

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYKÓRTANI TANSZÉK

Országos Tudományos Diákköri Dolgozat

A dió új baktériumos betegségének megjelenése hazánkban
és a diófajták fogékonyságának vizsgálata

Borsos Gergely

Konzulensek:

Dr. Végh Anita egyetemi tanársegéd

Dr. Palkovics László tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Bujdosó Géza tudományos munkatárs



Budapest, 2014.04.29

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	2
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A diótermesztés helyzete nemzetközi viszonylatban	4
2.2. A diótermesztés helyzete hazai viszonylatban	8
2.2.1. A diótermesztés jelenlegi helyzete Magyarországon	8
2.2.2. Diótermesztő körzetek.....	9
2.2.3. Hazai diófajták	10
2.2.4. A dió termesztésének hazai sajátosságai	11
2.2.5. A dió kereskedelme	13
2.2.6. A dió felhasználásának lehetőségei, beltartalmi értékei.....	13
2.3. A dió növényvédelme	14
3. Anyag és módszer	21
3.1. A vizsgálat helye, ideje	21
3.2. A vizsgálat anyaga	21
3.2.1. Izolátumok	21
3.2.2. Baktériumok fenntartása, tenyésztése.....	22
3.2.3. A klasszikus bakteriológiai vizsgálatokhoz használt növények	22
3.2.5. Plazmid és baktériumtörzs a klónozáshoz	25
3.2.6. Táptalajok	25
3.2.7. A vizsgálat során alkalmazott Kitek.....	25
3.2.8. Enzimek	25
3.2.9. Primerek.....	26
3.2.10. Eszközök.....	26
3.3. A vizsgálat módszere	26
3.3.1. A betegség tüneteinek megállapítása.....	26
3.3.2. A kórokozó izolálása, tenyésztése	26
3.3.3. A baktérium szuszpenzió előállítása.....	27
3.3.4. Kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel	27
3.3.5. Kórokozó azonosítása molekuláris módszerekkel	29
3.3.6. Diófajták fogékonysági vizsgálata.....	33
4. Eredmények	34
4.1. A kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel.....	34
4.1.1. A <i>Brenneria nigrifluens</i> okozta tünetek	34
4.1.2. A kórokozó tenyésztete.....	34
4.1.3. Gram-féle tulajdonság	35
4.1.4. Hiperszenzitív tulajdonság	35
4.1.5. Patogenitási teszt, gyors azonosítási módszer	35
4.1.6. A kórokozó biokémiai jellemzői	36
4.2. A kórokozó molekuláris vizsgálata	36
4.3. A diófajták fogékonyságának vizsgálata	39
5. Következtetések levonása, összefoglalás.....	42
6. Köszönetnyilvánítás	45
Irodalomjegyzék	46

1. Bevezetés és célkitűzés

Világszerte fejlődés figyelhető meg a *Juglans regia* L., közönséges dió termesztésében, bár a legtöbb esetben a termésátlag és a termésmennyiség az, ami növekedést mutat, a termőterület egyes helyeken nő (USA, Kína, Franciaország), egyes helyeken csökken (Románia, Oroszország) vagy stagnáló tendenciát mutat (Magyarország, Ukrajna). Korábban a növényvédelmi szakemberek alacsony igényű növények közé sorolták a diót, ami házikerti viszonylatban meg is állja a helyét. Üzemi körülmények között a legkisebb kártevő, illetve kórokozó is hatalmas gondot okozhat, ha nem megfelelő a növényvédelem.

A dió termőterületének és az állománysűrűségének növekedése, az import áru ellenőrzésének nehézségei, a nemzetközi kereskedelem határnélkülisége, az időjárási körülmények szélsőségesége, a növényvédelmi problémák növekedését vonja maga után, ami miatt a dió az igényes kultúrák közé lépett elő az utóbbi években. Egyre több, hazánkban a dióról még nem azonosított gomba- és baktériumfajt írnak le. Az utóbbi években 9 új gombafajt írtak le hazai gyümölcsösökben, melyek nem feltétlenül okoznak egyértelmű szimptómákat, hanem gyengültségi kórokozóként vannak jelen, így a fák jó kondícióban tartása elsődleges fontosságú (Horváth, 2013). Hazánk dióültetvényeiben több baktériumfaj okoz gondot. Az *Agrobacterium tumefaciens*, amely fertőzése a helyes faiskolai termesztéssel elkerülhető, valamint a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, amely az egyik legnehezebben kezelhető betegséget okozza és csapadékos években komoly termés kiesést okoz.

Külföldi ültetvényekben már jelen van több baktériumfaj is, amit eddig hazánkban még nem írtak le, mint például a *Brenneria rubrifaciens*, a dió kérgének mélyrákja vagy a *Brenneria nigrifluens*, a dió sekély kéregrákja. 2012-ben több helyen is megfigyelték hazánkban, hogy a diófák törzsén fekete folyás jelentkezik. Külföldi szakirodalmi leírások alapján a kórkép egyik okozója lehet a hazánkban még ismeretlen *Brenneria nigrifluens* baktériumfaj. A kórokozót 1955-ben figyelték meg először Sacramento Valley területén az Egyesült Államokban, de akkor még *Erwinia nigrifluens* néven írta le Wilson és társai 1957-ben. Később Hauben és társai 1998-ban molekuláris módszerekkel bizonyították, hogy a kórokozó a *Brenneria* nemzetségbe tartozik. Mind a faipari, mind a héjas dió kereskedelemnek köszönhetően világszerte elterjedt betegség. Jelenlétét igazolták többek

között Franciaországból (Menard és társai, 2004), Olaszországból (Saccardi és társai, 1998), Iránból (Jamalzade és társai, 2009) és 2011-ben Szerbiából is (Popovic és társai, 2013).

Célunk, hogy felmérjük a beteg a fákat és azonosítsuk a kórokozót klasszikus és molekuláris módszerekkel. A kórokozó azonosítása után szeretnénk megvizsgálni a hazai nemesítésű diófajták fogékonyságát a kórokozóra (hazai és egy törzsbaktériummal mesterségesen fertőzve). Továbbá célunk még a *Brenneria nigrifluens* baktériumfajt elkülöníteni más gazdaságilag jelentős baktériumfajoktól gyorseszt alkalmazásával is. Ezekkel a vizsgálatokkal szeretnék elősegíteni a kutatók, termesztők munkáját a növényvédelem területén.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A diótermesztés helyzete nemzetközi viszonylatban

A világon körülbelül 965 ezer hektáron közel 3,5 millió tonna diót termelnek, a legnagyobb termesztoők Kína, USA, Irán és Törökország. A termésátlagok eltérőek, mivel a fejlett országokban, ahol az öntözés kérdése megoldott, optimális termőhelyi viszonyok vannak, kidolgozott a termesztéstechnológia és teljesen természetes a 4 tonna feletti héjas dió termésátlag. Azokban az országokban, ahol a fentebb említett feltételek nem adóttak, nehéz elérni a 2-2,5 tonnás termésátlagot is. A dió termése jól tárolható hónapokig is, így jelentős a nemzetközi árumozgás. A nemzetközi exportban vezető szerepet tölt be az Egyesült Államok, Mexikó, Kína és Ukrajna. Főbb héjas dió importőrök Kína, Európai Unió, Kanada, vezető beldió importőr az Európai Unió. A nemzetközi fajtahasználat nem egységes, terjednek az új hibridfajták, amelyek oldalrügyön is teremnek, de betegség ellenállóságuk nem kielégítő, így továbbra is a termesztésben nagyobb arányban még a hagyományos fajták a jellemzőek (FAO, 2013; Horváth, 2013).

Kalifornia államban már az 1800-as évek óta működnek értékesítő és a kereskedelmet segítő szövetkezetek, ebből kifolyólag a mai napig ott folytatják a legkorszerűbb, legintenzívebb, leghatékonyabb diótermesztést (**1. ábra**), aminek a következménye a több mint 4 t/ha termésátlag (Ramos, 1998). A termés mennyisége (480 ezer tonna) és a termőterület is folyamatosan növekedik (100 ezer ha), a megtermelt mennyiség 80%-a értékesítő szövetkezeten keresztül jut el a piacra. A nemzetközi árumozgás is jelentős, több mint 120 ezer tonna héjas diót, valamint közel 75 ezer tonna beldiót exportálnak, importra szinte nincs szükség (2 ezer t beldió), mivel az ott megtermelt mennyiség az Egyesült Államok diófogyasztását teljes mértékben fedezi (FAO, 2013). Fő fajta a 'Chandler', amely az összes ültetvény 30%-át alkotja, nagyarányban oldalrügyön terem, igen mutatós és egyöntetű a gyümölcse, sárgásfehér bélállománya tetszetős és finom, bár rosszul tárolható. Emellett 'Hartley', 'Tulare', 'Franquette', 'Howard', 'Serr', 'Tehama', 'Cisco' és 'Amigo' fajtaikat termesztik főként (Aleta és társai, 2004; Szentiványi és Kállayné, 2006). A növényvédelem szakszerű, integrált, már 1973-ban foglalkoztak a levéltetvek elleni biológiai növényvédelemmel (Frazer és Van den Bosch, 1973; McGranahan és Leslie, 1991).



1. ábra: Dióültetvény Kaliforniában

(<http://dioskonyv.bionuss.eu/08-54/1.htm>)

Kína, a világ diótermesztésében ugrásszerű termőterület (70 ezer ha-ról 400 ezer ha-ra) és termésmennyiség (216 ezer tonnáról 1,6 millió tonnára) növekedést mutatott az utóbbi két évtizedben, ahol a termést a nemzetközi piacon főként beldióként értékesítik (FAO, 2013). Főbb termeszítő körzetek Yunnan, Shichuan, Shaanxi, Shanxi és Hebei, ahol az ország összes termésének 80%-t állítják elő. Fajhasználatra a *Juglans regia* és *Juglans sigillata* fajok a jellemzőek, egyéb fajok csak vadon fordulnak elő. Fajtahasználatra jellemző, hogy korábban csak magoncokat ültettek és azok közül szelektáltak főleg az íz alapján, de az utóbbi évek nemesítői munkájának köszönhetően számos fajta került bejegyzésre, melyeket előszeretettel telepítik. Ilyen például a 'Liaoning' sorozat, 'Lipin', 'Jinlong', 'Lübo', 'Baokexiang', 'Beijing 861', valamint a 'Fenghui' (Wang és társai, 2007). Ígéretes fajtajelölt a '8515' kódú hibrid is (**2. ábra**). A termesztéstechnológia fejlett, maximum 8 méteres sortávolság mellett a tőtávolság 3 méterre is redukálódhat a talajviszonyoktól függően (**3. ábra**), valamint szinte minden ültetvényben ki van építve az öntözőrendszer, amellyel az év bármely időszakában megoldott a felszíni öntözés, így elérhetővé válik a 4 tonnás termés hektáronként (Yonghong és Baojun, 2005). A terület jobb kihasználása érdekében bevett szokás a nagy térállásra telepített dióültetvények sorközeinek első 3-4 évben történő hasznosítása gabonafélékkel, szántóföldi kultúrákkal, amelyek csekély mértékben használják fel a talajban található tápanyagokat (**4. ábra**)(Wang és társai, 2007). Korábban csak saját termelésű diót fogyasztottak, értékesítettek a nemzetközi piacra, csak exportáltak, ám az utóbbi években héjas dió importált mennyisége növekedik, amit törés után beldióként exportálnak főleg Európába és Japánba (Radóczné, 2012; Rongting és Mengjun, 2003).



2. ábra: '8515' ígéretes dió fajtajelölt
(<http://www.csmp.cn/product/showproduct21.html>)



3. ábra: Dióültetvény Kínában
(<http://lijiang.cncn.com/fuwu/40664305836>)



4. ábra: Fiatal dióültetvény sorközének hasznosítása gabonával Kínában
(<http://www.dioskonyv.byethost3.com/08-59/1.htm>)

Irán foglalja el a 3. helyet a diótermesztésben mind termőterület (110 ezer ha), mind termésmennyiség szempontjából (270 ezer t). A termesztés színvonala alacsonyabb, de az ültetvények teljes területe nagy, a termésátlagok 1,5 - 2,5 t/ha között alakulnak (FAO, 2013; Jamalzade és társai, 2012).

Európa diótermesztése fejlődő, közel 158 ezer hektáron több mint 380 ezer tonnát termelnek. Franciaországnak kiemelkedő szerepe van évtizedek óta, de mellette jelentős termeszto országok: Lengyelország, Ukrajna és Szerbia. Csökkenő jelentősége van Olaszországnak, Görögországnak, Spanyolországnak, mivel a termesztés lassan, de folyamatosan északabbra tolódik. Európában jelentős mennyiséget megtermelnek, de ez nem elégíti ki a szükségleteket, így a legnagyobb importőrök is, közel 50 ezer tonna béldiót és ugyanennyi héjas diót szállítanak főleg azokba az országokba, ahol nincs megfelelő környezeti adottság megtermelni azt (Benelux államok, Németország, Egyesült Királyság, Skandináv országok) (FAO, 2013).

Franciaországban a termesztéstechnológia és az értékesítés hatékonysága hasonlóan fejlett (**5. ábra**), mint Kalifornia államban, valamint a termés felhasználása is széleskörűen elterjedt (38 ezer t, 20 ezer ha) (FAO, 2013). Két jelentős termelési körzet alakult ki: dél-

nyugaton, valamint dél-keleten. Az innen származó dió „Noix de Grenoble” és „Noix de Perigord” (6. ábra) földrajzi márkánévvel kerül forgalomba (Germain és társai, 1999). A francia export korábban is jelentős volt, de az utóbbi években megnövekedett a reexport aránya, ami azt jelenti, hogy alacsony bérszínvonalú országokba (Románia, Moldávia, Ukrajna) exportálnak héjas diót, majd azt beldióként importálják vissza Franciaországba. Ezzel jelentősen csökkenteni tudják a feldolgozás költségét, valamint növelni adott országban a foglalkoztatottak számát (Radócné, 2012). Fő fajták a 'Franquette', amely kiváló minőségű termést hoz, ha megfelelő pollenadó fajta van telepítve mellé, a 'Corne', amely kiváló gyümölcsminőségű, baktériumos betegségnek ellenálló, de lassan fordul termőre, a 'Lara', amelynek gyümölcse 34-36 mm átmérőjű és már az 5. évben termőre fordul, valamint a 'Femor', amely termesztési biztonsága és áruértéke jobb a korábbi fajtáknál (Germain és társai, 1995; Linard, 2013; Meynier, 1985). Felhasználása sokrétű, mindenki megtalálhatja a számára legmegfelelőbbet, legyen az olajként, kandírozva, csomagolva, héjasdióként, süteményként, szépségápolási terméként (6. ábra) (Internet 1.).



5. ábra: Fiatal, már termő dióültetvény Franciaországban
(<http://dioskonyv.bionuss.eu/11-21/1.htm#többi>)



6. ábra: Dió védjegy Franciaországban és a termés felhasználása olajként és kandírozva
(<http://www.dordognemaison.com/?p=16&lang=eng>, <http://dioskonyv.bionuss.eu/11-21/1.htm#többi>)

Korábban Olaszország diótermesztése is az elsők között volt az európai piacon, és bár a termesztő terület csökkenő tendenciát mutat, de a termésmennyiség stagnál, mert a korszerű,

öntözhető ültetvények termésátlaga meghaladja a 4 tonnát hektáronként, de importra így is szüksége van az országnak. Hasonlóak a diótermesztés mutatói Görögországban és Spanyolországban is (Gara, 2011; Szentiványi és Kállayné, 2006).

Növekedést mutat az utóbbi évtizedben Lengyelország termeszto terulete (2500 hektárról 26 ezer hektárra), valamint Ukrajna termésmennyisége (55 ezer tonnáról 112 ezer tonnára) (FAO, 2013). Ukrajna termeszto terulete mindössze 14 ezer hektár és ez az elmúlt években stagnál, a termésmennyiség pedig folyamatosan nő, vélhetően megnőtt a szabad gyűjtésből és a házi kerti termesztésből származó mennyiség (Andrienko és társai, 1989).

Ausztriában és Németországban kisgazdaságok végzik a termesztést, a termelés szétaprózódott, az értékesítés a hazai piacon lezajlik, a fennmaradó igényt importból elégítik ki (Metzner, 1985; Szentiványi és Kállayné, 2006).

2.2. A diótermesztés helyzete hazai viszonylatban

2.2.1. A diótermesztés jelenlegi helyzete Magyarországon

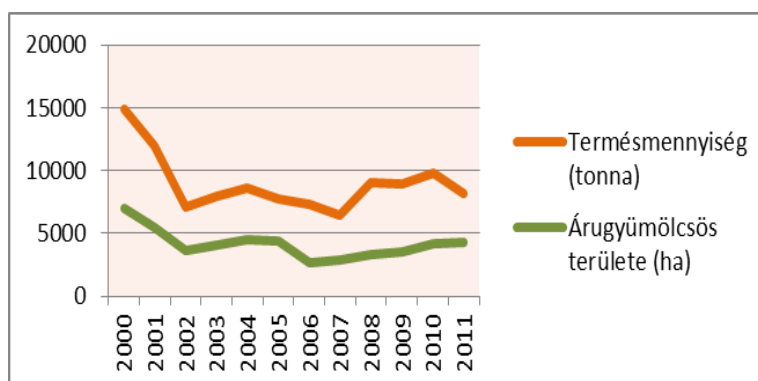
Magyarország diótermesztése a 2000-es évek eleje óta folyamatosan fejlődik, lassan, de növekvő tendenciát mutat mind a termőterület, mind a termésmennyiség szempontjából. A méretes héjas dió értékesítése jól irányítható, sikerterméknek számít, a legnagyobb exportőr szerint 1000-1500 tonnával növelhető lenne a kivitel (Radócné, 2012).

Bujdosó (2013a) szerint élénk az érdeklődés a dió iránt mind a kertészek, mind a kereskedők és a vásárlók szemszögéből is, mert „a magyar dió a legjobb minőségű a világon!”. Kiváló minőséget lehet előállítani és az utóbbi években kedvező áron lehet értékesíteni.

A termőterület a 2001-es évben KSH adatok szerint 3250 hektár volt, ez a terület a 2011-es évben megközelítette az 5400 hektárt, ami részben az Európai Unió támogatásának köszönhető, de nagyobb részben a sikeres hazai termékpályának, sikeres szaktanácsadási rendszernek, kiváló minőségű termést érlelő hazai fajtáknak tudható be (Radócné, 2012; Szentiványi és Kállayné, 2006). A FAO (2013) adatai szerint a termőterület nagysága az utóbbi 10-12 évben minimálisan változott, stagnál. **(7. ábra)**

A termésmennyiség nagy szórást mutat az évjáratok függvényében, valamint rengeteg a még fiatal, nem termőre fordult ültetvény. Befolyásoló tényezők a tavaszi fagy, az éves csapadékmennyiség, főleg a nyári hónapokban és a jégverés (Bujdosó, 2013a). E körülményeknek köszönhető, a kedvezőtlen években a 6000 tonnás (2007) termésmennyiség, kedvező évben pedig 10000 tonna (2010) termésmennyiség is lehetséges. Átlagosan

elmondható, hogy Magyarország diótermésének mennyisége 7-8 ezer tonna körül alakul (7. **ábra**) (FAO, 2013; Radóczné, 2012).



7. ábra: Magyarország diótermesztésének helyzete 2000 és 2011 között (FAO, 2013)

2.2.2. Diótermesztő körzetek

Az egész országban találhatunk diófákat, szórvány gyümölcsösöket, de két igazi diótermesztő körzet alakult ki: Somogy megye északi részén, valamint Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében (Tóth, 2004). E két vidéken helyezkedik el a gyümölcsösök közel 20%-a. Nagyobb ültetvények találhatóak még Győr-Moson-Sopron, Bács-Kiskun és Fejér megyékben (Internet 3.). Magyarországon a dióültetvények 6%-a 1 hektárnál kisebb, 50%-a 10 hektárnál nagyobb, 30%-a 20 hektárnál nagyobb. A 20 hektárnál nagyobb ültetvények tulajdonosai az összes diótermesztő 3%-a (40 gazdaság). Az átlagos ültetvénytérlet 3,6 ha, ez jóval elmarad a világ vezető termesztoihez képest (Radóczné, 2012).

A legnagyobb ültetvény Lengyeltótiiban található a Juglans Hungária Kft. tulajdonában. Az ültetvény koreloszlása viszonylag egységes, 34%-a 40 éves, 26%-a 23 éves, 15%-a 19 éves, 19%-a pedig 9 éves. Ügyelnek a megfelelő fajtatársításra, fiatalításra és értékesítésre is, egyes táblarészekén elérték a 3 tonnás termésátlagot hektáronként (Horváth, 2010). A hazai fő fajták mellett kisebb területen próbálkoznak a fő külföldi fajtákkal is. Ilyen fajták a 'Pedro', 'Lara', 'Franquette'. Az új fajták mellett ügyelnek a termesztéstechnológiai fejlesztésekre is, így vannak olyan táblarészek, melyek a franciaországi, kaliforniai ültetvények képét idézik (8. **ábra**) (Horváth, 2010).



8. ábra: Dióültetvény Lengyeltótiban

(<http://lengyeltotikepekben.mindenkilapja.hu/html/24994772/render/legifotok-lengyeltotitrol>,
<http://juglans.internettudakozo.hu/index.php?oldal=kepek>)

2.2.3. Hazai diófajták

A Nemzeti fajtalistán jelenleg 8 fajta szerepel: 'Alsószentiváni 117' (továbbiakban 'A117'), 'Alsószentiváni kései' (korábbi nevén Alsószentiváni 117-31), 'Bonifác' (korábbi nevén Alsószentiváni 117-15), 'Milotai 10' (továbbiakban 'M10'), 'Milotai intenzív' (korábbi nevén Milotai 10-37), 'Milotai kései' (korábbi nevén Milotai 10-14), 'Milotai bőtermő' (korábbi nevén Milotai 10-9), 'Tiszacsécsi 83' (továbbiakban 'T83') (Nemzeti Fajtajegyzék, 2012). Ezen fajtákat dr. Szentiványi Péter szelektálta az 1950-es évektől kezdődően, a manapság termesztésben nagyobb arányban lévő fajták ('M10', 'A117', 'T83') tájszelekciók eredményei (Szentiványi és Kállayné, 2006). A dió ökológiai adaptációs képessége alacsony, ezért a világ minden részén a helyben szelektált fajták sokkal jobb termést produkálnak, így Magyarországon is a tájszelekció vezetett jó eredményhez (Radóczné, 2012). Újabban nemesített fajták ('Alsószentiváni kései', 'Bonifác', 'Milotai intenzív', 'Milotai kései', 'Milotai bőtermő') már keresztezéses nemesítéssel keletkeztek. Az 1970-es években kezdte el a keresztezést az amerikai 'Pedro' fajta bevonásával, ami azért volt értékes számára, mert nagy arányban hoz termést oldalrügyeken is. E keresztezésnek meg lett az eredménye, összesen 5 fajtát ismert el az állam új fajtaként 2005-ig (Bujdosó, 2003, 2013b; Szentiványi és Kállayné, 2006).

Az új hibridek termésátlaga magasabb, áruminőségük is kiváló, de a betegségekre fogékonyabbak, igényesebbek a termesztésben, valamint faiskolai kihozataluk 15%-al alacsonyabb (Bujdosó, 2013b). A nemesítői munka még ma is folyik az Állami Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató Fejlesztő Közhasznú Nonprofit Kft. érdi telephelyén, valamint Alsószentivánon, a nemesítő gazdaságában (Szentiványi és Kállayné, 2006). Emellett

honosított fajták is telepítésre kerültek az utóbbi évtizedekben, mint például a 'Pedro', 'Lara' és a 'Fernor'. Legnagyobb arányban a 'M 10' és az 'A 117' fajtákat termesztik kiváló áruértékük és termésbiztonságuk miatt, valamint a 'T 83' aránya is számottevő, ami azonban dióbélként értékesíthető jobban, mert a termés héja kevésbé mutatós, egyenetlen. Kisebb, de növekvő arányban vannak jelen az új hibridek, melyek nagyobb termésátlagot produkálnak, szűkebb tőtávolságra ültethetők, mivel gyengébb növekedésűek, de öntözést és precíz növényvédelmet igényelnek. Az 'Alsószentiváni kései', valamint a 'Milotai kései' fajták később virágzanak, így a tavaszi fagykár esélye minimális, az utóbbi évek tapasztalata alapján – részben öntözött körülmények között – a 'Bonifác' fajtával együtt nagyon jó eredmény várható az elkövetkező években (Bujdosó, 2013b). Részletes fajtaleírás később a **3.2.4. fejezetben**.

2.2.4. A dió termesztésének hazai sajátosságai

A diót hazánkban jelenleg döntő többségében hagyományos módszerrel termesztik még, 9-12 méteres sor és tőtávolsággal, de a korszerű ültetvényekben már törekednek arra, hogy minél kisebb térállással, öntözéssel, metszéssel növeljék a termesztés intenzitását (Tóth, 2004). Az új hibridek alkalmasak intenzív művelésre, 6-7 méteres sor- és 3-4 m-es tőtávolság, valamint 6 m-nél nem nagyobb magasság kialakítására és fenntartására, ugyanis ezek a fajták igénylik a metszést, a síkfal metszéssel pedig nem távolítjuk el a termő rügyeket, mint a hagyományos fajtáknál (Bujdosó, 2013a). Kisebb tenyészterületen pedig könnyebb, hatékonyabb a növényvédelem és az öntözés is (Szentiványi és Kállayné, 2006).

Az intenzív termesztésben elengedhetetlen a fák metszése télen. Első osztályú termést csak megfelelő metszéssel lehet elérni, így a növényvédelem hatékonyabb, a megvilágítottság jobb. Nem termő években ajánlott a zöldmetszés elvégzése a nyár folyamán, legkésőbb augusztus közepéig, cél a sudaras ágcsoportos koronaforma. A termő ültetvényekben a tél végi, fás metszést kell alkalmazni 3-4 évente, amikor is főleg a sérült, sűrítő, fertőzött, művelést akadályozó, túlvastagodott ágakat kell eltávolítani ügyelve arra, hogy a generatív-vegetatív arány ne boruljon fel (Bujdosó, 2012). A fejlettebb országokban gépi síkfalmetszést is alkalmaznak, ennek a módszernek nagy előnye a gyorsaság, a kiváló megvilágítottság és a hatékonyabb növényvédelem. Ezt a módszert csak nagy arányban oldalrügyön termő fajtáknál lehet alkalmazni (Gara, 2011).

Jelenleg is zajlik termesztési kísérlet az országban több termesztővel együttműködve, beleértve Érd-Elvirát is, ahol cél az új fajták integrált termesztésének kidolgozása,

tenyészterület, művelésmód, növényvédelem optimalizálása, értékesítés elősegítése (Andor, 2011; Bujdosó, 2013b; Kállayné és társai, 2012). Bujdosó (2002) szerint érdemes az ültetvényt vegyesen felépíteni, több fajta bevonásával, csak a túlporzásra kell odafigyelni, ugyanis ilyenkor kevesebb termés kötődik, mint porzó nélkül.

A növényvédelmet nagy teljesítményű, axiálventillátoros, géppel végzik, így lehetséges a teljes lombkorona fedése permetszerrel (**9. ábra**), bár a hagyományos, 10 méternél is magasabb fák esetében ez a módszer sem mindig elég a megfelelő védelemhez (Glits és Pénzes, 2004). Nagyon fontos az egészséges szaporítóanyag használata, rügypattanás előtti réz tartalmú lemosópermetezés. Virágzástól a szüretig a xanthomonászos és gnomóniás betegség ellen kell védekezni előrejelzésre alapozottan, a kártevők ellen csak szükséges esetben kell, az akkor felhasználható szerek száma korlátozott, de minden jelentős károsító ellen van felhasználható készítmény (Makó és Voigt, 2006; Ocskó, 2013).



9. ábra: Axiálventillátoros permetszőgép
(http://kapanyel.blog.hu/2011/09/17/toti_diofesztival_ott_voltunk)



10. ábra: Traktorral szerelhető
rázógép működés közben
(http://kapanyel.blog.hu/2011/09/17/toti_diofesztival_ott_voltunk)

A betakarítás rázógéppel, egy vagy két menetben történik, így a szüret jóval rövidebb ideig tart, a termés értéke sem romlik a földön eltöltött idő miatt, mint korábban (**10. ábra**) (Andor, 2011). „A legkedvezőbb betakarítási idő akkor van, amikor a zöld burok a termések 70%-án természetes úton felrepedt” (Tóth, 2004). Ekkor a termés bélállománya tetszetős, fehér, a tömege pedig fajtára jellemző. A gépi betakarításnak vannak azonban olyan feltételei, amelyek, ha nem teljesülnek a betakarítás többmenetes lesz. Ilyen például az egyenletes talajfelszín, legalább 2,5 t/ha héjas dió, kellő méretű traktor és munkagép. A rázás ponyvára, vagy a földre történik. A földre hullott terméseket rendre söprik, majd speciális felszedő géppel tartályba gyűjtik (Andor, 2006).

2.2.5. A dió kereskedelme

Az érett diót két formában értékesítik Magyarországon, héjas- és bélióként. A 'M10' és 'A117' fajtákat főleg héjas dióként, a 'T83' fajtát pedig bélióként találhatjuk meg az áruházakban, piacokon. Exportra csak nagyméretű (+34 mm), mosott, egyenletes felszínű és színű termést lehet küldeni, a kisebb terméseket bélióként forgalmazzák, így adva munkát a gazdaság dolgozóinak a téli holtidőben. Az export mennyisége folyamatos növekedést mutat, 2010-ban elérte a 3500 tonnát héjas súlyban kifejezve, ennek egy része bélióként került értékesítésre főleg Franciaországban (35%), Olaszországban (15%) és Ausztriában (7%), Németországba és Romániába főleg héjas diót exportálunk. A héjas dió exportjában fontos a koraiság, mivel november elején érik a dió Kaliforniában, addig magasak az árak, utána már inkább bélióként kell értékesíteni. Emellett ha megnézzük a 2010-es árakat (héjas dió 2,8 €, dióbél 5€) és az átlagos, 40%-os bélióhozatali arányt, hazánkban nem éri meg november előtt bélióként exportálni. Importból származó diómennyiség változó, héjas dióból folyamatosan csökkenő, dióbélből pedig növekvő a tendencia. 2010 és 2011-ben nagyjából azonos mennyiség, 2900 tonna áru került be héjas dió súlyban megadva. Fő beszállító hazánkban korábban Franciaország (héjas dió) és Románia (dióbél) volt, de azóta Ukrajna növekvő részesedést vesz ki mind a héjas dió, mind a dióbél importálásában (Radócné, 2012). Diókereskedők szerint a jövőben az export mennyiségét növelni lehetne 1000-1500 tonnával, ami figyelembe véve az új telepítéseket és a kívánt, 2-3 t/ha-os termésátlagot, igenis lehetséges, csak öntözhetővé kell tenni az ültetvényeket. Bár a rossz termőhelyi adottságokkal rendelkező területre történt telepítés esetén ez nem segít, és sajnos egyes gazdák nem a növény igényeit, hanem a jövedelmezőséget tették az első helyre, aminek az lehet az eredménye, hogy a termés minősége nem fog megfelelni a külföldi vásárlók igényeinek (Vajna, 2013).

2.2.6. A dió felhasználásának lehetőségei, beltartalmi értékei

A magyar termesztő azért büszke diójára, mert beltartalmi adottságai sokkal jobbak, mint a vezető diótermesztő országokban, amelyet Radócné (2012) és Horváth (2013) is alátámaszt. Főként kényelmi cikként fogyasztják nyersen, omega-3 zsírsav tartalma, tokoferol tartalma miatt és magas energia tartalma miatt kiváló csemege. Hivatalos adat nem áll rendelkezésre, de a szakértők becslése alapján, éves szinten körülbelül 0,25-0,30 kg/fő a fogyasztás. Az omega-3 zsírsav esszenciális, az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen, telítetlen zsírsavtartalma miatt vérrögződés gátló, magas energiatartalma miatt a téli

hónapokban legyengült szervezetet tölti fel, vitamintartalma és polifenol tartalma miatt immunrendszer erősítő (Radóczné, 2012).

Fajták közti különbségről számolt be Horváth (2013), miszerint a hazai nemesítésű fajták avasodási ideje hosszabb, mint a külföldi fajtáké, telítetlen zsírsav tartalma az 'A117' fajtának, tokoferol tartalma a 'Bonifác' fajtának volt a legmagasabb, míg az olajtartalom tekintetében nem volt különbség sem a szárított, sem a friss mintákban.

Felhasználási lehetőségei sokrétűek, például a zöld dió felhasználása kompótként, likőrként, fájának felhasználása asztalosiparban, héjának felhasználása fűtőanyagként, levelének gyógyászati alapanyagként való hasznosítása. Olaja gyógyászati termék, külsőleg bemasszírozva magas E vitamin tartalmának köszönhetően gombaölő és bőrpuhító hatású (Internet 1.). „A diólevelet a kozmetikai iparban összehúzó szerként, csillapító, lemosó anyagként, bőrradírok előállításánál koptató szerként, bőrkondicionáló és elfedő anyagként használják. Érzékeny, aknés, szeboreás, zsír-és vízhiányos bőr ápolására kifejlesztett nyugtató, regeneráló bőrpoló készítmények hatékony összetevője.” (Internet 4.) Használják samponok, szappanok krémek adalékanyagaként, saláták ízesítésére is, cukrászati alapanyag. (11. ábra).



11. ábra: A dió sokoldalú felhasználhatósága: dióolajként, arckrémként vagy muffinként
(http://www.vitaminstation.hu/hu/csokkenti_a_sziv_es_errendszert_kockaztat_a_dio
<http://www.ilcsi.com/gyogynoveny/dio/>
<http://lakoma.gportal.hu/gindex.php?pg=23312725&nid=4880428>)

2.3. A dió növényvédelme

Korábban a dió házikerti termesztése miatt alacsony növényvédelmi igényű növényfaj volt, így csak ritkán részesítették kezelésben. A gondosabb gazdák lefestették télre a törzsét fehérre, ami csak részben növényvédelmi jelentőségű, a lehullott lombot elégették, amivel egyes kórokozók áttelelő képleteit pusztították el (Hluchy és társai, 2007; Simon és társai 2012). A nagyobb ültetvények kialakulása után került terítékre a növényvédelem kérdése. Az üzemi ültetvényekben árutermelés folyik és mind a hazai, mind a külföldi vásárlók igénylik a

kiváló minőséget és elegendő mennyiséget, amit csak egészséges fákról lehet szedni (Glits és Pénzes, 2004).

Számos tényező befolyásolja a dió növényvédelmét, főként az abiotikus tényezők (hőmérséklet, csapadék), de emellett növénypatogén kórokozók, kártevők is. A fák kondíciójának leromlását, pusztulást okozhatja vírus (*Cherry leaf roll virus*), számos gombafaj is (*Gnomonia leptostyla*, *Diaporthe eres*, *Microstroma juglandis*, *Citospora* spp., *Nectria galligena*, *N. cinnabarina*, *Fomes fometarius*, *Polyporus squamosus*, *Laetiporus sulphureus*, *Rosellinia necatrix*, *Armillaria mellea*) (Radócz, 2002; Szentiványi és Kállayné, 2006; Véghelyi, 1976). Hazánkban is megjelent az intenzív fajtákon a BAN betegség (Brown Apical Necrosis), a barna csúcsi elhalás, mely okát pontosan még nem lehet tudni, de a tudomány mai állása szerint *Fusarium*, *Alternaria* és *Phomopsis* gombafajok felelősek a termés csúcsán kialakuló barna elhalásért (Gara, 2011). Új gombafajok, melyek azonosítottak diótermésen, levélen, ágon, de nem primer kórokozók, csak polifág gyengültségi paraziták: *Botryosphaeria dothidea*, *Melanconium juglandinum*, *Phomopsis* sp., *Fusarium solani*, *Colletotrichum acutatum* (Horváth 2013).

A vírusok és a növénypatogén gombákra a dolgozatomban nem térek ki részletesen, az irodalmi áttekintés című fejezetben. Csak a baktériumokat részletezem, amelyek a dolgozat témájához szorosan kapcsolódnak vagy az okozott tünetekben hasonlítanak az általunk megfigyeltetekhez.

A dió xantomonászos betegsége (kórokozó: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*)

A diótermesztés legveszélyesebb károsítója, a csapadékos években járványszerűen fellépő betegség. A világ minden diótermesztő országában előfordul, Magyarországon 1940-es években okozott először jelentős kárt, azóta minden évben komoly gondot okoz. Hazánkban Hevesi Mária végzett kísérletet 2012-es évben, együttműködve az Állami Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató Fejlesztő Közhasznú Nonprofit Kft.-vel és a termesztoőkkel, azzal a céllal, hogy felmérje a hazai gyümölcsösök fertőzöttségét. A begyűjtött minták 70%-ból kimutatható volt a baktériumfaj (Kállayné és társai, 2012).

Pálcika alakú, xantán színanyagot termelő baktérium (Glits és Folk, 2000).

Meleg, csapadékos időjárás kedvező számára, a hőoptimuma szűk (15-20 °C), de a fertőzés tág hőmérsékleti intervallumban bekövetkezhet (levél 4-30 °C, termés 5-27 °C). A faj csak a *Juglans* nemzetségbe tartozó fajokat fertőzi (Mulrean és Schroth, 1982).

Fertőzési forrás a fertőzött növényi maradványok mind a fán (ágrészek, repedések, gyümölcsmúmiák), mind a talajon (lehullott gyümölcs, levél, ág). Optimális időjárásakor a széllel, pollennel, esőcseppekkel, öntözéssel továbbterjed a baktérium és fertőzi elsősorban a zsenge zöld részeket (levél, fiatal gyümölcs, hajtás), a fásodás után, nyáron már csak öntözés mellett fertőzhet, de ez esetben is alacsony a fertőzés veszélye (Mikulic-Petkovsek és társai, 2011).

Védekezés ősszel kezdődik, amikor a fertőzött maradványokat eltávolítják, megsemmisítik, lehullott lombot átpermetezik. Tavasszal rügypattanás előtt érdemes lemosó permetezést alkalmazni réz (rézszulfát, rézoxiklorid, rézhidroxid) hatóanyagú szerrel. Rügypattanást követően pedig folytatni kell a védekezést főleg réz hatóanyagú szerekkel, erős fertőzési nyomású években 7-10 naponként érdemes permetezni (Radócz, 2002). Kalifornia államban beszámoltak már a baktériumfaj rézzel szembeni rezisztenciájáról is, de hazánkban még nem alakultak ki rezisztens törzsek (Kállayné és társai, 2012; Scortichini, 2001).

Tünetekkel szinte minden fiatal, zsenge növényi részen találkozhatunk, a levélen apró, szögletes, feketésbarna foltok jelennek meg, majd később összeolvadnak, nekrotizálódnak, gyakran kitöredeznek. Levélnyélén és hajtáson hosszanti feketésbarna csíkok, fekete foltok mutatkoznak, ezek később felszakadnak, rákos sebek keletkeznek. A hím virágok megbarnulnak, feketednek, később torzulnak, lehullanak. Az epikarpiumon kezdetben kicsi, barna, vizenyős foltok jelennek meg, később ezek növekednek, megfeketednek, rothadnak, párás idő esetén fényes baktériumnyálka jelenik meg, ez a rothadás a bélállományra is áttér, a dióbél elfeketedik, összetöpped (**12. ábra**) (Radócz, 2002; Rozsnyay, 2006). A nemesítők szerint a fajták között eltérés figyelhető meg a fogékonyság szempontjából. Erd-Elvirán több éves kísérlettel bizonyították, hogy a legellenállóbb fajta az 'A117'-es, fogékony pedig a 'Milotai intenzív' és a 'Milotai kései' (Szentiványi és Kállayné, 2006).



12. ábra: A *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* által okozott tünetek a dió hajtásán, a zöld dión, a levélen és a termés belsejében
(<http://www.dioskonyv.byethost3.com/09-02/1.htm>)

A dió pszeudomonászos betegsége (kórokozó: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)

Főként csonthéjas gyümölcsfajokon okoz gazdasági kárt, de dión is előfordul minden évben, komoly gazdasági kárt nem okozva (Szentiványi és Kállayné, 2006). Minden diótermesztő országban jelen van.

Pálcika alakú, Gram-negatív baktérium, foszforeszkáló színanyagot és INA proteint termel (Glits és Folk, 2000).

Hűvös, nedves, kora tavaszi idő kedvez a kórokozónak, hőmérsékleti optimuma 12-25 °C. Polifág baktériumfaj, számos sok gazdanövénye van, de főleg csonthéjas gyümölcsfajokon károsít (Hiruno és Upper, 1990)

A baktérium a levelek felületén, talajon, vesszőkön él anélkül, hogy fertőzést okozna. November elejétől kezdődően egészen március végéig sebzéseken keresztül jut be a növénybe, ott feléli a növény tartalék szénhidrát forrásait, mellyel kiszolgáltatja a gazdanövényt a téli hidegnek, fagyoknak (Klaus, 1995). A számára optimális környezeti feltételek meglétekor kerülni kell a sebzések létrejöttét, ha munkaszervezési okból nem megoldható, akkor a keletkezett sebeket faseb kezelő készítményekkel és rézzel kell kezelni (Glits és társai, 1997).

Hűvös, csapadékos tavaszokon, nyár elején a levelek csúcsának barna elhalását okozhatja. A fás részekbe jutva csökkenti a növény fagy elleni védekezőképességét (Glits és társai, 1997).

Irodalmi adat nem áll rendelkezésre a diófajták fogékonyságát illetően, vélhetően a csekély gazdasági jelentőségének köszönhetően.

A dió agrobaktériumos gyökérgolyvája (Kórokozó: *Agrobacterium tumefaciens*)

Karantén kórokozó, a faiskolai termesztésben a fertőzött területet kizárják a termesztés alól, az ott termelt áru eladása tilos (Hrotkó, 1999). Az egész világon elterjedt, hazánkban is gyakori, a legtöbb országban karantén kórokozó.

A baktérium pálcika alakú, tumor indukáló (Ti) plazmiddal rendelkezik a génállománya. A baktérium akár 2 évig is életképes marad a talajban (Ott, 2007).

Talajlakó baktérium, kedvező számára a nedves, pangó vizes talaj, fagypont felett akár 37 °C-ig is fertőzőképes, de hőoptimuma 25-30 °C között van. Polifág baktériumfaj, az egyszikű növényeket kivéve az összes növényfajon előfordulhat (Glits és társai, 1997).

A faiskolai termesztésben keletkezett sebeken (gyökérmetszés, oltás) keresztül fertőzi a csemetéket, majd a kórokozó bejuttatja örökítő anyagának egy részét a növény génállományába, ezzel auxin termelésre serkentve, aminek a következménye a tumorok a gyökéren, gyökérnyakon, oltási helyeken (Escobar és társai, 2002).

Védekezési lehetőség csakis a faiskolai vetésforgó, mivel a baktériumnak az egyszikű növények nem gazdanövényei. Másik megoldás lehetne az *Agrobacterium radiobacter* biológiai növényvédelemben használható baktériumfaj K84 vagy K1024 törzse, mely kolóniát képezve és antibiotikumot termelve megakadályozza a fitopatogén faj terjedését, de a biopreparátum hazánkban nincs engedélyezve. Minden esetben a megelőzés az, ami eredményre vezethet (Hrotkó, 1999).

A tünetei jellegzetesek, rákos sebek, tumorok keletkeznek, amelyben a golyvák először fehérek, később megsötétednek, majd elfásodnak és együtt élnek a növényvel, ritkán okozzák a gazdanövény pusztulását (**13. ábra**). Kártétele a tápanyag- és vízszállítás akadályozásában nyilvánul meg, aminek a következménye a legyengült kondíció, amit már könnyen fertőznek a gyengültségi paraziták, gombák (Véghelyi, 1999; Radócz, 2002).



13. ábra: Az *Agrobacterium tumefaciens* által okozott gyökérgolyva a diófa törzsén és az oltványon

(<http://www.dioskonyv.byethost3.com/09-02/1.htm>)

A következőkben ismertetek kettő, hazánkban még nem leírt baktériumfajt, melyek a külföldi ültetvényekben már jelen vannak és súlyos károkat okoznak:

A dió kérgének sekélyrákja (kórokozó: *Brenneria nigrifluens*)

A világ diótermesztő országaiban jelen van. Mind a faipari, mind a héjas dió kereskedelemnek köszönhetően világszerte elterjedt betegség.

A kórokozót 1955-ben figyelték meg először Sacramento Valley területén az Egyesült Államokban, de akkor még *Erwinia nigrifluens* néven írták le Wilson és társai 1957-ben,

majd Hauben és társai 1998-ban molekuláris módszerekkel bizonyították, hogy a kórokozó az *Enterobacteriaceae* családba, *Brenneria* nemzetségbe tartozik.

Gram-negatív, pálcika alakú baktérium, mely fehér színű kolóniát képez King-B táptalajon (Hauben és társai, 1998; Végh és társai, 2013a).

A kórokozónak kedvez a közepesen meleg, párás, csapadékos időjárás. A szakirodalmi adatok szerint csak a *Juglans* nemzetségbe tartozó fajokat károsítja (Végh és társai, 2013a).

Fertőzési forrás a beteg növényi rész, ahonnan csapadékkal, széllel továbbterjed a kórokozó és a keletkezett sebzéseken (metszés, rázó gép, farontó kártevők, téli mikro repedések) keresztül a növénybe hatol és fertőz.

A védekezés ellene még nem kidolgozott, a prevenció nagyon fontos (sebzések kerülése és kezelése, téli mikro repedések elkerülése törzs fehérre festésével, beteg tövek eltávolítása, farontó kártevők elleni védelem).

A kórokozó tünetei könnyen észrevehetőek, megjelennek a fiatal fákon és az idősebb fákon is, főleg a törzsön, vastagabb ágakon. Jellegzetesen a sebzéseken, kártevők által létrejött lyukakon, vagy egyszerűen a törzsön keletkező természetes mikro repedéseken fertőz a kórokozó, melyet barnás-feketés folyás jelez (**14. ábra**). A kórokozó nyáron aktív, ekkor a sebzések nagyobbodhatnak is, növelve a fertőzött részt. Később ezen a folyadékon megtelepednek másodlagos kórokozók is, ezért csak alapos vizsgálat után lehet megállapítani, hogy valójában melyik faj okozta a betegséget (Menard és társai, 2004; Wilson és társai, 1957).

Wilson és társai (1957) szerint a fajták jelentős része fogékony, amit Menard és társai (2004) valamint Saccardi és társai (1998) is megerősítettek.



14. ábra: A kórokozó tünete idősebb fa törzsén
(Fotó: Borsos Gergely, 2013)

A dió kérgének mélyrákja (kórokozó: *Brenneria rubrifaciens*)

Hasonló jelentőségű, mint a korábban említett sekély kéregrák. Hazánkban még nem jelent meg, külföldi ültetvényekben már évek óta jelen van (Ménard és társai, 2004).

Pálcika alakú, rubrifacin nevű rózsaszínes színanyagot termelő baktériumfaj (McClean és társai, 2008).

A kórokozónak kedvez a közepesen meleg, párás, csapadékos időjárás. A szakirodalmi adatok szerint csak a *Juglans* nemzetségbe tartozó fajokat károsítja (Végh és társai, 2013a). E baktériumfaj is a kéregrepedéseken, mikro repedéseken, sebzéseken keresztül fertőzi főleg a fiatalabb fákat (González és társai, 2004).

Védekezés azonos a dió kérgének sekélyrákjánál leírtakkal. A tünetek is hasonlóak a sekély kéregrákhoz, azonban e kórokozó fertőzése egészen a kambiumig hatol, a fertőzött fák produktivitása lassan leromlik, a fa pusztul. A sebzéseken sötét színű folyás jelenik meg, ami rózsaszínes, pirosas színanyagot tartalmaz, bár ez nem mindig jelenik meg (**15. ábra**) (Wilson és társai, 1967). Szakirodalmi adat a fajtafogékonysággal kapcsolatban nem áll rendelkezésre.



15. ábra: A dió kérgének mélyrákja
(<http://dioskonyv.bionuss.eu/09-02/1.htm>)

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgálat helye, ideje

2012 nyarán kéregpedést és barnás váladékfolyást figyeltünk meg Zánkán, házi kertben, idős diófa törzsén, melyről mintákat vettünk. A fertőzött kéregdarabot és a váladékot a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékére szállítottuk. A mesterséges fertőzési, fajtafogékonysági kísérletekhez a zöld diót az Állami Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató Fejlesztő Közhasznú Nonprofit Kft. budatétényi és érdi telephelyén szedtük meg. Az őszi folyamán, a faiskolából, kitermeléskor az oltványok fertőzésére is sor kerül. A kórokozó klasszikus és molekuláris azonosítását, valamint a zöld dió és az oltványok fogékonyságának vizsgálatát a Növénykórtani Tanszék laboratóriumában végezzük és végeztük el. A kórokozó riboszómális DNS-ének 16S szakaszát tartalmazó rekombináns plazmid nukleinsav szekvenciáját Szegeden a BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetben határoztattuk meg.

3.2. A vizsgálat anyaga

3.2.1. Izolátumok

Hazai izolátum (Bn-WalnutZa-Hun1):

A kórokozót Zánkán, házi kertből, diófa (*Juglans regia*) törzséről izoláltuk, tiszta tenyészetbe hoztuk és fenntartottuk. A tünetek alapján feltételeztük, hogy a *Brenneria nigrifluens* baktériumfaj okozta a betegséget.

Törzsbaktérium:

Brenneria nigrifluens (Hauben és társai) DSM30175 (*Erwinia nigrifluens*, Wilson és társai, 1957) törzsét is használtuk a mesterséges fertőzési kísérletekhez.

Zöld dió gyors azonosítási vizsgálatához használt hazai baktériumfajok:

Baktériumfaj	Izolálás ideje	Izolálás helye	Gazdanövény	Izolálta
<i>Brenneria goodwinii</i>	2013	Budapest	(<i>Ulmus</i> sp.) szil	Végh Anita
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	2013	Balaton környéke	(<i>Juglans regia</i>) dió	Zámbó Ágnes
<i>Erwinia amylovora</i>	2013	Budapest	(<i>Aucuba japonica</i>) babérsom	Végh Anita

3.2.2. Baktériumok fenntartása, tenyésztése

Tenyésztés: King-B és EMB táptalajon (King és társai, 1954), 26 °C-on történt.

King-B táptalajt a kórokozók izolálásához, tenyésztéséhez és fenntartásához, tenyészbélyegek meghatározásához használtuk. Összetétele: 20 g pepton, 10 µl glycerol, 1,5 g K₂HPO₄, 1,5 g MgSO₄ X 7 H₂O, 15 g agar 1 l végtérfogatban; pH: 7,2.

EMB (Eosine-Methylene Blue) táptalajt a tenyészbélyegek meghatározáshoz használtuk, melyet összevetettünk külföldi irodalmakban leírtakkal. Összetétele: 10 g zselatin, 5 g laktóz, 5 g szacharóz, 2 g K₂HPO₄, 0,4 g eosin Y, 65 mg metilénkék, 13,5 g agar 1 l desztillált vízben oldva; pH: 7,2

Megőrzés: A hazai izolátum és a törzsbaktérium fenntartása glycerolos tartósítás útján történt -18 °C-on Eppendorf csőben és/vagy -70 °C-on fagyasztó csőben. A közeg összetétele: 3 g Beaf extract, 5 g pepton, 20 g glycerol, 1 liter desztillált víz.

3.2.3. A klasszikus bakteriológiai vizsgálatokhoz használt növények

A kórokozó patogenitásának teszteléséhez, a Koch-posztulátumok vizsgálatához diófa hajtását; a hiperszenzitív reakció vizsgálatához egészséges dohánynövényt (*Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi*) használtunk.

3.2.4. Diófajták

A fertőzési/fogékonysági kísérletben a hazánkban nemesített, állami elismerésben részesült fajtákat, valamint egy új, ígéretes fajtajelöltet és a hazánkban nem termesztett, de fűszerként vagy alanyként használatos fekete diót, a *Juglans nigra* fajt vizsgáltuk. A fajtaleírásokat Szentiványi és Kállayné (2006), valamint Bujdosó (2013b) alapján végeztem.

'Alsószentiváni 117' (A117) – Hazánk egyik fő fajtája, kései fakadású, szeptember 2. dekádjában érlik, korán termőre fordul. Gyümölcse középnagy (11-14 g, 33-36 mm), enyhén barázdált, magbele jóízű, beltartalmi adottságai kiválóak. Fája erős növekedésű, termőhelyi tényezőkkel szemben kevésbé igényes, az ország valamennyi táján termesztethető (**16. ábra**).



16. ábra: 'Alsószentiváni 117' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

'Alsószentiváni kései' (A117-31) – 'A117' és a 'Pedro' fajta keresztezésével állították elő, kései fakadású, október 1. dekádjában érik, korán termőre fordul és a nőivarú virágok 30%-át oldalrügyeken fejleszti. Gyümölcse középnagy (11-14 g, 32-35 mm), hosszúkas, finoman barázdált, magbele világos színű, mely a fő áruértékét adja. Fája erős növekedésű, ritka, feltörekvő koronát nevel (**17. ábra**).



17. ábra: 'Alsószentiváni kései' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

'Bonifác' (A117-15) - 'A117' és a 'Pedro' fajta keresztezésével állították elő, nagyon kései fakadású, október 2. dekádjában érik, korán termőre fordul és a nőivarú virágok 50%-át oldalrügyeken fejleszti. Gyümölcse középnagy (12-14 g, 32-34 mm), hosszúkas, barázdált, magbele világos színű és kiváló ízű, mely a fő áruértékét adja. Fája erős növekedésű, sűrű koronát nevel, az 'Alsószentiváni kései' fajtával jól termékenyítik egymást, fogékony a dió xantomonászos betegségére (**18. ábra**).



18. ábra: 'Bonifác' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

'Milotai 10' (M10) – Hazánk fő fajtája, középidejű fakadású, szeptember 3. dekádjában érik, korán termőre fordul, gyümölcseinek 20%-át hozza oldalrügyön. Gyümölcse középnagy (13-17 g, 33-35 mm), szabályos gömb alakú, sima felületű. Magbele kiváló ízű, világos színű, etalon árunak számít. Fája közép-erős növekedésű, termőhelyre igényes, fagytól védett helyre ültetendő (**19. ábra**).



19. ábra: 'Milotai 10' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

'Milotai intenzív' (M10-37) – 'M10' és a 'Pedro' keresztezésével állították elő, középkesei fakadású, 'Milotai kései' fajtával jól termékenyítik egymást, október 2. dekádjában érik, korán termőre fordul, nőivarú virágainak 60%-át oldalrügyein hozza. Gyümölcse középnagy (11-12 g, 32-34 mm), tetszetős, magbelének minősége felülmúlja szüleiét. Fája közepes-gyenge növekedésű, sűrű koronát nevel, érzékeny a dió xantomonászos betegségére (**20. ábra**).



20. ábra: 'Milotai intenzív' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

'Milotai kései' (M10-14) - 'M10' és a 'Pedro' keresztezésével állították elő, igen kései fakadású, 'Milotai bőtermő' fajtával jól termékenyítik egymást, október 2. dekádjában érik, korán termőre fordul és bőven terem, nőivarú virágainak 55-60%-át oldalrügyein hozza. Gyümölcse középnagy (12-15 g, 32-34 mm), tetszetős héjú, magbele tetszetős. Fája középerős növekedési erélyű, szétterülő koronát nevel. A dió gnomóniás betegségére kevésbé, a xanthomonaszos betegségekre közepesen fogékony (**21. ábra**).



21. ábra: 'Milotai kései' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

'Milotai bőtermő' (M10-9) - 'M10' és a 'Pedro' keresztezésével állították elő, középkései fakadású, október 1-2. dekádjában érik, igen korán termőre fordul és bőven terem, nőivarú virágainak 50-60%-át oldalrügyein hozza. Gyümölcse középnagy (12-15 g, 33-37 mm), vállas gömb alakú, tetszetős, világos héjú. Fája középerős-erős növekedési erélyű, ritka, hengeres koronát nevel. A dió gnomóniás betegségére érzékeny, a xanthomonaszos betegségekre közepesen fogékony (**22. ábra**).



22. ábra: 'Milotai bőtermő' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

'Tiszacsécsi 83' (T83) – Hazánkban a 3. legnagyobb arányban termesztett fajta, október 1-2. dekádjában érik, igen korán termőre fordul és bőven terem, nőivarú virágainak 25-35%-át oldalrügyein hozza. Gyümölcse középnagy (11-12 g, 32-34 mm), barázdált, kevésbé tetszetős, magbele sárgásbarna, jó ízű, fő áruértéke ebben rejlik. Fája erős növekedési erélyű, ritka, hengeres koronát nevel (**23. ábra**).



23. ábra: 'Tiszacsécsi 83' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

'BD6' – Új, ígéretes fajtajelölt, dr. Bujdosó Géza nemesítette, hosszúkás, nagyméretű gyümölcsöt terem, jelenleg is vizsgálják, terméshozási, termőképességi, kórokozókkal szembeni fogékonysági tulajdonságait Érd-Elvirán (**24. ábra**).



24. ábra: 'BD6' diófajta
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

Juglans nigra – Diótermelő országokban elterjedt alany, főként az Amerikai Egyesült Államok középső és keleti részén használják. Erős növekedési erélyű, késői fakadású, faggyal szemben ellenálló, fő hazai fajtákkal nehezen fér össze, ezért a rá oltott fák gyenge növekedésűek vagy inkompatibilitási tüneteket mutatnak.

3.2.5. Plazmid és baktériumtörzs a klónozáshoz

A tisztított PCR-termékeket a Promega 3015 bázispár hosszúságú pGEM-T Easy plazmidjába ligáltuk. A PCR-termékek klónozásához az *Escherichia coli* baktérium DH 5- α törzsét használtuk.

3.2.6. Táptalajok

A transzformálás során steril 2TY (4 g tripton, 2,5 g élesztőkivonat, 1,25 g NaCl, 250 ml végtérfogatban) és steril ampicillines LB táptalajt (2,5 g tripton, 1,25 g élesztőkivonat, 2,5 g NaCl 250 ml végtérfogatban + 500 μ l ampicillin), a Minipreparátum készítéséhez steril ampicillines LB szilárd és folyékony táptalajt használtunk (Maniatis és társai, 1989).

3.2.7. A vizsgálat során alkalmazott Kitek

A kórokozó biokémiai tulajdonságainak meghatározása során a Biomérieux (France) által gyártott API20E gyorstesztet használtuk. A PCR-termék tisztítását High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche) végeztük. A szekvencia meghatározáshoz Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-tel (Bio-Rad) tisztítottuk a rekombináns plazmidot.

3.2.8. Enzimek

A PCR-hez: Taq DNS polimeráz enzim (rekombináns) (5u/ μ l); puffere: 10x-es Taq puffer + KCl – MgCl₂, pH: 8,8 25 °C-on. A ligáláshoz: T4 DNS ligáz enzim (5u/ μ l); puffere: 10x-es T4 DNS ligáz puffer pH: 7,8 25 °C-on. A plazmidot tartalmazó baktérium kolóniák kék-fehér szín szelekciójához IPTG-t és Xgal-t használtunk. Az inzertet a plazmidból *EcoRI* (10u/ μ l) restrikciós endonukleázzal vágtuk ki az inzert beépülésének ellenőrzéséhez. Az enzim puffere: 10x-es *EcoRI* puffer pH: 7,5 37 °C-on. A T4 DNS ligáz enzimet a Promega cégtől, míg a többi enzimet a Fermentas cégtől vásároltuk.

3.2.9. Primerek

A molekuláris vizsgálatok során baktériumokra specifikus primereket (Osborn és társai, 2000) használtunk a PCR reakciókban, amelyek a 16S rRNS-t kódoló gén bázissorrendjét határozzák meg. A módszert ma már széleskörűen használják baktériumok identifikálására és taxonómiai vizsgálatok kivitelezésére (Choi és társai, 1996; Clarridge, 2004), amely alkalmas faj szintű identifikációra (Van de Peer és társai, 1996).

1389r (reverse) primer 5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAG-3'

63f (forward) primer 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'

3.2.10. Eszközök

Petri-csésze, lombik, steril fogpiszkáló, steril injekciós tű, steril műanyag doboz, táptalajfőzéshez szükséges eszközök, Leica MZ6 sztereomikroszkóp, Applied Biosystem GeneAmp 9700 típusú PCR-készülék, Sony DSC-W130 típusú fényképezőgép.

3.3. A vizsgálat módszere

3.3.1. A betegség tüneteinek megállapítása

Házi kertben, idős, diófa törzsén sekély, szabálytalan alakú fekélyesedést figyeltünk meg a törzs és az ágak kéregrészein. A fekélyes sebekből sötét, feketés színű folyadék szivárogott. A kéregdarabokat zacskóba, a váladékot steril Eppendorf csőbe gyűjtöttük és a vizsgálatokig a kórokozó számára kedvező környezeti feltételek mellett tartottuk (párás, meleg). A vizsgálatokat 1-2 napon belül elvégeztük.

3.3.2. A kórokozó izolálása, tenyésztése

A kéregdarabokat alkohollal fertőtlenítettük, majd steril körülmények között az egészséges és az elhalt növényi rész határáról mintát vettünk. A növényi szövetet és a váladékot steril desztillált vízzel homogenizáltuk, majd az elegyet steril King-B agar táptalajon szélesztettük, és a Petri-csészéket 26 °C-on inkubáltuk 1-2 napon át. A különálló kolóniákat újra leoltottunk, majd tiszta tenyészetbe hoztuk, majd a tiszta tenyészeteket 4 °C-on, hűtőben tároltuk.

3.3.3. A baktérium szuszpenzió előállítása

A hiperszenzitív reakcióhoz, a patogenitási teszthez, a biokémiai vizsgálatához, a zöld dió- és az oltvány fertőzésekhez szükséges baktérium szuszpenziót a kórokozó 1 napos (26 °C) tenyészetéből nyertük. A spektrofotométert a vizsgálatok előtt desztillált vízzel kalibráltuk. A 24 órás, friss, tiszta tenyészetből származó baktérium szuszpenziót a spektrofotométerrel 10^7 sejt/ml töménységűre állítottuk be.

3.3.4. Kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel

Tenyészbélyegek megállapítása

A saját növényből izolált és a Génbankból származó *Brenneria nigrifluens* izolátumok tiszta tenyészetét általános és szelektív táptalajokra szélesztettük. A Petri-csészéket termosztátba helyeztük és a kórokozó számára kedvező környezeti tényezők mellett tároltuk. A baktériumok tenészbélyegeit a kolónia típusai alapján lehet megkülönböztetni. 24-48 h elteltével a táptalajokon kifejlődött kolóniákat mikroszkóp alatt megfigyeltük és jellemeztük. A kolóniákat megkülönböztethetjük a telepek állaga, alakja, felszíne, széle és színe alapján, mely módszert mindenki általánosan alkalmazza (Klement és társai, 1990; Puskás, 1986).

Gram tulajdonság

Az izolátum 24 órás friss tenyészetét Petri-csészében neveltük, majd steril fogpiszkálóval egy-két kolóniát veszünk, majd tárgylemezre tesszük, 3%-os KOH oldatot cseppentünk rá és homogenizáljuk. Finom dörzsölés után láthatóvá válik, hogy a vizsgálni kívánt baktérium sejtfala feloldódott (az elegy nyúlóssá vált), tehát Gram-negatív, vagy nem oldódott fel (az elegy vízszerű), tehát Gram-pozitív tulajdonságú.

Hiperszenzitív reakció

A baktérium szuszpenziót (5×10^7 sejt/ml) a dohánylevél (*Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi*) szövetébe juttattuk injekciós tűvel. Majd 24-48 óra elteltével figyeltük, hogy megállapítható-e a hiperszenzitív reakció kialakulása, a gyors szöveti nekrozist vagy sem (Klement, 1963).

Patogenitási és gyors azonosítási teszt

A betegségek mikrobiális eredetére vonatkozóan teljesülniük kell a Koch-féle posztulátumoknak, melyek a következők (Koch 1876):

1. A kórokozó minden beteg növényből kimutatható
2. A kórokozó izolálva mesterségesen tenyésztethető (nem obligát parazita esetében) vagy obligát parazita esetén, fogékony gazdanövényen (tisztá tenyészet).
3. Az eredeti, de egészséges gazdanövény inokulálva a kórokozó a tiszta tenyészetéből azonos tüneteket hoz létre, mint a megfigyelt eredeti növényen.
4. A kórokozó kimutatható ezekből az inokulált növényekből és ismét tiszta tenyészetbe hozva ugyanazok a tenyészbélyegek figyelhetőek meg, mint a 2. lépésben nem obligát parazita esetén.

A patogenitási tesztet hajtáson kell elvégezni. Az alkohollal fertőtlenített fiatal dióhajtásokat a kórokozó 24 órás tiszta tenyészetéből desztillált vízzel készített elegyével fertőztük. A dióhajtás csúcsi részétől számolva a 2. teljesen kifejlődött levél hónaljába juttattuk be injekciós tűvel a 10^7 sejt/ml töménységű szuszpenziót. A kontroll hajtást steril, desztillált vízbe mártott tűvel szűrtük meg, majd mind a fertőzött, mind a kontroll mintákat 26 °C-on és 80% relatív páratartalom alatt, steril műanyag dobozban tartottuk. A megfelelő páratartalmat nedves szűrőpapírral biztosítottuk, az eredményeket a hajtásokon 1-3 hónap, elteltével értékeltük.

Moretti és Buonauro (2010) gyorsesztet dolgoztak ki a kórokozó gyorsabb azonosítása érdekében. A teszt során éretlen diótermés burkát fertőzték *Brenneria nigrifluens*, *Dickeya chrysanthemi*, *Erwinia rhapontici*, *Ralstonia pickettii*, *Spingobacterium spiritovorum* baktériumfajokkal. Korábban a kutatók ezeket a baktériumokat vélték a kéregfolyás kórokozójának, mert e fajokat mutatták ki a mintákból. Az inokulációt követő 2. napon a burok fertőzött részén nekrózis volt megfigyelhető, és a sebből barnás folyadékcspekpek tűntek elő, amit csak a *Brenneria nigrifluens* faj okoz. Ezt a gyors módszert alkalmazzák a dió egyik legjelentősebb betegsége, a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* baktériumfaj patogenitási vizsgálatára is. Ezeket a vizsgálatokat is elvégeztük a hazai és törzsbaktériummal összehasonlítva, valamint más hazai izolátumokkal (*Brenneria goodwinii*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* és *Erwinia amylovora*) is.

Az alkohollal fertőtlenített zöld diókat a kórokozó 24 órás tiszta tenyészetéből desztillált vízzel készített elegyével fertőztük. A zöld dió burkát megszártuk a 10^7 sejt/ml töménységű szuszpenzióba mártott tűvel. A kontroll terméseket steril, desztillált vízbe mártott tűvel szűrtük meg, majd mind a fertőzött, mind a kontroll mintákat 26 °C-on és 80% relatív

páratartalom alatt, steril műanyag dobozban tartottuk. A megfelelő páratartalmat nedves szűrőpapírral biztosítottuk, az eredményeket a terméseken 7 nap elteltével értékeltük.

Kórokozó azonosítása biokémiai módszerrel

A biokémiai tulajdonságok vizsgálata gyorseszttel történik. Az API csíkok száraz formában tartalmazzák a mikrobák enzimaktivitásának és cukorbontási képességének vizsgálatához szükséges szubsztrátokat. Az enzimaktivitási tesztet a baktériumok tiszta tenyészetének szuszpenziójával inokuláltuk, ez végzi a szubsztrátumok rehidratálását (Tóth és Palatinszky 2012; Végh 2012). Az API20E esetében a gyártó utasításait (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) végeztük el. Az izolátum esetében a kitek mintahelyeinek megtöltéséhez, a kitekhez tartozó speciális táptalajokhoz 10^7 sejt/ml töménységű baktérium szuszpenziót használtunk. A gyorseszttet 36 °C-on inkubáltuk és 24-48 h elteltével értékeltük, az indikátor színváltozása vagy a megfelelő reagensek hozzáadása utáni színváltozás jelzi a baktérium biokémiai tulajdonságait. Az API20E kit értékelése során az eredményeket a gyártó által rendelkezésünkre bocsátott pozitív és negatív minta-tesztcsíkok alapján értékeltük (25. ábra).



25. ábra: API20E pozitív (felső sor) és negatív (alsó sor) teszt
(<http://www.tgw1916.net/Tests/api.html>)

3.3.5. Kórokozó azonosítása molekuláris módszerekkel

A molekuláris vizsgálatok közül a baktériumok identifikálására, taxonómiai vizsgálatok kivitelezésére a legelterjedtebb módszer a 16S rRNS-t kódoló gén bázissorrendjének meghatározása szekvencia analízissel. A vizsgálat folyamata hosszadalmas, és költségigényes. Először a baktérium tiszta tenyészetéből származó szuszpenziót polimeráz láncreakciónak kell alávetni, amely megsokszorozza a baktérium, örökítő anyagának vizsgálni kívánt részét. Ezután a tisztított PCR-terméket pGEM-T Easy vektorba ligáltuk, mely lehetővé tette, hogy a következő folyamatban *Escherichia coli* baktériumba transzformáljuk a szekvenálni kívánt szakaszt. A szekvenálás előtti utolsó művelet a plazmid tisztítása, melyet egy Kit-tel végeztünk.

PCR vizsgálat

Primerek:

forward (63f) szekvencia: 5'-caggcctaacacatgcaagtc-3'

reverse (1389r) szekvencia: 5'-acgggcggtgtgtacaag-3'

Az elegy összetétele (50 µl végtérfogatra):

2 µl baktérium szuszpenzió (10^7 sejt/ml)

35,5 µl steril H₂O

1 µl primer 63f (20 pmol/µl)

1 µl primer 1389r (20 pmol/µl)

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

A reakció paraméterei:

1. 94 °C-on 3 perc kezdő denaturálás (1 alkalommal)

2. 94 °C-on 15 másodperc denaturálás (a két komplementer DNS szál szétválása)

3. 55 °C-on 0,5 perc anellálás (a primerként szolgáló oligonukleotid kapcsolódása)

4. 72 °C-on 1,5 perc elongáció (lánc hosszabbítás)

A 2. - 4. reakciók 35 cikluson át ismétlődnek, majd egy záró szintézis következik 72 °C-on, 10 percig.

Gélelektroforézis

A PCR terméket GelRed-del (Biotium) festett 1%-os agaróz gélben, vízszintes mini elektroforézis készülékben választottuk el, 140 V-tal, TBE pufferben [1x TBE (12,11 g Tris, 5,135 g bórsav, 0,372 g EDTA 1000 ml desztillált vízben)]. A nukleinsav frakciókat áteső ultraibolya fényben (254 nm) értékeltük és fényképeztük (UVP, BioDoc- ItTM System).

A PCR-termék tisztítása

A PCR terméket a High Pure PCR Product Purification Kit-tel a gyártó (Roche) utasításait követve tisztítottuk.

Ligálás

A tisztított PCR-terméket pGEM-T Easy vektorba ligáljuk, melyet kifejezetten PCR-termékekhez ajánlanak. A ligáláshoz a következőket mértük össze (10 µl végtérfogatra):

5 µl steril H₂O

1 µl plazmid (pGEM-T Easy)

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

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

2 µl inzert (tisztított PCR-termék)

Ezt 6 órán át szobahőmérsékleten ligáltuk.

Transzformálás *Escherichia coli* DH 5α törzsébe

A -70 °C-on tárolt kompetens sejtet jégen kiolvastottuk, a ligátumot szintén jégre tettük. A már felolvadt kompetens sejtet hozzámértük a ligátumhoz, 30 percig hagytuk jégen állni, majd egy percig 42 °C-on tartottuk, hogy kinyíljanak az *Escherichia coli* baktérium pórusai és a plazmid bejuthasson. Ezután azonnal jégre tettük és öt percig jégen tartottuk. Ezt követően hozzámértünk 500 µl antibiotikum-mentes 2TY folyékony táptalajt, és ezzel összeforgattuk. Egy órán át 37 °C-on ráztuk. Ez alatt ampicillin tartalmú LB szilárd táptalajra 10 µl IPTG-t és 40 µl X-Gal-t (Fermentas) szélesztettünk, és megvártuk, míg megszárad. A rázás után az előkészített táptalajra 100 µl, ill. 50 µl-t kientünk a már felszaporodott baktérium tenyészetből. Száradás után a lemezeket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk.

Plazmid tisztítás szekvenáláshoz

A kiválasztott klónt 2 ml folyadékkultúrában (ampicillines LB) újra felszaporítottuk (37 °C, egész éjszakán át történő rázás). A baktériumkultúrával töltött Eppendorf csövet 3 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-tel (Bio-Rad) a gyártó utasításai szerint tisztítottuk.

Minipreparátum készítése

Három egyedi fehér kolóniából 2–2 ml folyadékkultúrába (ampicillines LB) inokuláltunk, és 37 °C-on éjszaka ráztuk. A baktériumkultúrákat 3 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, és a pellethez hozzáadtunk 200 µl „A” oldatot (15 mM TRIS HCl pH: 8, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz), Vortex segítségével összekevertük, majd öt percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Aztán hozzámértünk 400 µl „B” oldatot (0,2 M NaOH, 1 % SDS), összeforgattuk, majd 300 µl „C” oldatot (60 ml 5 M Na-acetát, 11,5 ml ecetsav, 28,5

ml steril H₂O) és ezzel is összeforgattuk, öt percre jégre helyeztük, azután öt percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf csőbe töltöttük, így öt percig centrifugáltuk, majd a felülúszót ismét új Eppendorf csőbe töltöttük, és hozzáadtunk 600 µl izopropanolt, ezzel összeforgattuk, és öt percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. Elöntöttük a felülúszót, lecsöpögtettük, és a pellethez hozzáadtunk 200 µl „D” oldatot (0,1 M Na-acetát pH: 7, 0,05 M TRIS HCl pH: 8), ezt hagytuk szobahőmérsékleten állni 10 percig, majd Vortex segítségével kevertük, végül 400 µl etanollal öt percig centrifugáltuk, a felülúszót elöntöttük, és a pelletet beszárítottuk 30 perc alatt. Utolsó lépésként a pelletet visszaoldottuk 100 µl RNase TE-ben (1 ml 10x TE, 9 ml steril H₂O, 10 µl RNase (10 mg/ml)).

Az inzert ellenőrzése

A Minipreparátum módszerrel tisztított rekombináns klónok plazmidjaiból *EcoRI* enzimmel ellenőriztük a PCR-termék beépülését. Az *EcoRI* enzim jól használható erre a célra, hiszen a beépülés helye mellett mindkét oldalon megtalálható ez a specifikus hasítóhely. A reakcióhoz az alábbiakat mértük össze (10µl végtérfogatra):

2 µl plazmid (0,5 µg)

1 µl 10x *EcoRI* puffer

0,2 µl *EcoRI* enzim (10 u/µl)

6,8 µl H₂O

Az Eppendorf csöveket 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd a mintákat 1 % agaróz gélben elektroforetizáltuk, és ellenőriztük a megfelelő hosszúságú inzert kivágódását.

A nukleinsav szekvencia meghatározása és analízise

A tisztított PCR termékeket Szegedre, a BayGen Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetbe küldtünk a szekvencia meghatározására. A szekvenciák összeillesztéséhez a CLC SEQUENCE Viewer 6.5.1. szekvencia analízáló programcsomagot használtuk. A szekvenciák összehasonlításához az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázist használtuk fel. A filogenetikai törzsfa elkészítéséhez és a szekvenciák összehasonlításához a CLC szekvencia analízáló programcsomagot használtunk.

3.3.6. Diófajták fogékonysági vizsgálata

A kórokozó hazai megjelenése magával vonta a termelők, kutatók érdeklődését az egyes fajták fogékonyságával kapcsolatban. Ennek eleget téve kezdtünk vizsgálatokat, s teszteltük a hazánkban forgalomban lévő hazai nemesítésű fajtákat, egy fajtajelöltet, valamint az alanyként Magyarországon kevésbé használt fekete diót (*Juglans nigra*). Fajtánként 20-20 darab éretlen zöld dió termést gyűjtöttünk az Állami Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató Fejlesztő Közhasznú Nonprofit Kft. érdi és budatényi telephelyén, majd azt felcímkezve, hűtött körülmények között tárolva a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékének laboratóriumába szállítottunk. A laboratóriumban alkohollal alaposan fertőtlenítettünk a termést, 15 db-ot inokuláltunk a baktérium 24 órás tenyészetéből desztillált vízzel készített, 10^7 sejt/ml töménységű szuszpenziójával steril fogpiszkálóval, kontrollként 5 darabot pedig steril desztillált vízzel inokuláltunk a sebzés egyöntetűsége miatt. Ezután steril műanyag dobozba helyeztük, ahol biztosítottuk a baktérium számára optimális feltételeket (24-26 °C, 80% RH). A fertőzés eredményét 7 nap után értékeltük, a termések szétvágásával és a tünetek megállapításával (Moretti és Buonauro, 2010). A saját értékeléseink során 2 csoportot különböztettünk meg (**26. ábra**):

- I. tünetmentes;
- II. vizenyős, nekrotikus folt jelentkezett a szúrásnyom körül; az egész termés megfertőződött, a dió belseje barnult, feketedett és előfordult, hogy elfolyósította a termést és váladék tört a felszínre.



26. ábra: A zöld dió fogékonysági kategóriái
(I.= tünetmentes, II.= részleges, teljes nekrotizáció)
(Fotó: Borsos Gergely, 2012)

A nyár folyamán 2 alkalommal végeztük el a fertőzést, első alkalommal a hazai izolátummal, második alkalommal a Génbankból származó referencia izolátummal (DSM30175). Az ősz folyamán tervezzük a hajtás fertőzését is oltványokon, ugyanazokon a fajtákon, amelyeken a zöld dió fertőzést is elvégeztük.

4. Eredmények

4.1. A kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel

4.1.1. A *Brenneria nigrifluens* okozta tünetek

A kórokozó tünetei könnyen észrevehetőek, megjelennek a fiatal fákon és az idősebb fákon is, főleg a törzsön, vastagabb ágakon. Jellegzetesen a sebzéseken, kártevők által létrejött lyukakon, vagy egyszerűen a törzsön keletkező természetes mikro repedéseken fertőz a kórokozó, melyet barnás-feketés folyás jelez. Később ezen a folyadékon, váladékon megtelepednek másodlagos kórokozók is (27. és 28. ábra).



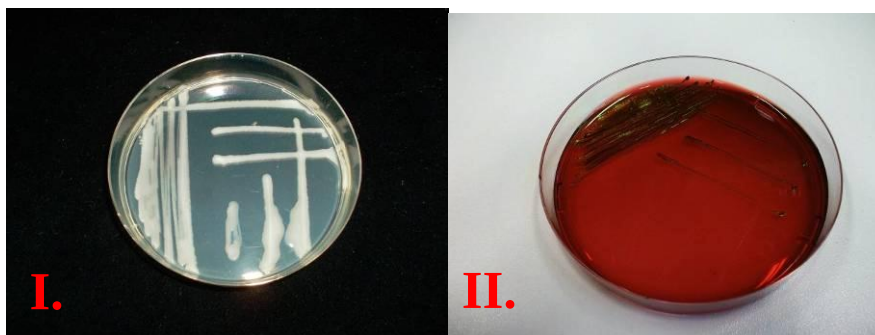
27. ábra: A *Brenneria nigrifluens* okozta tünet idős diófa törzsén
(Fotó: Borsos Gergely, 2013)



28. ábra: A kórokozó tünete idős diófák törzsén
(Fotó: Végh Anita, 2012; Tóth Annamária, 2012)

4.1.2. A kórokozó tenyésztete

A kórokozó King-B táptalajon, 24 óra elteltével ép szélű, sima felületű fehéres kolóniát, míg az EMB táptalajon 2-3 nap elteltével 27 ± 1 °C-on fémes-zölden fénylő, lilás színű, sima felületű, ép szélű kolóniát képez (29. ábra).



29. ábra: A hazai izolátum (Bn-Walnut-Zn-Hun1) tenyésztete King-B (I.) és EMB táptalajon (II.)
(Fotó: Borsos Gergely, 2013)

4.1.3. Gram-féle tulajdonság

A 3%-os kálium-hidroxid feloldotta a baktérium sejtfalát, így az általunk vizsgált izolátum Gram-negatív volt.

4.1.4. Hiperszenzitív tulajdonság

Az izolátumok 10^7 sejt/ml töménységű szuszpenziójával inokulált *Nicotiana tabacum* cv. 'White Burley' dohány növények levelein 48 óra elteltével sem alakult ki a hiperszenzitív reakciót jelző szöveti nekrosis (30. ábra).



30. ábra: A kórokozó hiperszenzitív reakciója dohánynövény levélén
(I.- hazai izolátum-Bn-Walnut-Zn-Hun1; II.- kontrollként *Erwinia amylovora*)
(Fotó: Végh Anita, 2012)

4.1.5. Patogenitási teszt, gyors azonosítási módszer

Kísérletünkben visszafertőztünk dió vesszőket, illetve éretlen (zöld dió) terméseket a baktérium szuszpenzióval. Az inokulált növényi részek különböző mértékben fertőződtek. Megállapítottuk, hogy a zöld dió 10 nap alatt intenzíven reagált a fertőzésre, a dió bélállományában barnás elhalás volt megfigyelhető, fekete folyadék is kialakult, mely alkalmas a kórokozó gyors azonosítási módszerére. A dióhajtások esetében 1-3 hónap elteltével alakultak ki, nagyon gyenge, kevésbé tipikus tünetek. A hajtásokat kettévágva tapasztaltunk nagyon halvány, feketés csíkokat, de a barnás-feketés váladék a fertőzést követően 3 hónappal sem jelent meg. A hajtásokról és a zöld dióról is visszaizoláltuk a kórokozót (31. ábra).



31. ábra: Patogenitási teszt eredménye zöld dión (I.) és vesszőn (II.)
(Fotó: Végh Anita, 2012; Borsos Gergely, 2012)

4.1.6. A kórokozó biokémiai jellemzői

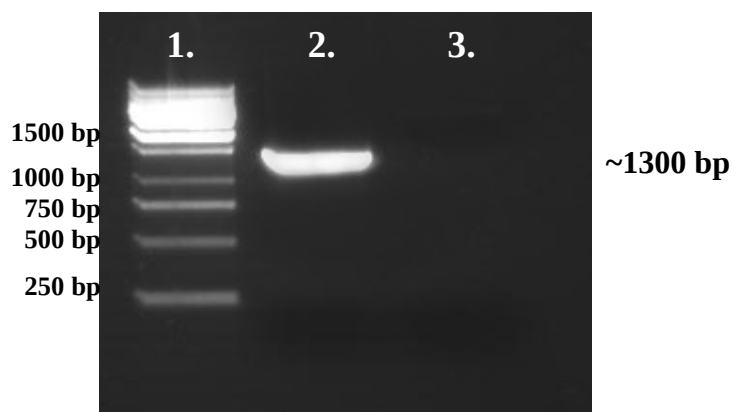
Az API 20E kit alapján az általunk vizsgált izolátum pozitív reakciókat adott citrát hasznosításra, H₂S termelés, ureáz termelés, acetoin termelésre valamint glükóz, inozit, szacharóz és arabinóz vizsgálatokban (**1. táblázat**). Az oxidáz-teszt során az izolátum negatív reakciót adott. Az általunk vizsgált baktérium biokémiai vizsgálatok alapján nagy valószínűséggel az *Enterobacteriaceae* családba tartozik.

1. táblázat: Az API20E 24 órás teszt eredménye a dióról származó Bn-WalnutZa-Hun1 izolátum esetében

ONPG	β-galaktozidáz	-	GEL	Gelatináz	-
ADH	arginin-dihidroláz	-	GLU	Glukóz	+
LDC	Lizin DeCarboxiláz	-	MAN	Mannit	-
ODC	Ornitin DeCarboxiláz	-	INO	Inozit	+
CIT	Citrát hasznosítás	+	SOR	Sorbit	-
H ₂ S	H ₂ S termelés	+	RHA	Rhamnóz	-
URE	Ureáz	+	SAC	Sacharóz	+
TDA	Triptofán DeAmináz	-	MEL	Melibióz	-
IND	Indol termelés	-	AMY	Amygdalin	-
VP	Acetoin termelés	+	ARA	Arabinóz	+

4.2. A kórokozó molekuláris vizsgálata

A dióról származó izolátum 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata során, a reakció eredményeként kb.1300 bp hosszúságú PCR-termék keletkezett (**32. ábra**).



32. ábra: Dióról származó izolátum (Bn-Walnut-Zn-Hun1) PCR analízise

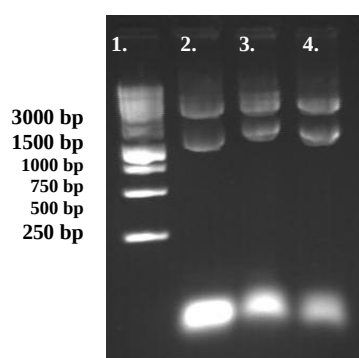
Jelmagyarázat: 1.- 1 kB méretmarker,
2.- Dióról származó izolátum (Bn-Walnut-Zn-Hun1)
3.- Negatív kontroll

Minipreparátum

A három minipreparátum mindegyikénél a plazmid tartalmazta a kívánt hosszúságú PCR-terméket. Az 3-as számú klónt választottuk ki, és szaporítottuk fel a szekvencia meghatározásához.

Tisztított, *EcoRI* enzimmal emésztett plazmid

Az *EcoRI* enzimmal emésztett rekombináns plazmidokból a várt 1300 bp hosszúságú inzertek vágódtak ki (**33. ábra**).



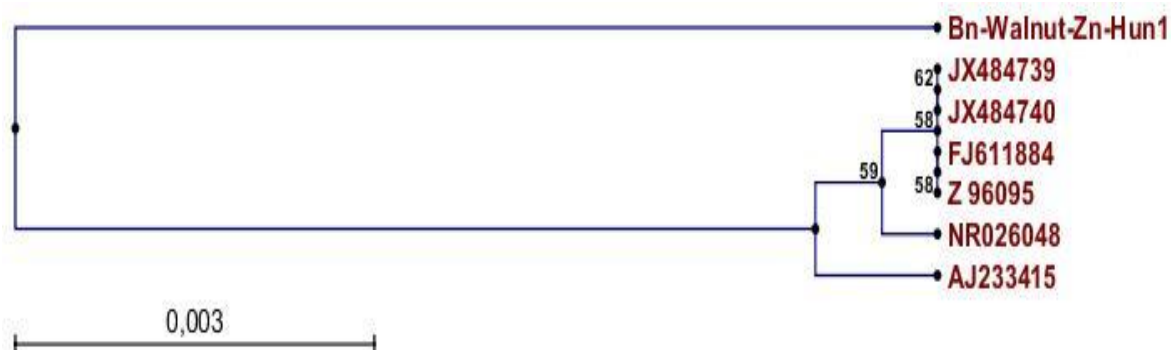
33. ábra: A dióról származó izolátum hasított plazmidja

Jelmagyarázat: 1. – 1 kb méretmarker, 2.,3., 4. – rekombináns plazmid

Rokonsági kapcsolatok feltárása

A magyar izolátum (Bn-Walnut-Zn-Hun1) részlegesen meghatározott 16S rDNS nukleotid szekvenciáját (1325 bázis) elküldtük a nemzetközi adatbankba, amely az HE936707 hivatkozási számon található.

A nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal összehasonlítottuk a dióról származó izolátum szekvenciáját. Az összehasonlítás alapján a vizsgált szakaszon 100% homológiát nem mutatott egyik adatbankban fellelhető más *Brenneria nigrifluens* izolátummal sem. Az NCBI adatbázisban megtalálható izolátumokkal 98-99%-os homológiát mutatott. Az összehasonlítás alapján a vizsgált szakaszon 99% homológiát mutatott a hazai izolátum a JX484739 és a JX484740 hivatkozási számon található szerbiai izolátumokkal, a FJ611884 és a Z96095 hivatkozási számon található amerikai izolátumokkal és az AJ233415 hivatkozási számon található német izolátummal. 98% homológiát mutatott a hazai izolátum az NR 026048 hivatkozási számon található izolátummal. Az adatok alapján elkészítettük a filogenetika törzsfát (34. ábra). A filogenetikai fán megfigyelhető, hogy a dióról származó hazai izolátum eltér az eddigi különböző országokban azonosított, leírt *Brenneria nigrifluens* törzsekhez képest.



34. ábra: *Brenneria nigrifluens* izolátumok filogenetikai törzsfája, adatbanki hivatkozási számmal, Bn-Walnut-Zn-Hun1 a saját izolátumunk

Magyarázat: A vízszintes vonalak az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják, a függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják, 1000 mintavétel esetén, mely filogenetikai fa megbízhatóságát mutatja. A törzsfá alatti skála 3 bázisváltozást mutat 1000 bázisonként.

4.3. A diófajták fogékonyságának vizsgálata

A vizsgálatokat 2013. július hónapjában végeztük, a dió héjának keményedése előtt. Fajtánként 20-20 db termés begyűjtése, megfelelő előkészítése után 15-15 darabot fertőztünk meg a baktérium 10^7 sejt/ml töménységű szuszpenziójával, 5-5 darabot pedig steril desztillált vízzel inokuláltunk. A zöld diókat 7 nap után félbevágva értékeltük. Az értékelés során 2 csoportot különböztettünk meg (35. ábra):

- I. tünetmentes;
- II. vizenyős, nekrotikus folt jelentkezett a szúrásnyom körül; az egész termés megfertőződött, a dió belseje barnult, feketedett és előfordult, hogy elfolyósította a termést és váladék tört a felszínre.



35. ábra: A zöld dió fogékonysági kategóriái
(I.-tünetmentes, II.-mesterségesen fertőzött zöld diótermés tünetei)
(Fotó: Borsos Gergely, 2013)

A kiértékelés során fajták közti tényleges különbséget nem találtunk, minden fajta termése egyöntetűen fogékony a kórokozóra. A kontroll terméseken látszik az inokulálás helye, de nem alakult ki a kórokozóra jellemző tünet (35. ábra). Bár a legerősebb tüneteket a *Juglans nigra* esetében tapasztaltunk, mely teljesen elfeketedett és amelyen baktériumnyálka is megjelent (36. ábra). A fertőzött termésekről a kórokozót vissza is izoláltuk. A baktérium számára az éretlen dió belseje optimális közegnek bizonyult, a termések bélállománya laza, vízzel teli, a megfelelő hőmérsékletet biztosítva könnyen kialakul a baktériumra jellemző rothadás, feketés folyadék kiválás.



36. ábra: Mesterségesen fertőzött zöld dió termések
(I.-'Milotai bőtermő', II. 'Juglans nigra')
(Fotó: Borsos Gergely, 2013)

A zöld dió mesterséges fertőzése kísérlet során összehasonlítottuk a hazai Bn-Walnut-Zn-Hun1 izolátumot egy referencia izolátummal a DSM30175 számúval. Az eredmények alapján nem tapasztaltunk különbségeket (**37. ábra**). Minden vizsgált diófajta, a főfajták az 'A 117', 'Alsószentiváni kései', 'Bonifác', 'M 10', 'Milotai intenzív', 'Milotai kései', 'Milotai bőtermő', 'T 83', egy fajtajelölt ('BD6') valamint az alanyként Magyarországon kevésbé használt fekete dió (*Juglans nigra*) is fogékonyak bizonyult, mert kialakultak a baktériumra jellemző tünetek.



37. ábra: Mesterségesen fertőzött 'Milotai intenzív' diófajta zöld diói (I.-hazai izolátummal és a II.- DSM30175 törzsbaktériummal inokulált zöld diók) (Fotó: Borsos Gergely, 2013)

A zöld dió mesterséges fertőzése alkalmas a kórokozó gyors azonosítására és más, nem *Brenneria* nemzetségbe tartozó baktériumfajoktól való elkülönítés tesztelésére is. Kísérleteink során nemcsak a Bn-Walnut-Zn-Hun1 és a DSM30175 referencia izolátummal végeztünk vizsgálatokat, hanem más hazai 2013-ban izolált *Brenneria goodwinii*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* és egy *Erwinia amylovora* baktériumfajjal is (**38. ábra**). A *Brenneria* nemzetségbe tartozó fajok fertőzték a zöld diót, amelyet a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* is fertőzött. A tünetek hasonlóak, de a *Xanthomonas* faj esetében kevésbé voltak intenzívek és nem folyósodtak. Az *Erwinia amylovora* baktériumfaj azonban egyáltalán nem fertőzte a zöld diót, az inokulálást követő 10. napon sem. Tehát a zöld dió fertőzés alkalmas a *Brenneria nigrifluens* baktériumfaj gyors azonosítására, tesztelésére és más baktériumfajoktól való elkülönítésre.



38. ábra: Különböző baktériumfajokkal inokulált zöld diók
(I.-*Brenneria goodwinii*, II.- *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, III. *Erwinia amylovora*)

(Fotók: Zámbo Ágnes, 2013; Végh Anita, 2013)

A fajták fogékonysági vizsgálatát a hajtásfertőzésekkel folytatjuk november folyamán, ahol konténerezés után mesterségesen fertőzünk fiatal, kereskedelmi forgalomban kapható oltványokat. Mivel a kórokozó a dió törzsén okoz tüneteket, ezért fontosnak tartjuk a hajtások fogékonyságát tesztelni, mivel a fajták fogékonyságánál elsősorban ezen eredmények lennének a legfontosabbak.

5. Következtetések levonása, összefoglalás

A dió termőterületének és az állománysűrűségének növekedése, az import áru ellenőrzésének nehézségei, a nemzetközi kereskedelem határnélkülisége, az időjárási körülmények szélsőségessége, a növényvédelmi problémák növekedését vonja maga után, ami miatt a dió az igényes kultúrák közé lépett elő az utóbbi években. 2012-ben több helyen is megfigyelték hazánkban, hogy a diófák törzsén fekete folyás jelentkezik. Külföldi szakirodalmi adatok (Wilson és társai, 1957; Hauben és társai, 1998) kutatása után a tünetek alapján nyilvánvalóvá vált egy új baktériumfaj, a *Brenneria nigrifluens* hazai megjelenése.

A kórokozó tünetei megjelennek a fiatal fákon és az idősebb fákon is, főleg a törzsön, vastagabb ágakon. Jellegzetesen a sebzéseken, kártevők által létrejött lyukakon, vagy egyszerűen a törzsön keletkező természetes mikrorepedéseken fertőz a kórokozó, melyet barnás-feketés folyás jelez. Később ezen a folyadékon, váladékon megtelepednek másodlagos kórokozók is. Ezeket a tüneteket már Wilson és társai 1957- ben feljegyezték Kaliforniában. A kórokozó King-B táptalajon, 24 óra elteltével ép szélű, sima felületű fehéres kolóniát, míg az EMB táptalajon 2-3 nap elteltével 27 ± 1 °C-on fémes-zölden fénylő, lilás színű, sima felületű, ép szélű kolóniát képez, melyet Jamalzade és társai (2009) és Menard és társai (2004) is megállapítottak. Az API 20E kit alapján az általunk vizsgált izolátum pozitív reakciókat adott citrát hasznosításra, H_2S termelés, ureáz termelés, acetoin termelésre valamint glükóz, inozit, szacharóz és arabinóz vizsgálatokban. Az oxidáz-teszt során az izolátum negatív reakciót adott. Az általunk vizsgált baktérium biokémiai vizsgálatok alapján nagy valószínűséggel, az *Enterobacteriaceae* családba tartozik, mely eredmények megegyeznek a külföldi kutatók által leírt biokémiai tulajdonságokkal (Menard és társai, 2004; Saccardi és társai, 1998; Jamalzade és társai, 2009; Popovic és társai, 2013). Gram tulajdonságát tekintve Gram-negatív a baktérium, és dohánynövényen nem ad hiperszenzitív reakciót (Klement és társai, 1964, Wilson és társai, 1957). Klement és társai (1964) azt állapították meg, hogy csak azok a baktériumok adnak hiperszenzitív reakciót, melyek növénypatogének. Azon baktériumfajok, melyek nem adnak gyors szöveti nekrozist, azok szaprofita szervezetek (Klement és társai, 1964). Ma már számos olyan baktériumfaj létezik és került leírásra nemzetközi folyóiratokban (pl.: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* törzsei), melyek nem adnak hiperszenzitív reakciót és mégis patogén szervezetek.

A dióról származó hazai izolátum 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata során, a reakció eredményeként kb.1300 bp hosszúságú PCR-termék keletkezett (Osborn és társai,

2000). Az izolátum (Bn-Walnut-Zn-Hun1) ezen örökítő anyag szakaszának meghatározott szekvenciáját (1325 bázis) elküldtük a nemzetközi adatbankba, amely az HE936707 hivatkozási számon található. Az NCBI adatbázisban megtalálható izolátumokkal 98-99%-os homológiát mutatott. Az adatok alapján elkészítettük a filogenetika törzsfát, melyen megfigyelhető, hogy a dióról származó hazai izolátum eltér az eddigi különböző országokban azonosított, leírt *Brenneria nigrifluens* izolátumokhoz képest.

A *Brenneria nigrifluens* a természetben nem okoz tüneteket a zöld dión (Wilson és társai, 1957; Hauben és társai, 1998), de a kórokozó hazai megjelenése magával vonta a termelők, kutatók érdeklődését az egyes fajták fogékonyságával kapcsolatban. Wilson és társai (1957) szerint a diófajták jelentős része fogékony, amit Menard és társai (2004) valamint Saccardi és társai (1998) is megerősítettek.

Mesterséges fertőzési kísérleteket végeztünk a hazánkban forgalomban lévő, hazai nemesítésű fajták ('A 117', 'Alsószentiváni kései', 'Bonifác', 'M 10', 'Milotai intenzív', 'Milotai kései', 'Milotai bőtermő', 'T 83'), egy fajtajelölt ('BD6') valamint az alanyként Magyarországon kevésbé használt fekete dió (*Juglans nigra*) termésén. Fajtánként 15-15 darabot fertőztünk meg a baktérium 10^7 sejt/ml töménységű szuszpenziójával, 5-5 darabot pedig steril desztillált vízzel inokuláltunk kontrollként. A zöld diókat 7 nap után félbevágva értékeltük. A kiértékelés során fajták közti különbséget nem találtunk, minden fajta termése egyöntetűen fogékony a kórokozóra, bár a *Juglans nigra* termésén intenzívebb tünetek alakultak ki és baktériumnyálka is megjelent. A baktérium számára az éretlen dió belseje optimális közegnek bizonyult, a termések bélállománya laza, vízzel teli, a megfelelő hőmérsékletet biztosítva könnyen kialakul a baktériumra jellemző feketés folyadék kiválás (Wilson és társai, 1957; Hauben és társai, 1998; Menard és társai, 2004), amelyet Moretti és Buonauro (2010) is feljegyzett már. A hazai izolátum és a referencia izolátum összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy nincsen különbség a baktériumok között a tünetek tekintetében. Moretti és Buonauro (2010) kísérletben alátámasztotta, hogy a zöld dió termésének fertőzésével könnyen azonosíthatjuk a *Brenneria nigrifluens* baktériumfajt, mely egyben alkalmas más baktériumfajoktól való elkülönítésre, gyors azonosításra is, melyet a saját vizsgálataink eredményei is alátámasztanak. A mesterségesen fertőzött zöld diót a *Brenneria nigrifluens*, a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* fertőzte, azonban az *Erwinia amylovora* nem. A fajták fogékonysági vizsgálatát a hajtásfertőzésekkel folytatjuk össze. Mesterségesen fertőzünk fiatal, kereskedelmi forgalomban kapható oltványokat. Mivel a kórokozó a dió törzsén okoz tüneteket, ezért fontosnak tartjuk a hajtások fogékonyságát

tesztelni, mert a fajták fogékonyságánál elsősorban ezen eredmények lennének a legfontosabbak.

Mind klasszikus, mind molekuláris módszerekkel bizonyítottuk, hogy a hazánkban begyűjtött mintában, a korábban hazánkban ismeretlen *Brenneria nigrifluens* baktériumfaj volt a tünetekért felelős kórokozó.

Eredményünk új tudományos eredménynek számít, mert a *Brenneria nigrifluens* baktériumfaj diófa törzsén történő megjelenéséről hazánkban még nem számoltak be, valamint fajtafogékonysági vizsgálatokat sem végeztek. Megállapítottuk, hogy a zöld dió mesterséges fertőzése alkalmas a *Brenneria nigrifluens* baktériumfaj gyors azonosítására és más baktériumfajoktól való gyors és olcsó elkülönítésére. A diófa sekély kéregrák betegségének megjelenése a spontán fertőződésének és a kórokozó fennmaradásának lehetőségét, valamint járványszerű fellépését vetíti elő, mely gazdasági károkat okozhat a fiatal és idősebb diófa ültetvényekben, faiskolákban egyaránt. Ezért a későbbiekben fontos a kórokozó elleni védekezési lehetőségek kidolgozása is.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulens tanárainknak, Dr. Végh Anitának, Dr. Palkovics Lászlónak és Dr. Bujdosó Gézának, akik munkámat mindvégig irányították, támogatták és nyomon követték, minden kérdésemre készségesen válaszoltak. Köszönettel tartozom a laboratóriumi és kiértékelési munkában nyújtott segítségért és a fényképek elkészítéséért Tóth Annamáriának és Zámbó Ágnesnek, valamint a minták, növényi anyagok begyűjtésében nyújtott segítségért Marton Balázs ágazatvezető Úrnak. Köszönet családomnak a támogatásukért.

Irodalomjegyzék

1. Aleta N. Rovira M. Ninot A. 2004. Walnut trees of 'Chandler' cv. Trained in three kinds of central leader: structured, semi-structured and free leader. Results at age 6. 5th International Walnut Symposium. Book of abstracts. p.: 11
2. Andor D. 2006. Dióbetakarítás és gépesítése. In: Szentiványi P. Kállay T-né. (szerk). 2006. Dió. Mezőgazda Kiadó. Budapest. p.: 157-174
3. Andor D. 2011. Új gépek a hazai diótermesztésben. In: Kertészet és szőlészet. 60. évf. 2. szám. p.: 14-16
4. Andrienko M. V. Zatokovoy F. T. Satina. L. F. 1989. Walnut in the Ukraine. I. International Symposium on Walnut Production Vol. 284
5. Bujdosó G. 2002. Dióültetvényt pollenadóval telepítsünk! In: Kertészet és szőlészet 51. évf. 44. sz. p.: 8
6. Bujdosó G. 2003. Melyik a legjobb hazai fajta? In: Kertészet és szőlészet. 52. évf. 23. szám. p.: 17
7. Bujdosó G. 2012. A dió termesztése. In: Agroforum, 23. évf. 4. szám, p.:128-129
8. Bujdosó G. 2013(a). A magyar dió a legjobb minőségű a világon. In Agroforum. 24. évf. 5. sz. p.: 122
9. Bujdosó G. 2013(b). Az új fajták jellemzői. In: Magyar mezőgazdaság. 68. évf. 15. szám. p.: 35
10. Choi Y-C. Gu W. Hecht N.B. Feinberg A. P. Chae C-B. 1996. Molecular Cloning of Mouse Somatic and Testis-Specific H2B Histone Genes Containing a Methylated CpG Island. In: DNA and Cell Biology. 15. évf. 6. szám. p.: 495-504
11. Clarridge J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. In: Clin Microbiol Rev 17. szám. p.: 840-862
12. Escobar A.M. Leslie A.C. McGranahan H. G. Dandekar M. A. 2002. Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). In: Plant Science. Vol. 163. Issue 3. p.: 591-597
13. FAO , 2013. augusztus 20-i állapot. <http://faostat3.fao.org/home/index.html>
14. Frazer B. D. Van den Bosch R. 1973. Biological Control of the Walnut Aphid in California: The Interrelationship of the Aphid and its Parasite. In: Environmental Entomology. Vol.2. No. 4. p.: 561-568
15. Gara J. 2011. Dió barna csúcsi elhalás Magyarországon és Itáliában. In: Kertészet és szőlészet. 60 évf. 36. szám. p.: 16-17
16. Germain E. Prunet J. P. Garcin A. 1999. Le Noyer. CTIFL. France
17. Germain E. Lespinasse J. M. Reynet P. Bayol M. 1995. Orchard training of lateral fruit-bearing walnut varieties Assessment of trials carried out in France. In: III. International Walnut Congress No.: 442. p.: 313-320
18. Glits M. Horváth J. Kuroli G. Petróczi I. (Szerk.) 1997. Növényvédelem. Mezőgazda Kiadó, Budapest
19. Glits M. Folk Gy. 2000. Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda kiadó. Budapest
20. Glits M. Péntes B. 2004. Növényvédelem. In: Papp J. (szerk.) 2004. A gyümölcsök termesztése 2. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.: 331-333
21. González R. López-López M. J. Biosca E. G. López F. Santiago R. López M. M. 2002. First report of bacterial deep bark canker of walnut caused by *Brenneria* (*Erwinia*) *rubrifaciens* in Europe. Plant Disease, Vol.86. No.6. p.:696-696.
22. Hauben L. Moore E. R. B. Vauterin L. Steenackers M. Mergaert J. Verdonck L. Swings J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. In: Systematic Applied Microbiology. No. 21. p.: 384-397
23. Hirano S. S. Upper C. D. 1990. Population Biology and Epidemiology of *Pseudomonas syringae*. Annual Review of Phytopathology. Annual review of phytopathology. Vol. 28. p.: 155-177
24. Hluchy M. Ackermann P. Zacharda M. Lastuvka Z. Bagar M. Jetmarová E. Vanek G. Szőke L. Plisek B. 2007. A gyümölcsfák és a szőlő betegségei és kártevői. Biocont Laboratory Kft. Brno
25. Horváth Cs. 2010. Elismert a magyar dió. In: Kertészet és szőlészet. 59. évf. 11. szám. p.: 6-8
26. Horváth Cs. 2013. A magyar dió versenyképessége. In: Magyar mezőgazdaság. 68. évf. 15. sz. p.: 34-35
27. Hrotkó K. 1999, Gyümölcsfaiskola, Budapest, Mezőgazda kiadó
28. Jamalzade A. Shamsbakhsh M. Rahimian H. 2009. Occurrence and distribution of shallow bark canker of walnut trees in Northern provinces of Iran. In: Iranian Journal of Plant Production. No.16. p.: 195-204
29. Jamalzade A. Shamsbakhsh M. Rahimian H. 2012. Genetic diversity of *Brenneria nigrifluens* strains in north of Iran (Margin of caspian sea). In: Cercetari Agronomice in Moldova. Vol. XLV. No. 2. p.: 57-68

30. Kállay T-né. Rozsnyay Zs. Voigt E. Bujdosó G. 2012. Dió Kerekasztal. In: Kertészet és szőlészet. 61. évf. 12. szám. p.: 14-16
31. King E.O. Ward M.K. Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. In: J. Lab. & Clin. Med. 44 évf. 2 szám. p.: 301-307
32. Klaus W. E. R. 1995 *Pseudomonas syringae* pathovars. Prokaryotes. In Pathogenesis & Host Specificity in Plant Disease. Vol. 1. p.: 47-138
33. Klement Z. Farkas G. L. Lovrekovich L. 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. In: Phytopathology. No. 54. p.: 474-477
34. Klement Z. Rudolph K. Sands D. C. 1990. Methods in Phytobacteriology. Budapest. Akadémiai Kiadó. p.: 53-210
35. Koch R. 1876. Untersuchungen Über die Aetiologie der Wundinfektionskrankheiten. Leipzig. F. C. W. Vogel. p.: 8-62
36. Linard Pépinières fajtajegyzéke. 2013. http://www.l-q-p.com/pepiniere/gb/variete_noix.htm
37. Makó Sz. Voigt E. 2006. A dió növényvédelme. In: Szentiványi P. Kállay T-né. (szerk). 2006. Dió. Mezőgazda Kiadó. Budapest. p.: 126-156
38. Maniatis T. Sambrook J. Fritsch E.F. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual (3rd volume). Cold Spring Harbor Laboratory. USA
39. McClean A. E. Sudarshana P. Kluepfel A. D. 2008. Enhanced detection and isolation of the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*, casual agent of deep bark canker. In: European journal of plant pathology. Vol. 122. p.: 413-424
40. McGranahan G. Leslie C. 1991. Walnuts (Juglans). Genetic Resources of Temperate. In: Fruit and Nut Crops Vol. 290. p.: 907-974
41. Menard M. Delort F. Baudry A. Le Saux M. 2004. First report of bacterial canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens* in France. In: Plant disease. Vol. 88. No. 2. p.: 220
42. Metzner R. 1985 Walnüsse. In: Kröger G. W. 1985. Grün ist Leben. Pinneberg. p.: 157-158
43. Meynier V. 1985. Mise en culture in vitro de meristems de noyers hybrides. In: CR Acad. Sci. Paris Vol. 301. p.: 261-264
44. Mikulic-Petkovsek M. Slatnar A. Veberic R. Stampar F. Solar A. 2011. Phenolic response in green walnut husk after the infection with bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. In: Physiological and Molecular Plant Pathology. Vol. 76. Issues 3-4. p.: 159-165
45. Moretti C. Silvestri F. M. Rossini E. Natalini G. Buonauro R. 2007. A protocol for rapid identification of *Brenneria nigrifluens* among bacteria isolated from bark cankers in persian walnut plants. In: Journal of Plant Pathology. 2007. No. 89. p.: 211-218
46. Moretti C. Buonauro R. 2010. Immature walnut fruit inoculation for evaluation of *Brenneria nigrifluens* pathogenicity. In: Phytopathologia Mediterranea. Vol. 49. p.: 80-83
47. Mulrean E. N. Schroth M. N. 1982. Ecology of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* on Persian walnuts. Phytopathology. 72.évf. 4. szám. p.: 434-438.
48. Nemzeti Fajtajegyzék 2012. http://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/novterm_ig/szakteruletek/fajta_szap/jegyzek/nemzeti.html
49. Ocskó Z. 2013. Növényvédő szerek, termésnövelő anyagok I. Vidékfejlesztési minisztérium. Budapest
50. Osborn T. J. Hulme M. Jones P.D. Basnett T. A. 2000. Observed trend sin the daily intensity of United Kingdom precipitation. In: Int. Journal of Climatology. 20. évf. 4. szám. p.: 347-364
51. Ott P. 2007. Az *Agrobacterium*, mint kórokozó. In: Gáborjányi R. Király Z. 2007. Molekuláris növénykórtan. Agroinform Kiadó. Budapest. p.: 192-201
52. Puskás A. 1986. Ipari mikrobiológiai gyakorlatok. Kézirat. Budapesti Műszaki Egyetem. Vegyészmérnöki Kar. Tankönyvkiadó. Budapest. p.: 48-50
53. Radócz L. (szerk.) 2002. A héjasok növényvédelme. Szaktudás Kiadó Ház, Budapest
54. Radóczné K. T. 2012. A magyarországi diótermesztés helyzete. In: Agroforum. 23. évf. 4.sz. p.: 124-127
55. Ramos D. E. 1998. Walnut production manual. University of California, USA
56. Rongting X., Mengjun L. 2003. The Outline and the Problem of China Walnut Industry and the Development Strategy. In: The research development of nut fruits Vol.3 p.:1-5
57. Rozsnyay Zs. 2006. Baktériumos betegségek. In: Szentiványi P. Kállay T-né. (szerk). 2006. Dió. Mezőgazda Kiadó. Budapest. p.: 129-131

58. Saccardi A. Bonetti V. Melegatti A. Cristini M. 1998. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (Northern Italy). In: Journal of Plant Pathology. No. 80. p.: 63-65
59. Scortichini M. Marchesi U. Di Prospero P. 2001. Genetic Diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) Strains from Different Geographical Areas shown by Repetitive Polymerase Chain Reaction Genomic Fingerprinting. In: Journal of phytopathology. 149. évf. 6. szám. p.: 325-332
60. Simon F. Budai P. Keresztes B. Marczali Zs. 2012. Egyes dió kártevők összehasonlító vizsgálata üzemi dióültetvényekben és szórvány diófákon. In: Növényvédelem. 48. évf. 6. szám. p.: 249-256
61. Szentiványi P. Kállay T-né. (szerk). 2006. Dió. Mezőgazda Kiadó. Budapest
62. Tóth E. Palatinszky M. 2012 Taxonómiai gyakorlat. ELTE. Mikrobiológia tanszék http://mikrobiologia.elte.hu/?q=system/files/Taxon%C3%B3mia%20gyakorlat_2012.pdf
63. Tóth G. M. 2004. Dió. In: Papp J. (szerk.) 2004. A gyümölcsök termesztése 2. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.: 321-333
64. Vajna L. 2013. A magyar dió a legjobb minőségű a világon. In: Agroforum. 24. évf. 5. szám. p.: 122
65. Van de Peer Y. Chapelle S. De Wachter R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. In: Nucleic Acids Res. 24. évf. 17. szám. p.: 3381-91
66. Végh A. 2012. Az almafélék tűzelhalását okozó *Erwinia amylovora* hazai izolátumainak biológiai változatossága. Doktori értekezés. Budapest
67. Végh A. Zámbo Á. Borsos G. Palkovics L. 2013(a). Új dióbetegség Magyarországon. In: Kertészet és szőlészet. 62. évf. 30. szám. p.: 17-19
68. Végh A. Tóth A. Zámbo Á. Borsos G. Palkovics L. 2013(b). A dió (*Juglans regia* L.) kéregrepedése, feketefolyása: új baktériumos betegség Magyarországon. In: Növényvédelem. 49. évf. 9. sz. p.: 397-401
69. Véghelyi K. 1976 A rozelliniás gyökérpenész károsítása gyümölcsfákon. In: Kertészet és szőlészet. 25. évf. 32. szám. p.: 4-5
70. Véghelyi K. 1999. A faiskolában előforduló kórokozók és kártevők. In: Hrotkó K. (Szerk.) 1999. Gyümölcsfaiskola. Mezőgazda kiadó. Budapest. p.: 360-391
71. Voigt E. 2000. Megfigyelések az almamolylepkék repülési aktivitásával kapcsolatban. In: Növényvédelem. 36. évf. 9. szám. p.: 457-466
72. Voigt E. Subic M. Baric B. Pajac I. Tóth M. 2012. Adatok a dió-buroklégy (*Rhagoletis completa* Cresson) Kárpát-medencei rajzásához és magyarországi elterjedéséhez. Előadás. [http://www.resinfru.hu/media/uploads/rovartan/ADATOK_A_DI-BUROKLGY_\(Rhagoletis_completa_Cresson\).pptx](http://www.resinfru.hu/media/uploads/rovartan/ADATOK_A_DI-BUROKLGY_(Rhagoletis_completa_Cresson).pptx)
73. Voigt E. Tóth M. 2013. Dió buroklégy magyarországi elterjedése 2013 tavaszán. In: Növényvédelem. 49. évf. 9. szám. p.: 397-401
74. Wang H. Zhang Z. Xuan L. 2007 Review of researches on breeding and germplasm resource of walnut in China. In: Hebei Journal of Forestry and Orchard Research Vol. 4. p.: 014
75. Wilson E. E. Starr M. P. Berger J. A. 1957. Bark cancer, a bacterial disease of Persian walnut tree. In: Phytopathology. No. 47. p.: 669-673
76. Wilson E. E. Zeiton F. M. Fredrickson D. L. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. In: Phytopathology. Vol. 57. p.: 618-621
77. Yonghong G. Baojun Z. 2005. Overview of walnut culture in China. http://walnutresearch.ucdavis.edu/2006/2006_33.pdf

Internetes források

Internetes forrás 1.: <http://www.dordognemaison.com/?p=16&lang=eng>
 Internetes forrás 2.: <http://www.straininfo.net/sequences/HF936707/browser/ddbj>
 Internetes forrás 3.: www.pointernet.pds.hu/ujzagok/agraragazat/index.html
 Internetes forrás 4.: <http://www.ilcsi.com/gyogynoveny/dio/>