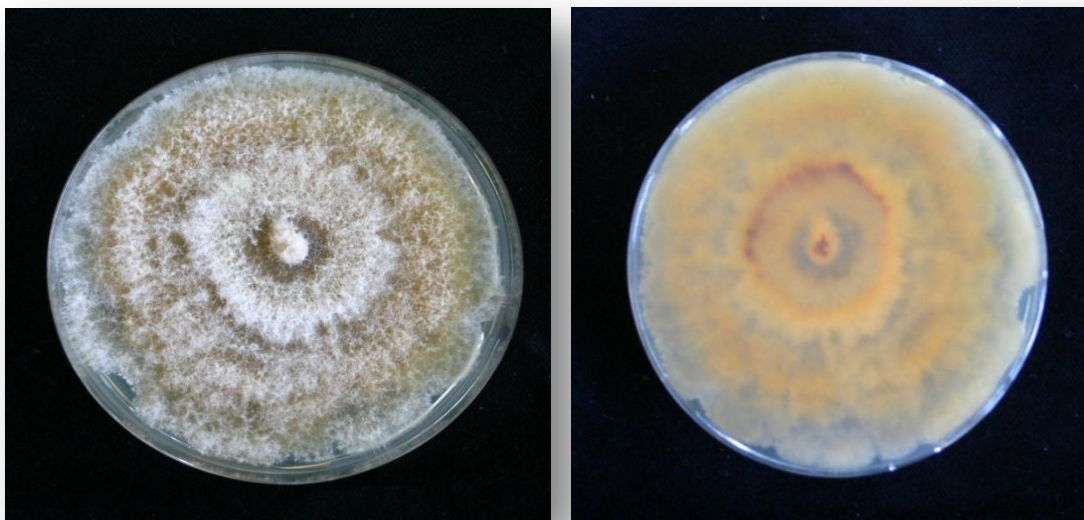
18. ábra: Az N2/2 izolátum éretlen és érett konídiumai (Fotó: Németh, 2012)

4. táblázat

A *Seiridium cardinale* konídiumainak átlagos méretei és szélsőértékei

Izolátum neve	Hosszúság (µm)	Átmérő (µm)
N2/2	(21,3) - 28,7 - (31,2)	(5,68) - 7,8 - (8,34)
N5	(22,4) - 26,9 - (29,8)	(6,2)- 8,3- (9,2)

Az N2/2 és az N5 izolátumok tenyészteteinek fonáki része burgonya-dextróz agaron élénk narancsos színezetű volt, felületükön gyér, vattaszerű, fehéres színű légmicélium képződött. A tenyészetek gyorsan növekedtek (N2/2: 5,8 mm/nap; N5: 6,6 mm/nap). A telep széle szabálytalan vagy enyhén csipkés volt, a tenyészetben enyhe rozettáltság jelentkezett (19. ábra).



19. ábra: A *Seiridium cardinale* 14 napos tenyésztetének színe és fonáka
(Fotó: Németh, 2012)

A csornai és a szombathelyi leylandi ciprusokról izolált kórokozókat morfológiai és tenyészbélyegek alapján *Seiridium cardinale*-ként határoztuk meg.

4.1.3. Patogenitási teszt

A N2/2 és az N5 izolátumok esetében a parafinos szalag eltávolítása után az inokulációs pont körül kiterjedt szöveti nekrozist észleltünk, így az izolátumok megbetegítőképességet bizonyítottuk (20. ábra).

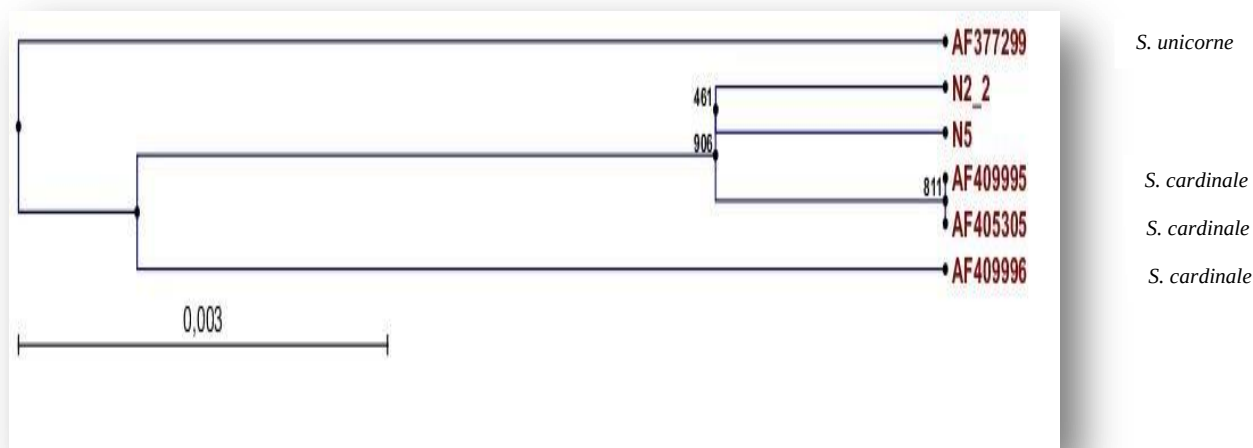


20. ábra: *Seiridium cardinale* okozta nekrozis mesterségesen fertőzött hajtáson
(Fotó: Németh, 2012)

4.1.4. A *Seiridium cardinale* molekuláris azonosítása és jellemzése

A molekuláris azonosítást mind a N2/2, mind a N5 izolátum esetében indokoltnak tartottuk. Az ITS1 és ITS4 indítószekvenciák 602 bp hosszúságú szakaszt emeltek ki a polimeráz láncreakció során. A PCR termék klónozása és szekvenciájának meghatározása után a nukleotid sorrendet összevetettük a nemzetközi adatbázisban fellelhető szekvenciákkal és megállapítottuk, hogy mind a két izolátum közel 100%-os homológiát mutat egyes *Seiridium cardinale* izolátumok szekvenciáival (AF409995, AF405305). A molekuláris azonosítás tehát megerősítette, hogy a csornai növényállományban és Szombathelyen a *Seiridium cardinale* okozta a súlyos tüneteket a leylandi ciprusokon.

A régió filogenetikai törzsfáját elemezve megállapítottuk, hogy a *Seiridium cardinale* izolátumok a törzsfán külön ágon helyezkednek el. Tőlük egyértelműen elkülönül a *Seiridium unicorn* Új-Zélandról *Cryptomeria japonica* gazdanövényről származó izolátuma (**21. ábra**).



21. ábra: A *Seiridium cardinale* és a *Seiridium unicorn* fajok izolátumainak filogenetika törzsfája a 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S régió szekvenciája alapján

Magyarázat: A törzsfán a vízszintes vonalak, ill. azok hossza az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák nukleotid sorrendjének eltérései alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják %-ban, 1000 mintavétel esetén. A törzsfa alatti skála mértéke 3 bázis eltérést jelöl 1000 bázisonként. Az izolátumokat hivatkozási számukkal jelöltük, mellettük feltüntettük a kórokozó nevét.

4.2. A *Pestalotiopsis funerea* okozta tünetek, a kórokozó azonosítása és jellemzése

Az N1, N2/1, N3, N4, N6, N7, N8 minták esetében a fertőzött növényi részekről a *Pestalotiopsis funerea* kórokozót izoláltuk, amely a fiatal és az idősebb leylandi ciprusok mellett tuján és monterey-cipruson is megjelent.

4.2.1. A *Pestalotiopsis funerea* okozta tünetek

A gomba hajtás- és ágelhalást okozott, amelyek nagy mértékben rontották a növények díszítőértékét (22. ábra). Az N1-es minta esetében fiatal, egyéves sövény egyes egyedein kezdetben sárguló, majd barnán elhaló hajtások jelentek meg. Az elhalás a hajtáscsúcstól befelé haladt. Hasonló tünetek jelentkeztek a többi növény esetében is. Az Új Köztemetői állományban (N4) a fás részeken rákos sebeket figyeltünk meg, azonban gyantafolyást nem észleltünk (23. ábra). A kiszámított betegségfok az Új Köztemetőben (N4) 18,54 volt.



22. ábra: Elhaló ágak az Új Köztemetőben (N4) (Fotó: Németh, 2011)

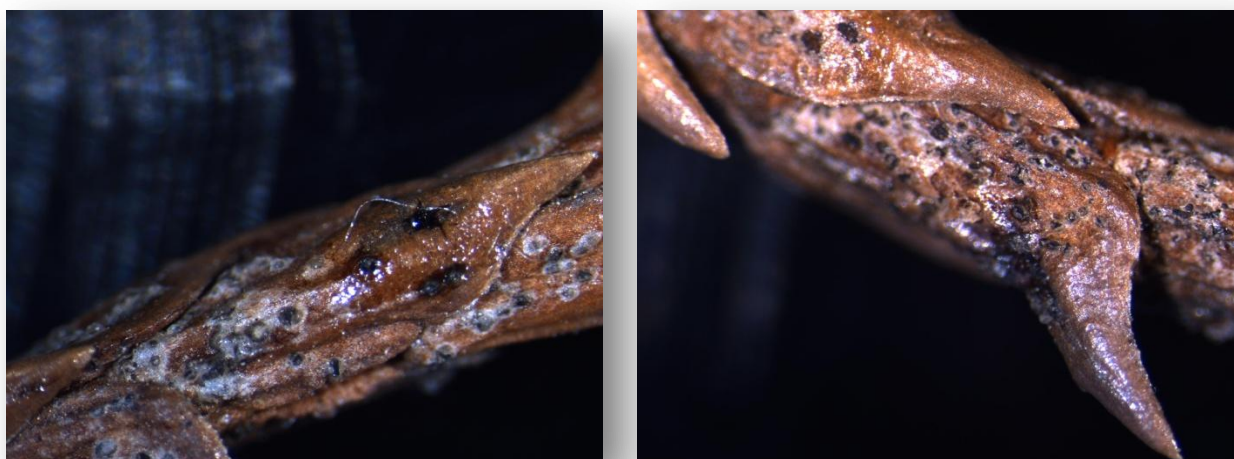


23. ábra: Rákos sebek a fás részeken
(Fotó: Németh, 2011)

A csornai növényállományból, ahol a *Seiridium cardinale* okozott súlyos ágelhalást, a *Pestalotiopsis funerea* kórokozót is izoláltuk, de ez utóbbi csak a száraz elhalt ágvégeken jelent meg másodlagosan, a fás szövetekből nem volt izolálható.

4.2.2. A *Pestalotiopsis funerea* morfológiai azonosítása és jellemzése

Az N1, N2/1, N3, N4, N6, N7, N8 minták esetében acervuluszok képződését figyeltük meg a tüneteket mutató növényi részeken. A termőtestek elsősorban az elbarnult leveleken, vagy a fiatalabb ágak fás részein elszórtan helyezkedtek el. Az epidermisz felszakadása után láthatóvá váltak a feketés színű, kör alakú vagy ovális termőtestek (**24. ábra**), amelyekben tömegesen képződtek az ivartalan szaporító képletek (**25. ábra**).



24. ábra: Fekete, pontszerű acervuluszok N4 minta fertőzött hajtásain (Fotó: Petróczy, 2012)

A fent említett izolátumok estében a *Pestalotiopsis funerea* kórokozóra jellemző konídiumok képződését figyeltük meg a termőtestekben. A konídiumok hosszúkasak, orsó alakúak, néha kissé görbültek. A konídiumok 5 sejtűek, 4 szeptummal tagoltak. A középén elhelyezkedő sejtek sötétebb barna színűek, míg a 2 csúcsi sejt szinte teljesen áttetsző. A szaporítóképletek méretei kisebb eltéréseket mutattak egymáshoz képest. A leghosszabb konídiumai az N1-es izolátumnak voltak, a legrövidebb konídiumokat az N4-es izolátum esetében mértük (**5. táblázat**). A csúcsi sejtek apikális végén 4 hosszú függelék található, amelynek hosszúsága változhat (5-28µm). A bazális csúcsi sejten 1 rövidebb függelék figyelhető meg (**26. ábra**).



25. ábra: Az N2/1izolátum *Pestalotiopsis* nemzetségre jellemző konídiumai
(Fotó: Németh, 2012)

5. táblázat

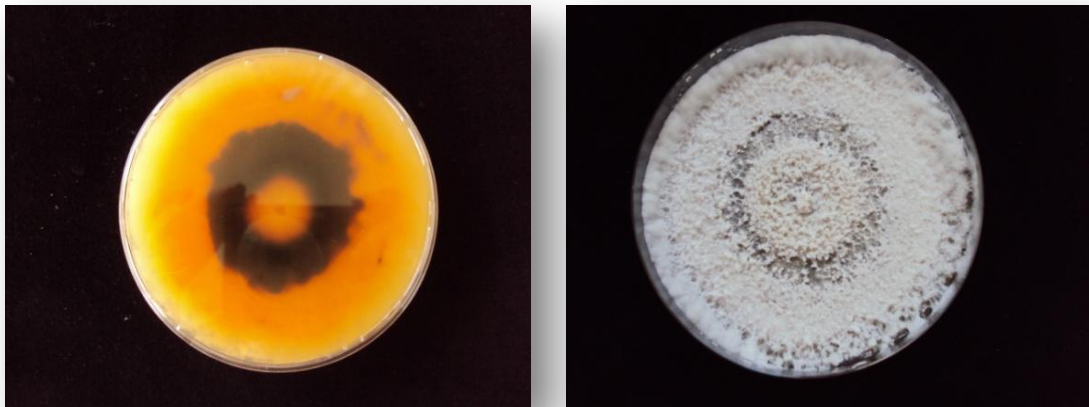
A *Pestalotiopsis funerea* konídiumainak átlagos méretei és szélsőértékei

Izolátum	Hosszúság (μm)	Átmérő (μm)
N1	(25,7) - 31,9 - (40,14)	(6,2) - 7,8 - (10,7)
N2/1	(21,5) - 24,9 - (30,8)	(6,45) - 8,6 - (9,41)
N3	(19,8) - 27,3 - (29,7)	(6,9) - 8,1 - (9,2)
N4	(19,6) - 24,2 - (31,6)	(7,2) - 8,3 - (9,4)
N6	(21,9) - 29,3 - (32,8)	(5,9) - 7,9 - (8,7)
N7	(22,2) - 26,9 - (34,8)	(5,7) - 6,9 - (7,9)
N8	(23,5) - 25,8 - (28,9)	(7,2) - 8,4 - (10,2)
N9	(19,9) - 27,6 - (39,8)	(6,8) - 8,2 - (9,7)

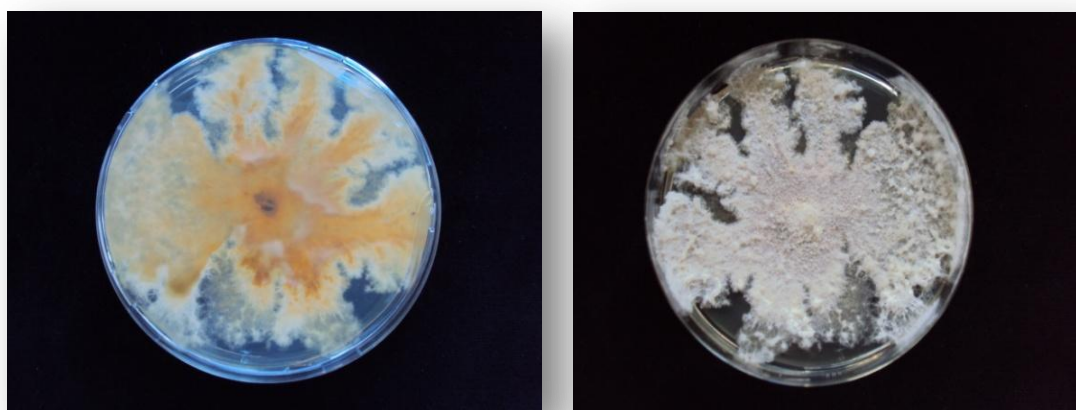


26. ábra: *Pestalotiopsis funerea* konídiumainak jellegzetes morfológiája N2/1 (balra), N3 (jobbra) izolátumok esetében (Fotó: Németh, 2011)

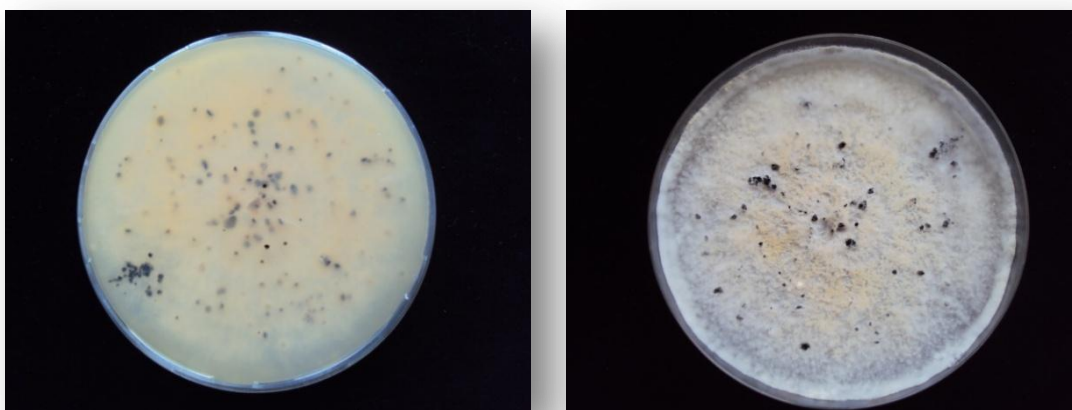
A *Pestalotiopsis funerea* tenyészetek fonáki oldala burgonya-dextróz agaron a világos krémszínűtől a narancssárgáig változott (27-29. ábra). Az N1-es izolátum esetében a fonákon határozott sötét gyűrű jelent meg a leoltási ponttól 30 mm távolságban (27. ábra). A tenyészetek szabályos kör alakúak voltak, szélük majdnem minden esetben csaknem ép volt. Kivételt képezett az N3 izolátum, ahol a tenyészet erősen szeldelt volt (28. ábra). Később kiderült, hogy a karéjosságot, egy baktériumos felülfertőzöttség okozta, ennek következtében változtak meg a tenyészbélyegek. A baktériumtól többszöri átoltás, és antibiotikus kezelést követően sem sikerült mentesítenünk a tenyészetet, ez azonban a kórokozó azonosítását egyáltalán nem befolyásolta. A tenyészetek színén minden esetben gyér légmicélium képződött. Néhány hét elteltével az idős tenyészetekben, fekete micélium tömörülések jelentek meg (29. ábra).



27. ábra: A *Pestalotiopsis funerea* N1-es tenyészetének fonáka és színe (Fotó: Németh, 2011)



28. ábra: A *Pestalotiopsis funerea* N/3-as tenyészetének fonáka és színe
(Fotó: Németh, 2011)



29. ábra: Fekete micélium tömörülések az N2/1 izolátum 3 hetes tenyésztésében
(Fotó: Németh, 2011)

Morfológiai és tenyészbélyegek alapján az N1, N2/1, N3, N4, N6, N7, N8 mintákról izolált kórokozókat egyaránt *Pestalotiopsis funerea*-ként azonosítottuk.

4.2.3. Patogenitási teszt

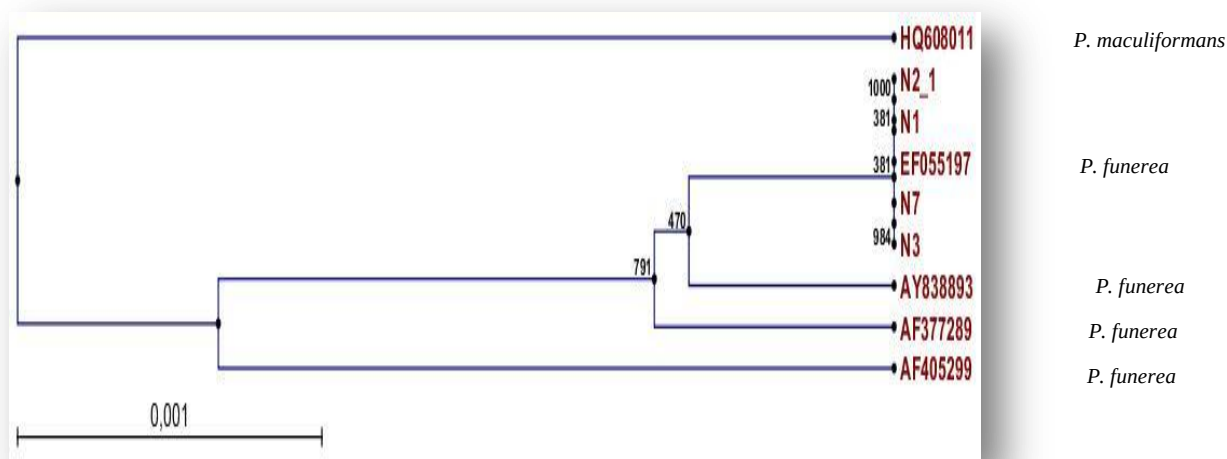
A *Pestalotiopsis funerea* legtöbb izolátuma esetében 3 hét után az inokulált hajtásokon gyenge szöveti nekrosis jelent meg a felszínen. Azonban az N2/1 és N7 izolátumok esetében csak nagyon enyhe barnulást, vagy több esetben semmiféle elváltozást nem tapasztaltunk, sem a felszínen, sem a belső szöveti állományban.

4.2.4. A *Pestalotiopsis funerea* molekuláris azonosítása és jellemzése

A molekuláris azonosításhoz és jellemzéshez az N1, N2/1, N3, N7 izolátumokat választottuk ki. Az ITS5 és ITS4 primerek a polimeráz láncreakció közben 630 bp nagyságú szakaszt emeltek ki. A nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal összevetve a szekvencia meghatározás eredményeit megállapítottuk, hogy valamennyi izolátum a *Pestalotiopsis funerea* fajjal mutatja a legnagyobb, csaknem 100%-os homológiát.

Az ITS régió filogenetikai törzsfáján a *Pestalotiopsis funerea* izolátumok külön ágon helyezkednek el, elkülönülve a Texasból származó *Pestalotiopsis maculiformans* (HQ608011) referencia izolátumtól (**30. ábra**). A magyar izolátumok egymással és az EF055197

hivatkozási számú nem közölt eredetű izolátummal vannak legközelebbi rokonságban, ahol az azonosság 100%.



20. ábra: A *Pestalotiopsis funerea* és a *Pestalotiopsis maculiformans* fajok izolátumainak filogenetika törzsfája a 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S régió szekvenciája alapján

Magyarázat: A törzsfán a vízszintes vonalak, ill. azok hossza az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák nukleotid sorrendjének eltérései alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják %-ban, 1000 mintavétel esetén. A törzsfá alatti skála mértéke 1 bázis eltérést jelöl 1000 bázisonként. Az izolátumokat hivatkozási számukkal jelöltük, mellettük feltüntettük a kórokozó nevét.

5. Eredmények megvitatása, következtetések, javaslatok

5.1. Tünetek, a kórokozók terjedése és a betegség lefolyása

A mintagyűjtés tapasztalatai és a laboratóriumi vizsgálatok után megállapítottuk, hogy a két kórokozót, vagy akár az abiotikus tényezők okozta elhalást a tünetek alapján egymástól elkülöníteni teljes biztonsággal nem lehet. A laboratóriumi vizsgálat mindenképpen szükséges a kórok feltárásához. Minden fertőzött növényen, sárgásbarnán vagy vörösesbarnán elhaló ágakat, hajtásokat figyeltünk meg. Az idős növényeken kivétel nélkül fellelhetők voltak a rákos sebek a fás részeken. A tünetek tekintetében megfigyeléseink egybevágóak az irodalmi adatokkal.

A csornai növényállományban a *Seiridium cardinale* (N2/2) okozta a súlyos elhalást, amely a törzstől és a törzs közeli ágrészekről terjedt a hajtások vége felé, ahogy azt **Sutton és Gibson (1972)** is leírja. Ezzel szemben **Goidánich (1964)** a *Pestalotiopsis funerea* tünetei a hajtások végétől haladnak fokozatosan a törzs irányába, mint ahogy azt a budapesti fiatal leylandi sövény esetében tapasztalta a kert tulajdonosa (N1). A fertőzés során megjelenő rákos sebek mindkét kórokozóra jellemzőek, ám az erőteljes mézgafolyást csak a *Seiridium cardinale* fertőzése nyomán figyeltünk meg, melyet szakirodalmi adatok is alátámasztanak (**Graniti, 1986**).

A csornai növényállományban vizsgálataink alapján a *Pestalotiopsis funerea* csak másodlagosan, a *Seiridium cardinale* következtében elhalt hajtásvégeken jelent meg. A fás részeken szaporító képletet nem találtunk, a belső szövetekből is csak az utóbbi gombát izoláltuk. Sőt az izolátum patogenitását sem sikerült egyértelműen igazolnunk. Ez egybevág **Pirone (1978)** megfigyelésével, miszerint a *Pestalotiopsis* fajok szaprofiták, vagy gyengültségi paraziták. Ennek azonban ellentmond, amikor fiatal, jó kondícióban lévő leylandi ciprus növényeken jelent meg a kórokozó (N1), és az izolált gomba patogenitását is sikerült bizonyítani. Bár a sövény telepítése és az erős metszése nyomán fellépő stressz is hozzájárulhatott a fertőzés bekövetkeztéhez. **Wright és mtsai. (1998)** is leírják, hogy a *Pestalotiopsis* fajok olyan növényeket fertőznek, amelyek korábban stressz hatásnak voltak kitéve.

5.2. A kórokozók izolátumainak morfológiai és tenyészbélyegei

A termőtest mindkét kórokozó esetében acervulusz, melyet az irodalmi adatok is alátámasztanak. Az acervuluszok méretét tekintve vizsgálataink alapján a *Pestalotiopsis funerea* esetében az irodalomban közölt 200-300 µm méret megegyezik az általunk megfigyelttel. A *Seiridium cardinale* kórokozónál **Sutton és Gibson (1972)** által említett 200-300 µm-es nagyságtól eltérően, megfigyeltünk akár 1 mm átmérőjű acervuluszokat is a rákos sebek mentén. A termőtestek mindkét esetben elszórtan helyezkednek el a növényi részekben, fekete, pontszerűek és kezdetben epidermisszel fedettek. A *Seiridium cardinale* megfigyeléseink szerint azonban csak az idősebb fás részekben képez termőtesteket, míg a *Pestalotiopsis funerea* csak a hajtásokon vagy fiatalabb fás részekben. Erre a mintagyűjtés és a vizsgálatok során érdemes odafigyelni.

A *Seiridium* és a *Pestalotiopsis* nemzetségek a konídiumok morfológiája alapján teljes biztonsággal elkülöníthetők sejtszámuk, alakjuk és a zárósejteken elhelyezkedő nyúlványok alapján. A *Pestalotiopsis funerea* esetében a legtöbb szerző 6 sejtű konídiumokat említ, amellyel egybevágunk a saját megfigyeléseink is, azonban **Brandenburger (1985)** például 5 központi sejtről és két zárósejtről beszél. Megfigyeléseink, miszerint központi sejtek mind a két kórokozó esetében sötétebbek és barnás színűek, megegyeznek az irodalmi leírásokkal.

A tenyészetek alapján a két kórokozó elkülöníthető, bár a konídiumok morfológiája sokkal megbízhatóbb határozóbélyeg. A tenyészetek fonáki és színi oldala mindkét esetben sárgás vagy narancsos színezetű. A *Seiridium cardinale* tenyészetét **Sutton és Gibson (1972)** lazacszínűként írja le. A gyér légmicélium képzés is mind a két kórokozó tenyészetére jellemző. A *Pestalotiopsis funerea* kórokozó esetében fekete pontszerű micélium tömörülések jelentek meg több izolátum esetében is az idős tenyészetekben, amelyet a szakirodalmak is említene (Modue, 1976).

5.3. A kórokozók izolátumainak molekuláris azonosítása és jellemzése

Az ITS régió alkalmasnak bizonyult a kórokozók pontos, fajszerű meghatározására, ahogy az **Viljoen és mtsai. (1993)**, illetve **Liu és mtsai. (2010)** is megállapították, hiszen az ITS régió konzervált szakasza a gombák genomjának.

5.4. A kórokozók szerepe a leylandi ciprusok hajtás- és ágelhalásában

Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy biotikus és abiotikus tényezők egyaránt fontos szerepet játszanak a tünetek kialakításában. A kórokozók közül a *Pestalotiopsis funerea*-t izoláltuk gyakrabban a fertőzött növényi részekről. **Jeewon és mtsai. (2004)** is a ciprusfélékről a leggyakrabban izolált kórokozóként említik a gombát. A szakirodalmi adatok alapján nagyobb jelentőséggel bíró és súlyosabb megbetegedéseket okozó *Seiridium cardinale*-t csak két esetben izoláltuk.

Elsőként azonosítottuk a kórokozót hazánkban molekuláris vizsgálattal alátámasztva. A csornai növényállományban látható előrehaladott tünetek és rákos sebek alapján feltételezhető, hogy a kórokozó hosszú évek óta jelen van az országban. Annak érdekében, hogy pontosabb képet kaphassunk a *Seiridium cardinale* magyarországi elterjedéséről, országos szintű mintagyűjtésre és további vizsgálatokra lesz szükség a következő években.

6. Összefoglalás

Világszerte, így hazánkban is egyre nagyobb teret hódítanak a dísnövények között az örökzöldek. Közterületeken és magánkertekben egyaránt közkedvelt és kényelmes megoldás a tuják vagy a ciprusfélék ültetése, hiszen a téli nyugalmi időszakban is élvezhetjük a lomb díszítőértékét. Ültetésük során azonban számolnunk kell biotikus és abiotikus tényezőkkel, melyek veszélyeztetik a telepített állományokat. Magyarországon az elmúlt egyre gyakrabban találkozhatunk elhaló hajtásokkal, illetve ágakkal, melyek súlyosan rontják az említett növények díszítőértékét. Vizsgálataink során célul tűztük ki annak megállapítását, hogy mely kórokozók felelősek az örökzöld növények (elsősorban a leylandi ciprus) ágelhalásáért és pusztulásáért. Célul tűztük ki a kórokozók izolálását táptalajon, továbbá azok azonosítását és jellemzését morfológiai és molekuláris módszerrel. Munkánk során 10 mintát gyűjtöttünk az ország különböző részeiről, magánkertekből és közterületről. A kórokozók tiszta tenyészeit PDA táptalajon állítottuk elő.

Két esetben izoláltunk *Seiridium cardinale* és a 7 esetben *Pestalotiopsis funerea* kórokozót a tüneteket mutató növényi részekről. Két minta esetében kórokozót nem sikerült azonosítani a fertőzött növényi részekről, így valószínűleg abiotikus tényezők állhattak az elhalás hátterében.

Seiridium cardinale esetében az elhalás a fás részek felől indult és gyorsan terjedt a hajtások vége felé. Az érintett részeken rákos sebeket és erős mézgaképződést figyeltünk meg. A kórokozó konídiumai orsó alakúak, hat sejtből állnak. A szaporítóképletek acervuluszban képződnek, melyek a fás részekben elszórtan helyezkednek el. A termőtestek kezdetben epidermisszel fedettek, majd a bőrszövet felszakadása után válnak láthatóvá.

Pestalotiopsis funerea kórokozó esetében az elhalás a hajtás végétől indul és halad fokozatosan a fás részek felé. A termőtestek pontszerűek, melyek elszórtan helyezkednek el a fertőzött hajtásokon. Az acervuluszban képződő konídiumok ötsejtűek, és a bazális és apikális záró sejteken jellegzetes nyúlványok figyelhetők meg.

Elsőként bizonyítottuk a *Seiridium cardinale* magyarországi megjelenését molekuláris módszerrel is alátámasztva. Hogy teljesebb képet kaphassunk a kórokozó hazai elterjedéséről, az elkövetkezendő években további vizsgálatokat tartunk szükségesnek.

7. Köszönetnyilvánítás

A diplomamunka elkészítésében nyújtott segítségéért szeretnék köszönetet mondani Dr. Palkovics László Tanszékvezető Úrnak, aki szaktudásával és támogatásával hozzájárult ahhoz, hogy a dolgozatom elkészülhessen.

Külön köszönettel és hálával tartozom konzulensemnek, Dr. Petróczy Mariettának, aki időt és energiát nem kímélve, szakmailag és emberileg támogatott a munkám során, és aki nagyban hozzájárult szakmai fejlődésemhez.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Növénykórtani Tanszék minden munkatársának, akik mindig a segítségemre voltak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak, hogy mindenben mellettem álltak és támogattak, illetve Alessandro Ceccarellinek és Tóth Andreának az olasz és angol nyelvű szakirodalom fordításában nyújtott segítségéért.

8. Irodalomjegyzék

1. **Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., Sussman, A. S.** 1973. The Fungi - An Advanced Treatise. Academic Press. New York. p. 556.
2. **Anonymous** 2012. *Seiridium cardinale* (cypress canker) probably originates from California (US). EPPO Reporting Service 9. p. 8-9.(<http://archives.eppo.org/EPPO/Reporting/2012/Rse-1209.pdf>)
3. **Bajo, J., Santamaria, O., Diez, J.** 2008. Cultural characteristics and pathogenicity of *Pestalotiopsis funerea* on *Cupressus arizonica*. In: Forest Pathology 38. p. 263–274.
4. **Bánhegyi J., Tóth S., Ubrizsy G., Vörös J.** 1985. Magyarország mikroszkópikus gombáinak határozókönyve 2. kötet, Akadémiai Kiadó. p. 982-983.old
5. **Barnes, I., Roux, J., Wingfield, M. J., Coetzee, M. P. A., Wingfield, B. D.** 2001. Characterization of *Seiridium* spp. associated with cypress canker based on β -tubulin and histone sequences. In: Plant Disease 85. p. 317-321.
6. **Barr, M. E.** 1975. *Pestalospheeria*, a new genus in the *Amphisphaeriaceae*. Mycologia 67. p. 187–194.
7. **Barthelet, J. and Vinot, M.** 1944. Notes sur les maladies des cultures méridionales. Annales des *Epiphyties* 10. p. 18-20.
8. **Beresford, R. M. and Mulholland, R. I.** 1982. Susceptibility of farm shelter cypresses to three fungi associated with cypress canker disease. In: New Zealand Journal of Forestry Science 12(1). p. 7-13.
9. **Boesewinkel, H. J.** 1983. New records of the three fungi causing cypress canker in New Zealand, *Seiridium cupressi* (Guba) comb.nov. and *S. cardinale* on *Cupressocyparis* and *S. unicorn* on *Cryptomeria* and *Cupressus*. In: Transactions of the British Mycological Society 80(3). p. 544-457.
10. **Brandenburger, W.** 1985. Parazitische Pilze an Gefäßpflanzen in Europa. Gustav Fischer Verlag Stuttgart. p. 31-28.
11. **Chou, C. K. S.** 1989. Morphological and cultural variation of *Seiridium* spp. from cankered *Cupressaceae* hosts in New Zealand. In: European Journal of Forest Pathology 19(7). p. 435-445.
12. **Danti, R., Della Rocca, G., El Wahidi, F.** 2009. *Seiridium cardinale* newly reported on *Cupressus sempervirens* in Morocco. In: New Disease Reports 19. p. 18.

13. **Della Rocca, G., Eyre, C. A., Danti, R., Garbelotto, M.** 2011. Sequence and simple-sequence repeat analyses of the fungal pathogen *Seiridium cardinale* indicate California is the most likely source of the cypress canker epidemic for the Mediterranean region. In: *Phytopathology* 101(12). p. 1408-1417.
14. **Dennis, R. W. G.** 1995. *Fungi of the South East England*. Royal Botanic Gardens. Kew
15. **Ellis, M. B., Ellis, J. P.** 1997. *Microfungi on Land plants*. The Richmond Publishing Co. Ltd. England. p. 115.
16. **Espinoza, J. G., Briceno, E. X., Keith, L. M., Latorre, B. A.** 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. In: *Plant Disease* 92. p. 1407–1414.
17. **Farr, D. F. and Rossman, A. Y.** 2012. *Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*. ARS, USDA. From: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
18. **Gartner, H.** 1971. Versuche zur Bekämpfung von *Botrytis cinerea* (Grauschimmel) als Traubenfaule. *Mitteilungen Klosterneuburg* 21(3). p. 183-188.
19. **Goidánich, G.,** 1964. *Manuale di patologia vegetale*, Volume II., Edizioni Agricole. Bologna. p. 1045-1048.
20. **Gonthier, P. and Nicolotti G.,** 2002. First Report of *Pestalotiopsis funerea* on *Cupressocyparis leylandii* in Italy. In: *Disease Notes* 86(12). p. 1402.
21. **Graniti, A.** 1986. *Seiridium cardinale* and other cypress cankers. In: *Bulletin OEPP/EPPO* 16. p. 479-486.
22. **Graniti, A.** 1993. *Seiridium* blight of cypress - another ecological disaster?. In: *Plant Disease* 77(6). p. 544.
23. **Hansen, H.** 1956. The perfect stage of *Coryneum cardinale*. In: *Phytopathology* 46. p. 636-637.
24. **Hood, I. A., Gardner, J. F., Hood, R. J., Smith, B. M., Phillips, G. D.** 2009. Pruning and cypress canker in New Zealand. In: *Australasian Plant Pathology* 38. p. 472-477.
25. **Hopkins, K. E., McQuilken, M. P.** 2000. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. In: *European Journal of Plant Pathology* 106. p. 77–85.

26. **Hu, H. L., Jeewon, R., Zhou, D. Q., Zhou, T. X., Hyde, K. D.** 2007. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. In: Fungal Diversity 24. p. 1–22.
27. **Index Fungorum.** from: www.indexfungorum.org
28. **Jeewon, R., Liew, E. C. Y., Hyde, K. D.** 2004. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. In: Fungal Diversity 17. p. 39-55.
29. **Li, J. Y., Strobel, G. A., Sidhu, R. S., Hess, W. M., Ford, E. J.** 1996. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress. *Taxodium distichum*. Microbiology 142. p. 2223–2226.
30. **Liu, A. R., Chen, S. C., Wu, S. Y., Xu, T., Guo, L. D., Jeewon, R., Wei, J. G.** 2010. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. Molecular Phylogenesis and Evolution 57. p. 528–535.
31. **Madar, Z., Solel, Z., Kimchi, M.** 1991. *Pestalotiopsis* canker of cypress in Israel. In: Phytoparasitica 19(1). p. 79-81.
32. **Maniatis, T., Sambrook, I. and Fritsch, E. F.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor.
33. **Mordue, J. E. M.** 1976. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria p. 514.
34. **Morgan-Jones, G., Nag Raj, T. R., Kendrick, B.,** 1972. Icones Genera Coelomycetarium 1-2. Department of Biology University of Waterloo. Waterloo.
35. **Mycobank** www.mycobank.org
36. **O'Donnell, K.** (1993): *Fusarium* and its near relatives. In “The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics” (D. R. Reynolds and J. W. Taylor, Eds.), CAB International, Wallingford. p. 225–233.
37. **Orlóci, L.** 2011. Pusztuló ciprusfélék. In: Kertészet és Szőlészet 22. p. 26.
38. **Panconesi, A. and Raddi, P.** 1991. Cancro del cipresso. Aspetti biologici ed epidemiologici. Il cipresso. CNR, Regione Toscana, Italy p. 49-60.
39. **Pedron, L., Piva, G., La Porta, N.** 2007. The genetic structure of cypress canker fungus in Italy using RAPD and minisatellite markers. In: Acta Sylvatica & Lignaria Hungarica p. 159-168.

40. **Pirone, P. P.** 1978. Diseases and pests of ornamental plants. Wiley Interscience. New York.
41. **Steyaert, R. L.** 1949. Contributions à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). Bulletin du Jardin Botanique de l'État Bruxelles, 19. p. 285-354
42. **Sutton, B. C.** 1980. The *Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey. England. p. 276.
43. **Sutton, B. C. and Gibson, I. A. S.** 1972. *Seiridium cardinale*. CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 326(1-2).
44. **Tsopelas, P., Angelopoulos, A., Nikolaou, K.** 2007. *Seiridium cardinale* is a new threat to cypress trees in Cyprus. In: New Disease Reports 16. p. 38.
45. **Veser, J.** 2002. A ciprusfélék ágelhalása. In: Kertészet és Szőlészet 3, p. 8.
46. **Veser, J.** 2003. A ciprusfélék gombás hajtásszáradása. In: Kertészet és Szőlészet 52, p. 14.
47. **Viljoen, C. D., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J.** 1993. Comparison of *Seiridium* isolates associated with cypress canker using sequence data. In: Experimental Mycology 17. p. 323-328.
48. **Wagner, W. W.** 1928. *Coryneum* canker of cypress. In: Science 67. p. 584.
49. **Wagner, W. W.** 1939. The canker of *Cupressus* induced by *Coryneum cardinale* n. sp. In: Journal of Agricultural Research 58(1). p. 1-46.
50. **White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., PCR Protocols – A Guide to Methods and Applications. San Diego, USA: Academic Press. p. 315-22.
51. **Wright, E. R., Rivera, M.C., Flynn, M. J.** 1998. First report of *Pestalotiopsis guepinii* and *Glomerella cingulata* on blueberry in Buenos Aires (Argentina). In: Boletín 28. p. 219–220.