

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYKÓRTANI TANSZÉK



Tudományos diákköri dolgozat

Monilinia linhartiana izolátumok jellemzése és fungicid érzékenysége

Papp Ágnes

Növényorvos szak, I. évfolyam

Konzulensek: Lantos Anna, PhD hallgató
Dr. Petróczy Marietta, egyetemi adjunktus
Dr. Palkovics László, egyetemi tanár

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	- 4 -
2. Irodalmi áttekintés	- 6 -
2.1. A <i>Monilinia</i> fajok rendszertani besorolása.....	- 6 -
2.2. A birset megbetegítő <i>Monilinia</i> fajok	- 6 -
2.3. A <i>Monilinia linhartiana</i> rendszertani besorolása és elnevezése	- 7 -
2.4. A <i>Monilinia linhartiana</i> jelentősége és elterjedése.....	- 8 -
2.5. A <i>Monilinia linhartiana</i> gazdanövényei	- 9 -
2.6. A <i>Monilinia linhartiana</i> által okozott tünetek.....	- 9 -
2.7. A <i>Monilinia linhartiana</i> biológiája	- 11 -
2.8. A <i>Monilinia linhartiana</i> morfológiai jellemzése	- 12 -
2.9. A <i>Monilinia linhartiana</i> tenyészbélyegeinek jellemzői	- 13 -
2.10. A <i>Monilinia linhartiana</i> azonosítása molekuláris biológiai módszerekkel.....	- 13 -
2.11. A <i>Monilinia linhartiana</i> elleni kémiai növényvédelem lehetőségei	- 14 -
3. Anyag és módszer	- 16 -
3.1. A vizsgálat helye és ideje.....	- 16 -
3.2. A vizsgálat anyaga	- 16 -
3.2.1. Az izolátumok jellemzése	- 16 -
3.2.2. Táptalajok	- 17 -
3.2.3. Eszközök.....	- 17 -
3.2.4. Növényvédő szerek.....	- 17 -
3.2.5. Primerek.....	- 17 -
3.2.6. Vegyszerek.....	- 19 -
3.3. A vizsgálat módszere	- 19 -
3.3.1. A kórokozó izolálása és fenntartása.....	- 19 -
3.3.2. A morfológiai- és tenyészbélyegek értékelése.....	- 20 -
3.3.3. Patogenitási teszt.....	- 20 -
3.3.4. Az ITS régió és a β -tubulin gén molekuláris biológiai vizsgálata	- 21 -
3.3.4.1. Össznukleinsav kivonása módosított CTAB módszerrel	- 21 -
3.3.4.2. Polimeráz-láncreakció (PCR) vizsgálat.....	- 22 -
3.3.4.3 A vizsgált régiók elemzése a nukleotid sorrend alapján és a rokonsági viszonyok megállapítása.....	- 23 -
3.3.5. Növényvédő szerekkel végzett <i>in vitro</i> hatásvizsgálat a <i>M. linhartiana</i> micéliumának növekedésére.....	- 24 -
4. Eredmények	- 25 -
4.1. A birs monilíniás betegségének tünetei.....	- 25 -
4.2. A <i>Monilinia linhartiana</i> morfológiai bélyegei.....	- 25 -
4.3. A <i>Monilinia linhartiana</i> tenyészbélyegei.....	- 28 -
4.4. Az izolátumok megbetegítő képességének igazolása.....	- 29 -
4.5. A <i>Monilinia linhartiana</i> azonosítása molekuláris biológiai módszerrel	- 30 -
4.5.1. <i>Monilinia</i> fajok összehasonlítása az ITS régió szekvencia részlete alapján	- 31 -
4.5.2. <i>Monilinia</i> fajok összehasonlítása a β -tubulin gén szekvencia részlete alapján.....	- 32 -
4.6. A növényvédő szerekkel végzett <i>in vitro</i> hatásvizsgálatok.....	- 34 -
5. Eredmények megvitatása, következtetések	- 39 -
6. Összefoglalás	- 41 -
7. Köszönetnyilvánítás.....	- 43 -
8. Irodalomjegyzék	- 44 -

Rövidítések jegyzéke:

bp	bázispár
DNS	dezoxiribonukleinsav
CTAB	cetil-trimetilammónium-bromid
ITS	Internal Transcribed Spacer
<i>M.</i>	<i>Monilinia</i>
MEA	Malt extract agar, Maláta kivonat agar
NCBI	National Center of Biotechnology Information
LMA	Leonian-maláta agar
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeráz láncreakció
PDA	Potato dextrose agar, Burgonya-dextróz agar

1. Bevezetés

A birs, ugyan nem tartozik a világ legnagyobb mennyiségben termelt gyümölcssei közé, de kiváló tulajdonságainak köszönhetően a világ számos pontján termesztik. Ökológiai igényeinek megfelelően a mérsékelt égövi régiókban az északi-, és a déli féltekén egyaránt megterem. Az Egyesült Államoktól kezdve, Európán át Ázsiáig szinte mindenhol találhatóak ültetvények. Az utóbbi években Magyarországon egyre több új birsültetvényt telepítenek, elsősorban a népszerű hungarikumnak, a birspálinkának köszönhetően.

A birsnek kevesebb specifikus károsítója ismert, mint a többi almatermésű fajnak. Ilyen sajátos betegség a birs monilíniás betegsége is, melynek kórokozója a *Monilinia linhartiana* (Prill. & Del.). Dennis. Földrajzi elterjedését tekintve megtalálható minden olyan országban, amely a mérsékelt égövben helyezkedik el. Vagyis elmondható, hogy ahol természetnek birset, ott a kórokozó is jelen van.

A gomba komoly gondokat okoz az üzemi birs ültetvényekben szerte a világon. **Batra (1991)** szerint ez a birs legveszélyesebb betegsége. Fertőzése következtében a hajtások, a levelek, a virágok és a fiatal, kötődött gyümölcsök is elpusztulhatnak. Bizonyos években járványosan lép fel és súlyos fertőzés esetén akár a teljes termésmennyiséget is elpusztíthatja.

A régebbi hazai és külföldi szakirodalmakban elsősorban a gomba morfológiai tulajdonságairól és a növényi részeken okozott tünetekről olvashatunk, azonban a tenyészbélyegeket például, már nem jellemezték. Az újabb külföldi szakirodalmakat áttekintve, spanyol kutatók foglalkoztak részletesebben a birs monilíniás betegségét okozó *Monilinia linhartiana*-val. Tőlük származik az egyetlen leírás a gomba tenyészetéről, valamint újabb adatokat közöltek a kórokozó biológiájával kapcsolatban.

Molekuláris vizsgálatokat is csak a spanyol kutatók végeztek a kórokozó kapcsán. A nemzetközi adatbázisban mindösszesen két *M. linhartiana* izolátum szekvencia részlete található meg az ITS (Internal Transcribed Spacer) régióból, melyet **Moral és munkatársai (2011)** töltöttek fel. Más régió nukleotid sorrendje nem ismert.

Bár a *Monilinia linhartiana* kártétele és tünetei már régóta ismertek Magyarországon, azonban vizsgálatokat már évtizedek óta nem végeztek a kórokozóval kapcsolatban. A szakkönyvek említik ugyan a birsben jelentkező betegséget, de a kórokozó biológiájáról, a növényvédő szerek hatékonyságáról nem találunk hazai adatokat.

Vizsgálataink eredményeivel szeretnénk hozzájárulni a kórokozó hazai populációjának jellemzéséhez és a gyakorlatban is alkalmazható, hatékony növényvédelmi technológia optimalizálásához.

Mindezek alapján dolgozatomban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- *Monilinia linhartiana* kórokozóval fertőzött hajtások és levelek gyűjtése birsről;
- A kórokozó konídiumos alakjának morfológiai vizsgálata;
- A kórokozó izolálása és tenyészbélyegeinek jellemzése különböző táptalajokon;
- Az izolált kórokozó megbetegítő képességének bizonyítása;
- Az ITS régió és a β -tubulin gén molekuláris vizsgálata;
- Fungicidek hatékonyságának *in vitro* vizsgálata.

2. Irodalmi áttekintés

A *Monilinia* fajok világszerte, de főleg a mérsékelt égöv régióiban jelentős károkat okoznak a gyümölcsstermesztőknek (**Byrde és Willems, 1977**). A fajok gazdanövényköre széles, elsősorban a *Rosaceae* család tagjait betegítik meg (**Wormald, 1954**). Az idegen nyelvű szakirodalmak a *Monilinia* fajok által okozott betegségeket leggyakrabban a gyümölcs barna rothadásaként (brown rot) említik (**Croxall és mtsai., 1951; Wormald, 1954; Byrde és Willems, 1977;**), utalva ezzel a betegség által okozott legjellegzetesebb tünetre.

2.1. A *Monilinia* fajok rendszertani besorolása

A *Monilinia* fajok rendszertanilag a tömlősgombák (*Ascomycota*) törzsébe, a *Pezizomycotina* altörzsbe, azon belül a tányérgombák (*Discomycetes*) osztályába, a *Sclerotiniaceae* családba és a *Monilinia* nemzetségbe tartoznak (**Honey, 1928; Anonymus, 2013**). A nemzetség a nyakláncszerűen képződő konídiumláncokról (latinul: monile = nyaklánc) kapta a nevét (**Wormald, 1954**).

A *Monilinia* nemzetségen belül két alcsoport különíthető el: *Junctoriae* és *Disjunctoriae* (**Honey, 1936; Batra, 1991**). A szerzők a fajokra jellemző konídiumláncok alapján választották szét a két csoportot. A *Disjunctoriae* alcsoportban a konídiumok között a láncban apró diszjunktörök találhatók, míg ezek a *Junctoriae* alcsoport tagjainál nem képződnek.

2.2. A birset megbetegítő *Monilinia* fajok

Birsen számos *Monilinia* faj kártételét figyelték meg az évtizedek során, azonban a *Monilinia linhartiana* okozta megbetegedésről viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre (**Hrustić és mtsai., 2012**). **Batra (1991)** szerint a *M. linhartiana* a birs legveszélyesebb kórokozója. Két esetben közöltek *Monilinia laxa* okozta megbetegedést fiatal birstermésen, először 1924-ben, majd 1925-ben East Mallingban (**Wormald, 1954; van Leeuwen, 2000**). Ausztráliában **Harrison (1928)** a *Monilinia fructicola* által károsított birsterméseket jegyezte fel. Azokon a gyümölcsökön figyelte meg a legsúlyosabb kártételt, amelyeket valamilyen mechanikai sérülés ért, vagy az almamoly lárvája károsította őket. Az Egyesült Államokban **Fischer (1930)** is leírta ezt a kórokozót a gyümölcsökről.

Glits (2000) megállapítása szerint ezen a gazdanövényen, két faj okozhat jelentős károkat a *M. fructigena* és a *M. linhartiana*. **Wormald (1954)** szerint Európa szerte gyakori a

M. fructigena okozta rothadás az érett terméseken. A gomba könnyen felismerhető a koncentrikusan elhelyezkedő, sárga színű exogén sztrómáiról (**Glits, 2000**). A *M. linhartiana* okozta betegséget is a XIX. század végén írták le először, viszont a kórokozó elnevezése körüli félreértés következtében nehéz meghatározni, hogy pontosan melyik is volt az első alkalom, amikor ténylegesen a *M. linhartiana* okozta betegséget írták le.

2.3. A *Monilinia linhartiana* rendszertani besorolása és elnevezése

A *Monilinia* fajok nevezéktana sokat változott a kórokozók első leírása óta. Számos szinonim névvel találkozhatunk a régebbi szakirodalmakban. A birs monilíniás betegségét okozó *M. linhartiana* kapcsán is több ellentmondással találkozhatunk. A taxonómusok napjainkban már nemcsak a morfológiai tulajdonságok alapján különítik el a fajokat, hanem molekuláris módszerekkel is vizsgálják a rokonsági viszonyokat. A jelenlegi, hivatalos elnevezésekről legegyszerűbben internetes adatbázisokban tájékozódhatunk, mint például az Index Fungorum (www.indexfungorum.org), a MycoBank (International Mycological Association Fungal Databases Nomenclature and Species Banks: www.mycobank.org) vagy az USDA (United States Department of Agriculture) adatbázisa (www.nt.ars-grin.gov/fungalatabases/index.cfm).

A birs monilíniás betegségét okozó gomba legitim neve *Monilinia linhartiana* (Prill. & Delacr.) Dennis (**Farr és Rossmann, 2013**). A kórokozót ezen a néven **Dennis (1956)** nevezte el elsőként. A további (szinonim) elnevezései a következők: *Peziza linhartiana* (Prill & Del.), *Ciboria (Stromatinia) linhartiana* (Prill. & Del.), *Sclerotinia linhartiana* (Prill & Del.), *Sclerotinia cydoniae* (Schellenberg), *Monilinia cydoniae* (Schellenberg) (**Buchwald, 1987; Farr és Rossmann, 2013**).

A *Monilinia linhartiana* kórokozó ivartalan alakja a *Monilia cydoniae* (Schellenb.) (**Berkhout, 1923; Farr és Rossmann, 2013**). Egyes szerzők (**Pieper, 1912; Prillieux, 1982; Prillieux és Delacroix, 1893; Glits, 2000; Kövics, 2000; Dimitrova és Gyosheva, 2010; Nevado és mtsai., 2011**) *Monilia linhartiana* (Sacc.) néven említik az ivartalan alakot. Többek között **Batra (1991)** is felhívja rá a figyelmet, hogy ez az elnevezés téves, mert a *Monilia linhartiana* nem a *Monilinia linhartiana* ivartalan alakja, hanem a *Monilinia padi* (Woronin) kórokozóé, amely a csonthéjasokon okoz megbetegedést. A *Monilia linhartiana* név Saccardotól ered, ő nevezte el a kórokozót Linhart Györgyről, annak a tiszteletére, hogy ő találta meg a betegséget *Prunus padus* fajon (**Wormald, 1926**). 1899-ben **Shellenberg (1899)** birszen írta le ezt a kórokozót. **Prillieux és Delacroix, 1893**-ban találtak egy aszkuszos alakot, amelyről azt feltételezték, hogy a *Monilia linhartiana* ivaros alakja, ezért *Monilinia*

linhartiana-nak nevezték el. Később Woronin 1895-ben mutatta ki, hogy *Monilia linhartiana* a *Monilinia padi* ivartalan alakja (**Woronin, 1895**). A hasonló elnevezés és a két kórokozó közeli rokonságából adódó nagyfokú morfológiai hasonlóság (**Schellenberg, 1899**) azóta is számos félreértés alapjául szolgál.

2.4. A *Monilinia linhartiana* jelentősége és elterjedése

A *M. linhartiana* először Franciaországban idézett elő súlyos károkat *Cydonia oblonga* fajon (**Prillieux és Delacroix, 1893**). A leírását követően számos feljegyzés bizonyította, hogy a betegség nemcsak a nyugat-európai régiókban található meg, hanem a déli-, és a közép-európai termesztő vidékeken is (**Glits, 2000**). Kártételének mértékét azonban nehéz megbecsülni, mert a betegség tünetei összetéveszthetők az ervíniás hajtáselhalással, a fagykárrel, a fiziológiai okok miatt bekövetkező gyümölcshullással vagy a *Botryosphaeria obtusa* (Schwein) Shoemaker okozta feketerothadással (**Moral és mtsai., 2007; Cabello, 2008**).

Batra (1991) szerint a birsen a kórokozók közül a legsúlyosabb károkat a *M. linhartiana* okozza. **Moral és mtsai. (2008)** is a birs veszélyes betegségeként említik. Több spanyol szerző is beszámol róla, hogy súlyosabb fertőzés fellépése esetén, akár az összes termést is elpusztíthatja (**Moral és mtsai., 2008; Nevado és mtsai., 2011**). 2006-ban egy spanyol ültetvény hajtásainak 91,5%-a fertőződött (**Moral és mtsai., 2011**). **Nevado és mtsai. (2011)** szerint súlyos fertőzés esetén akár a virágok 95%-is fertőződhet. A birset megbetegítő *Monilinia* fajok (*M. linhartiana*, *M. fructigena*) következtében 50-90%-os termés kiesés is jelentkezhet a kezeletlen ültetvényekben (**Garic és mtsai., 1990**).

Európában az északi országok kivételével szinte az összes országból leírták a kórokozót. A magyarországi ültetvényekben az 1930-as években jelent meg először (**Glits, 2000**). Jelen van továbbá Bulgáriában (**Naidenov, 1922; Ivanov, 1928**), Cipruson (**Georghiou és Papadopoulos, 1957**), az Egyesült Királyságban (**Cannon és mtsai., 1985**), Franciaországban (**Prillieux és Delacroix, 1893**), Görögországban (**Pantidou, 1973**), Hollandiában (**Berkhout, 1923**), Németországban (**Schellenberg, 1899**), Olaszországban (**Tomaz és Costa, 1980**), Portugáliában (**Tomaz és Costa, 1980**), Spanyolországban (**Moral és mtsai., 2011**), Svájcban (**Osterwalder, 1917; Rüegg és Siegfried, 1993**) és Szerbiában is (**Balaž, 2000**).

Európán kívül is komoly gondokat okoz Törökországban (**Altinyay, 1975**) és a volt Szovjetunió területén (**Tafradzhiiski és Angelov, 1977**). Azerbajdzsánból (**Ibragimov és**

Abbasov, 1976), Ukrajna, valamint Örményország egyes területekről is leírták már a kórokozót (**Bessey, 1905**).

Elmondható tehát, hogy ahol természetnek birset, ott a *Monilinia linhartiana* is megtalálható és kémiai növényvédelem nélkül, vagy nem megfelelő növényvédelem esetén bizonyos években súlyos veszteségeket okozhat.

2.5. A *Monilinia linhartiana* gazdanövényei

Gazdanövények tekintetében a birs moniliniás betegségét okozó *Monilinia linhartiana* specifikusan a *Cydonia oblonga* Mill. fajt fertőzi (**Glits, 2000**). **Gäumann (1928)** is kizárólag a birsalmát említi a kórokozó egyetlen gazdanövényeként.

Más források szerint, viszont nem csak birsben jelenhet meg ez a kórokozó, bár a kórokozó elnevezése körüli bizonytalanságok miatt előfordulhat, hogy valójában nem a *Monilinia linhartiana* okozta tüneteket jegyezték fel a szerzők. **Szabó (2012)** a zselnicemeggy (*Prunus padus* L.) levelein, hajtásain és termésein figyelt meg barna elhalást, majd azon szürkés penészbefonatot, melyet a birs moniliniás megbetegedését is okozó gombának tulajdonított. **Berkhout (1923)** Hollandiában birs mellett naspolyán (*Mespilus germanica* L.) is megfigyelte a *M. linhartiana* kártételét, bár a fajt csak a konídiumok mérete alapján azonosította. Ezzel szemben **Schellenberg (1899)** szerint, aki a naspolya, zselnicemeggy és a birs moniliniás betegségeit vizsgálta, a három növényfajon három különböző *Monilinia* faj károsít: a *M. mespili* Whetzel naspolyán, a *M. padi* zselnicemeggyen és a *M. linhartiana* birsben. Tanulmányában (**Schellenberg, 1923**) részletesen kifejti a fajok közti biológiai és morfológiai különbségeket. Megfigyelései szerint a *M. linhartiana* és a *M. mespili* igen közeli rokonságban állnak, de a konídiumok méretében jelentős különbség figyelhető meg, ez alapján azonosíthatóak a fajok (**Wormald, 1926**). **Masse (1915)** a szelídgesztenyén (*Castanea sativa*, Mill.) írta le a *Stromatinia linhartiana* (= *Monilinia linhartiana*) kórokozót, amely a leveleken okozott súlyos tüneteket.

2.6. A *Monilinia linhartiana* által okozott tünetek

A kórokozó a virágokat, a leveleket, a hajtásokat és a fiatal gyümölcsöket betegíti meg (**Batra, 1991**).

A leveleken a tünet gyakran már a virágzás előtt megjelenik (**Hrustić és mtsai., 2012**). A fiatal levelek alapjától kiinduló ék alakú elhalás figyelhető meg (**Nevado és mtsai., 2011**). A levélnyélen és a főér melletti területeken jelenik meg kezdetben a tünet, majd a vastagabb erek mentén terjed tovább (**Sumstine, 1913**). A szerző szerint a levélszövet

elbarnul, rajta gyér szürkésfehér bevonat, konídiumláncok jelennek meg (**1., 2. ábra**). Később az egész levéllemezt beborító, összefüggő bevonatot képeznek a konídiumláncok (**Wormald, 1926**).



1. ábra. *Monilia linhartiana* okozta tünetek birsen Bulgáriában
(Fotó: Svetoslav Bobev, 2009)



2. ábra. A *Monilia linhartiana* szürke konídiumláncai fertőzött birslevélen, Bulgáriában
(Fotó: Svetoslav Bobev, 2009)

A beteg levelek végül teljesen elszáradnak és gyakran a vegetáció végéig a fán maradnak (**Glits, 2000**). A kifejlődött levelek kevésbé érzékenyek a betegségre, csak ritkán fertőződnek (**Moral és mtsai., 2011**). A megbetegített levelek gyakran birsvirágra emlékeztető illatot bocsájtanak ki, ezzel csalogatva a konídiumokat terjesztő rovarokat

(Schellenberg, 1923). Ezt a jelenséget Woronin (1880) figyelte meg először a rokon *Monilinia urnula* (Weinm.) Whetzel faj esetében.

A hajtásokon vörösbarna elhalás és 3—7 mm nagyságú repedések figyelhetők meg (Batra, 1991). A szerző szerint a fertőzött hajtásokon 5—20 mm-rel a virág alatt található levelek barnán elhalnak (3. ábra). A fertőzött hajtásokon Moral és mtsai. (2011) konídium képződést figyelték meg, míg Batra (1991) szerint itt nem képződnek konídiumok.



3. ábra. A *Monilinia linhartiana* okozta hajtáselhalás Bulgáriában
(Fotó: Svetoslav Bobev, 2009)

Batra (1991) szerint a fertőzött virágrészek elbarnulnak, míg Glits és Folk (2000) szerint a virágokon nem látható tünet. A megfertőződött virágok is képesek kötődni és megindul a termésfejlődés, de a fiatal 5—10 mm átmérőt elért gyümölcs megáll a növekedésben és elszárad (Nyéki, 2004). A terméskezdemények megpuhulnak, majd kiszáradnak (Batra, 1991). Rajtuk konídiumok nem képződnek (Moral és mtsai., 2011). A gyümölcsök összeaszalódnak, gyümölcsmúmiák alakulnak ki, amelyek hónapokon át a fán maradnak (Balaž, 2000).

2.7. A *Monilinia linhartiana* biológiája

Az áttelelt gyümölcsmúmiákon (álszkleróciumokon) tavasszal tölcser alakú apotéciumok képződnek (Batra, 1991). Hazánkban az apotéciumok képződését nem bizonyították (Glits 2000), viszont Spanyolországban Moral és mtsai. (2011) adatai alapján

rendszeresen megjelennek. Véleményük szerint a nagy számban képződő apotéciumok (ültetvényekben: 5, 3—28, 7 db/m²) arra utalnak, hogy a kórokozónak szüksége van az ivaros fázisra, ahhoz hogy be tudja fejezni életciklusát (**Moral és mtsai, 2011**). Egyes szerzők (**Altinyay, 1972; Glits, 2000**) a fertőzött fás részekben micéliummal történő áttelelést is lehetségesnek tartják. Ebben az esetben tavasszal a beteg részeken újonnan képződő konídiumok indítják a fertőzést.

Az irodalmi adatok alapján a kórokozó fertőzésének két periódusa különíthető el (**Moral és mtsai., 2011**). Az első ciklusban az aszkospórák fertőzik a leveleket, levél- és hajtáselhalást idézve elő. Az aszkospórák csak rövid ideig képesek fertőzni, mert csak a fiatal növényi szövetekbe tudnak behatolni. Kiszóródásuknak a 10°C feletti hőmérséklet és csapadékos időjárás kedvez (**Glits, 2000**). A fertőzött leveleken konídiumok képződnek, melyek másodlagos inokulumként a virágokat és a fiatal terméseket fertőzik (**Moral és mtsai., 2011**). A kórokozó a porzókon (**Wormald, 1926; Nevado és mtsai., 2011**) vagy a termőkön keresztül (**Batra, 1991**) fertőzi meg a virágokat. Más *Monilinia* fajoktól eltérően a *M. linhartiana* konídiumai nem képesek több cikluson keresztül fertőzni, mert a fiatal gyümölcsökön nem képződnek konídiumok (**Moral és mtsai., 2011**).

2.8. A *Monilinia linhartiana* morfológiai jellemzése

A *Monilinia* fajok tölcser alakú apotéciumokat képeznek (**4. ábra**). A *M. linhartiana* termőteste szürkés-, vagy sötétbarna színűek, gyakran lilás árnyalatúak (**Batra, 1991**). Az apotéciumok 2-5-ös csoportokban jelennek meg az álszkeróciók felszínén (**Prilleux és Delacroic, 1893**). **Moral és mtsai. (2011)** ennél is több (2-12 db) halványbarna apotécium képződését figyelték meg az áttelelő gyümölcsmúmiákon az ültetvényekben. Az apotéciumok tölcserére 5-10 mm átmérőjű, a nyél 1 mm hosszúságú (**Batra, 1991**). **Moral és mtsai. (2011)** szerint a kifejtett apotéciumok tölcserjének átmérője $30,6 \pm 9,4$ mm volt. Az aszkuszban mindig páros számú aszkospóra képződik, amelyek egysejtűek, hialinok és oválisak (**Glits, 2000**). Az aszkospórák átlagos mérete **Moral és mtsai. (2011)** szerint $10,1 \times 5,6$ µm.

A fertőzött növényi részekben képződő konídiumok méretét számos alkalommal vizsgálták. A szerzők szerint a konídiumok egysejtűek, sima falúak, citrom alakúak és hialinok (**Batra, 1991; Moral és mtsai., 2011**). Méretük az egyes szerzők szerint: $10-12 \times 12-18$ µm (**Sumstine, 1913**), $11,0 \times 7,83$ µm (**Berkhout, 1923**), $11-12 \times 10-11$ µm (**Wormald, 1926**), $9-14 \times 10-21$ µm (**Csorba és Berend, 1965; Batra, 1991**), $10,5 \times 13,1$ µm (**Altinyay, 1972**), $12-18 \times 8-15$ µm (**Bánhegyi és mtsai., 1985**), $6,4-17,2 \times 5,1-13,6$ µm (**Moral és mtsai., 2011**) között változik.



4. ábra *Monilinia* sp. tölcsér alakú apotéciuma

(Forrás: <http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1492007>)

2.9. A *Monilinia linhartiana* tenyészbélyegeinek jellemzői

A *M. linhartiana* tenyésztésére és izolálására leggyakrabban PDA táptalajt használnak (**Batra, 1991**). **Moral és mtsai. (2011)** többféle táptalajon vizsgálták a kórokozó tenyésztetőségét. Megállapításuk szerint sokféle táptalajon tenyésztethető a kórokozó, de a burgonyakivonatot tartalmazó táptalajokon növekszik leggyorsabban. A szerzők jellemzése alapján a kórokozó 10 napos tiszta tenyészete PDA táptalajon fehér alapszínű, a leoltási pont körül szürke. Tenyészetek széle ép, felszínük bolyhos. A tenyészetekben — más *Monilinia* fajokkal ellentétben — makrokonídium képződést nem tapasztaltak, csak mikrokonídiumok fejlődtek valamennyi vizsgált táptalaj esetében.

2.10. A *Monilinia linhartiana* azonosítása molekuláris biológiai módszerekkel

A kutatási módszerek fejlődésével a morfológiai és tenyészbélyegeikkel történő meghatározás mellett egyre elterjedtebbé vált a kórokozók molekuláris biológiai azonosítása. Az azonosítása során a fonalas gombáknál leggyakrabban a riboszómális RNS-eket kódoló rész ITS (Internal Transcribed Spacer) régióját vizsgálják (**White és mtsai., 1990**). A régió alapján a *Monilinia* fajok pontos meghatározása mellett, a rokonsági viszonyokra és a *Sclerotiniaceae* család evolúciójára is következtethetünk (**Carbone és Kohn, 1993**). Az ITS régió az ITS1 és ITS2 nem kódoló szakaszokból és a köztük elhelyezkedő 5,8S riboszómális génből állnak. A régiót a sejtmagi riboszómális gén kis (18S) és nagy (28S) alegysége határolja (**Holst-Jensen és mtsai., 1997**). Az ITS1 régió nagyobb változékonyságot mutat, mint az ITS2 (**Moral és mtsai., 2011**).

Carbone és Kohn (1993) a *Sclerotiniaceae* család, köztük négy *Monilinia* faj ITS régióját vizsgálta. Ők különítették el elsőként a *Juntoriae* és *Disjuntoriae* alcsaládokat a

fajok bázissorrendje alapján. **Holst-Jensen és mtsai. (1997)** szintén az ITS régió alapján megállapították, hogy a *Disjunctoriae* alcsalád fjai és gazdanövényük között párhuzam figyelhető meg az evolúciós fejlődés tekintetében. Az alcsalád fjai négy jól elkülöníthető növényi csoport tagjait képesek megfertőzni: a galagonyát, a *Rosaceae* család száraz terméssel rendelkező fajait, az *Ericaceae* család toktermésű fajait és szintén ennek a családnak a bogyós termésű fajait. A *Monilinia* fajok ITS régiójának vizsgált szakasza 447 és 452 bázispár között változott (**Holst-Jensen és mtsai., 1997**), amely a *Sclerotiniaceae* család többi fajához képest kis változékonyságot mutat (**Carbone és Kohn, 1993**). A fajon belüli változékonyság is alacsony, 2% alatti, míg más fajok esetében ez akár az 5%-ot is elérheti (**Baura és mtsai., 1992; Zambino és Szabo, 1993**).

Moral és mtsai. (2011) *Monilinia linhartiana* izolátumok ITS régiójának vizsgálata során megállapították, hogy a kórokozó a szekvencia adatok alapján is a *Disjunctoriae* csoportba tartozik. A legközelebbi rokonságot a *M. amelanchieris* és a *M. mali* fajokkal mutatta, melyek *Rosaceae* családba tartozó fajokat betegítenek meg. A *M. linhartiana* a *M. amelanchieris* fajtól mindösszesen 1 bázispárban különbözött a vizsgált szakaszon. Véleményük szerint a **Holst-Jensen és mtsai. (1997)** által *M. johnsonii*-ként meghatározott izolátum más fajhoz tartozik, mert ez nem áll rokonságban a *M. linhartiana* izolátumokkal. **Holst-Jensen és mtsai. (1997)** csak tenyészbélyegek alapján határozták meg az izolátumot és feltevésük szerint igen közeli rokonságot kellene mutatnia a *M. linhartiana* fajjal, ezt azonban *M. linhartiana* izolátum hiányában bizonyítani nem tudták. Ezen elv alapján a galagonya gazdanövényt fertőző csoport megszűnik és a fajok három csoportba sorolhatók a gazdanövény alapján.

Moral és mtsai. (2011) vizsgálatai szerint a *M. linhartiana* faj ITS régiója 480 bp hosszúságú. A *M. linhartiana* faj izolátumai között csak minimális változékonyságot találtak, mindösszesen egy izolátumuk különbözött egyetlen bázispárban. Ebben az izolátumban a 122-es pozícióban megjelent egy timin, amely a többi izolátumból hiányzott. Véleményük szerint ez a változékonyság az ivaros szakaszban bekövetkező rekombináció következménye.

2.11. A *Monilinia linhartiana* elleni kémiai növényvédelem lehetőségei

A virágzáskori kémiai védekezés több szerző szerint is elengedhetetlen. **Glits (2000)** négy kezelést tart szükségesnek a hajtásnövekedés megindulásától a gyümölcsnövekedés kezdetéig tartó időszakban. **Nyéki (2004)** három kezelést javasol: virágzás kezdetekor, a fővirágzásban és a virágzás végén. **Tafradzhiiski és Angelov (1977, 1979)** a három kezelést a bimbók színeződésekor, a virágzás kezdetén és fővirágzáskor javasolja.

Campbell és Madden (1990) szerint a többi monociklikus fertőzési módú kórokozóhoz hasonlóan az elsődleges fertőzést, azaz az aszkospórák behatolását kell megakadályozni. **Moral és mtsai. (2011)** részletesen vizsgálták a kórfolyamatot és véleményük szerint sem a virágfertőzés elleni védekezés a legmegfelelőbb. A szerzők szerint a levelek aszkospórás fertőződését kell megakadályozni, ezzel elkerülhető a virágokat fertőző konídiumok képződése.

Radman (1970) 0,25 %-os orthocid és 0,2 %-os rézoxiklorid keverék hatékonyságát vizsgálta. Megfigyelései szerint a virágzás kezdetétől 8-10 naponként négyszeri kezelés nem bizonyult megfelelő hatékonyságúnak. Sokkal jobb eredményt értek el amennyiben, a védekezést rügypattanástól kezdték el. **Tafradzhiiski és Angelov (1977, 1979)** a fundazol hatóanyagot javasolják, akár három egymás utáni kezelésben is. **Altinyay (1975)** a thiram és a kaptán hatóanyagokat találta hatékonynak. **Popescu (2011)** kísérlete során a virágzás előtti 1%-os rezes kezelés, valamint a virágzás alatti 0,3 %-os cineb és virágzás után 0,03%-os miklobutanil hatóanyaggal történő permetezés csökkentette a fertőzés gyakoriságát és mértékét.

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgálat helye és ideje

A birs monilíniás betegségével kapcsolatos vizsgálatainkat 2013-ban, a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük.

3.2. A vizsgálat anyaga

3.2.1. Az izolátumok jellemzése

A birs monilíniás betegségének tipikus tüneteit mutató hajtások két helyszínről származtak: Siófokról egy nagyüzemi termő ültetvényből, valamint Harkányból egy felhagyott szórvány gyümölcsösből (**1. táblázat**).

1. táblázat

Az izolátumok neve, a gazdanövény, a gyűjtés helyszíne és ideje

Izolátum neve	Gazdanövény	Gyűjtés helyszíne	Gyűjtés ideje
MLH1	<i>Cydonia oblonga</i>	Siófok	2013.05.09.
MLH3	<i>Cydonia oblonga</i>	Harkány	2013.05.01.

A siófoki ültetvényben az állomány körülbelül 10 éves, már néhány éve termőre fordult. A fák jó kondíciójúak, azonban meglehetősen kicsi tőtávolsággal telepítették őket, így az ültetvény nagyon sűrű. A fák ágai szinte teljesen záródó lombfalat alkotva összeérnek a nem megfelelő metszés miatt. A terület nem szellőzik megfelelően, párás, amely kedvez a kórokozók felszaporodásának. A növényvédelmi kezelések rendszeresek. Kifejezetten a monilíniás betegségek ellen is végeznek kémiai védekezést, hiszen a kórokozó minden évben károsít.

Az MLH3-as mintát évfolyamtársam, Oláh Richárd gyűjtötte Harkányban egy felhagyott szórvány gyümölcsösben. A területen elszórtan 12-15 idősebb birsfa található, melyek egymástól nagy távolságra helyezkednek el. A területen semmiféle növényvédelmi kezelést nem végeznek.

3.2.2. Táptalajok

Moral és mtsai. (2011) módszerét követve a kórokozót burgonya-dextróz agar (potato dextrose agar, PDA) táptalajon izoláltuk. A tenyészbélyegeket burgonya-dextróz agaron, maláta kivonat agaron (malt extract agar, MEA) és Leonian maláta agaron (LMA) jellemeztük. A gomba izolátumait a patogenitási teszthez, a molekuláris azonosításhoz és a fungicidekkel végzett hatásvizsgálatokhoz PDA táptalajon tartottuk fenn.

- PDA táptalaj (BioLab): 39 g PDA, 1000 ml végtérfogatra desztillált vízzel kiegészítve.
- LMA táptalaj: 1 g KH_2PO_4 , 1 g MgSO_4 , 10 g szacharóz, 5 g pepton, 15 g porított agar, 10 g maláta kivonat, 1000 ml végtérfogatra desztillált vízzel kiegészítve.
- MEA táptalaj (BioLab): 25 g MEA, 1000 ml végtérfogatra desztillált vízzel kiegészítve.

3.2.3. Eszközök

Az általános laboratóriumi fém-, műanyag- és üvegeszközök mellett a minták izolálása és a gomba konídiumainak vizsgálata során Leica MZ6 típusú sztereómikroszkópot és Nikon Eclipse 50i típusú citoplaszt mikroszkópot használtunk. A mikroszkópi fényképek QImaging MicroPublisher 5.0 RTV típusú kamerával készültek. A polimeráz láncreakció (PCR) izolátumaink molekuláris vizsgálata során Applied Biosystems 9700 típusú PCR készülékben ment végbe. A PCR termék tisztítás utáni koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométer segítségével mértem meg.

3.2.4. Növényvédő szerek

A növényvédő szerek hatékonyságával kapcsolatos vizsgálatainkhoz az almatermésűek és csonthéjasok monilíniás betegségei ellen használható, Magyarországon engedéllyel rendelkező készítményeket választottunk ki **(2. táblázat)**.

3.2.5. Primerek

Az izolátumok molekuláris jellemzése során az örökítőanyag két szakaszát vizsgáltuk. A kórokozó molekuláris azonosítását az ITS (Internal transcribed spacer) régió alapján végeztük, amely egyaránt alkalmas a fajok elkülönítésére, valamint a rokonsági viszonyok feltérképezésére **(Baura és mtsai., 1992; Holst-Jensen és mtsai., 1997)**. Az ITS5-NL4 primerpár a kórokozók 18S rRNS génjének 3' végét, az ITS1 régiót, az 5,8 S rRNS gént,

az ITS2 régiót és a 28S rRNS kódoló rész egy részét sokszorozzák meg, kiemelve egy körülbelül. 1200 bp hosszúságú fragmentumot **(White és mtsai., 1990).**

2. táblázat

A hatásvizsgálat során tesztelt fungicidek neve, hatóanyaga, gyártója és forgalmi kategóriája **(Ocskó és mtsai., 2011)**

Növényvédő szer	Hatóanyag	Gyártó	Forgalmi kategória	Gyakorlati dózis
Antracol 70 WG	70% propineb	Bayer	II.	1, 66 g/l
Captan 50 WP	50% kaptán	Arysta Mo. Kft.	I.	2, 12 g/l
Chorus 50 WG	500 g/kg ciprodinil	Syngenta	III.	0, 40 g/l
Cuproxat FW	350 g/l tribázikusrézszulfát	NuFarm	III.	5, 00 ml/l
Dithane-M45	80 g/kg mankoceb	Indofil Ch.	II.	0, 20 g/l
Flint Max	500 g/kg tebukonazol + 250 g/kg trifloxistrobin	Bayer	I.	0, 18 g/l
Folicur Solo	250 g/l tebukonazol	Bayer	II.	1, 20 ml/l
Funguran-OH 50 WP	77% rézhidroxid	Spiess-Urania	III.	2, 66 g/l
Mirage 45 EC	450 g/l prokloráz	Makhteshim	II.	5, 00 ml/l
Nordox 75 WG	86% réz(I)oxid	Nordox	III.	1, 73 g/l
Orius 20 EW	200 g/l tebukonazol	Makhteshim	II.	0, 84 ml/l
Pluto 50 WP Rézoxiklorid	86% rézoxiklorid	Agri-Estella	III.	2, 00 g/l
Quadris	250 g/l azoxistrobin	Syngenta	III.	0, 82 ml/l
Roval Aquaflow	500 g/l iprodion	BASF	I.	0, 30 ml/l
Systhane Duplo	450 g/l miklobutanil	Dow AgroSciecnas	II.	1, 00 ml/l
Teldor 500 SC	500g/l fenhexamid	Bayer	III.	0, 50 ml/l
Topas 100 EC	10% penkonazol	Syngenta	III.	0, 83 g/l
Topsin-M 70 WDG	70% tiofanát metil	Nippon Soda	III.	0, 15 g/l
Zato 50 WG	50% trifloxistrobin	Bayer	II.	1, 00 ml/l

Vizsgálatainkhoz egy másik régiót is választottunk: a benzimidazol rezisztencia és a rokonsági viszonyok kapcsán napjainkban gyakran vizsgált β -tubulin gént. A BT2a- BT2b primerpár egy kb. 400 bp hosszúságú szakaszt emel ki a béta alegységből (**Glass és Donaldson, 1995**), míg a BTMon primerpár egy hosszabb, 1500 bp feletti szakaszt jelöl ki szintén a β -tubulin génből (**Hu és mtsai., 2011**).

ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

Bt2a: 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'

Bt2b: 5'-ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC-3'

BTMon_For: 5'-ATGCGTGAGATTGTACGTAT-3',

BTMon_Rev: 5'-GTACCAATGCAAGAAAGCCT-3',

3.2.6. Vegyszerek

A polimeráz láncreakció során Taq polimeráz enzimet (5 unit/ μ l) és annak pufferét, 10x-es Taq puffer+KCl-MgCl₂ (pH: 8,8 25 °C-on) használtuk fel, melyet a Fermentas cégtől szereztünk be. A PCR-terméket High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche) tisztítottuk.

3.3. A vizsgálat módszere

3.3.1. A kórokozó izolálása és fenntartása

A kórokozó izolálásához tüneteket mutató, fertőzött hajtásokat gyűjtöttünk. A mintákat papírzacskóba helyeztük, majd a vizsgálat megkezdéséig a laboratóriumban, hűtőszekrényben, 4 °C-on tároltuk. Sztereomikroszkóp alá helyezve a fertőzött leveleket, jól látszott a konídiumláncok szürkés színű bevonata a levelek színén, melyekről steril lándzsátű segítségével konídiumokat oltottunk le PDA táptalajra.

A Petri-csészéket 24 °C-on, sötétben inkubáltuk, majd körülbelül egy hét elteltével tiszta tenyészeteket készítettünk. A tenyészetek széléből dugófúró segítségével 5 milliméter átmérőjű táptalaj korongokat vágunk ki, amelyet a kórokozó micéliuma átszőtt. A tiszta tenyészeteket ismét 24 °C-on, sötétben inkubáltuk, mindaddig, amíg a gomba tenyésze be nem nőtte teljesen a Petri-csészét. Ekkor a tenyészeteket a hűtőszekrénybe helyeztük át, ahol

4 °C-on tároltuk őket. Az izolátumokat 6-8 hetente átoltottuk, így biztosítva a tenyészetek fennmaradását.

3.3.2. A morfológiai- és tenyészbélyegek értékelése

A kórokozó morfológiai bélyegeinek értékelése során a fertőzött növényi részről kaparékot készítve vizsgáltuk a birshajtásokon képződő konídiumláncok morfológiáját, a konídiumok színét, alakját és méretét. A konídiumok hosszúságát és szélességét Q-Capture Pro program segítségével mértük meg.

A tenyészbélyegek vizsgálata során feljegyeztük a tenyészet alakját, színét, mintázatát, a tenyészet szélének morfológiáját, a képződött légmicéliumot, továbbá, hogy a tenyészet felületén megjelentek-e szaporító képletek. A tenyészetek növekedési erélyét mm/nap-ban fejeztük ki.

3.3.3. Patogenitási teszt

A kórokozó izolálása után elvégeztük a kórokozó megbetegítő képességének igazolását a Koch-féle posztulátumok szerint (**Koch, 1876**), melynek értelmében a táptalajon izolált kórokozónak, képesnek kell lennie újra megfertőzni a kórokozóra fogékony gazdaszervezetet, kiváltva újra a kórokozó által okozott, jellemző tüneteket. A patogenitás bizonyításának utolsó lépéseként a kórokozónak újra izolálhatónak kell lennie az inokulált gazdanövényből és az eredeti tenyészbélyegeket kell mutatnia.

A patogenitási teszt során *Cydonia oblonga* hajtásait és fiatal terméseit használtuk fel. Fiatal leveleket és a még nem fásodott hajtásokat a Budai Arborétumban, 2013. május 23-án gyűjtöttünk. A növényi részeket 1 percre 70%-os etanolba mártva fertőtlenítettük, majd steril desztillált vizes öblítést követően lamináris fülkében megszáritottuk.

Mindkét izolátummal 4-4 db növényi részt fertőztünk meg, melyeken steril bontótűvel V alakú sebzést ejtettünk, majd a növekvő tiszta tenyészet széléből származó, micéliummal átszőtt táptalajkorongokat helyeztünk a levélnyélre és a levél főerére, a hajtástengelyre és a fiatal termésekre (**5. ábra**). A kontroll steril PDA korongokkal inokuláltuk. A mesterségesen fertőzött és a kontroll növényi részeket nedves kamrában, szobahőmérsékleten (23-26 °C-on) természetes fényviszonyok mellett inkubáltuk. Steril csíráztató edény aljába üveggolyókra helyeztük a növényi részeket, melyek alá steril desztillált vizet öntöttünk. A patogenitási teszt eredményét 2 hét és 4 hét elteltével értékeltük.



5. ábra. MLH3 izolátummal inokulált fiatal birtermések a nedves kamrában
(Fotó: Papp Ágnes, 2013)

3.3.4. Az ITS régió és a β -tubulin gén molekuláris biológiai vizsgálata

A *M. linhartiana* molekuláris vizsgálatához CTAB módszerrel vontuk ki a kórokozó örökítőanyagát, majd a polimeráz láncreakció során amplifikált szakaszok szekvenciájának alapján vizsgáltuk a rokonsági viszonyokat.

3.3.4.1. Össznukleinsav kivonása módosított CTAB módszerrel

Az DNS kinyeréséhez növekvő tiszta tenyészetből, a lamináris fülkében, steril dugófúró segítségével, micéliummal átszőtt PDA táptalajból 2 db 5 milliméter átmérőjű korongot emeltünk ki, majd eltávolítva a táptalajt, steril dörzsmozsárba helyeztünk. Kvarchomok és 600 μ l CTAB puffer hozzáadása mellett eldörzsöltük a gomba micéliumát, feltárva a sejtfalakat. Majd a dörzsmozsár tartalmát 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe pipettáztuk át. Állandó 65 °C-os hőmérsékleten, 45 percen keresztül inkubáltuk a csöveket. A szennyeződések és fehérjék eltávolítására fenol-kloroformos extrakciót végeztünk. Első lépésben 300 μ l fenolt és 300 μ l (24:1 arányú) kloroform-izoamilalkoholos elegyet adtuk a vizes fázishoz, és vortexelést követően 10 percen keresztül centrifugáltuk szobahőmérsékleten. A felső, vizes fázist átpipettáztuk tiszta csövekbe, majd 500 μ l kloroform-izoamilalkohol elegyet adtunk hozzá. Vortexelés után a csöveket újabb 10 percig centrifugáltuk. Majd 600 μ l izopropanol hozzáadásával kicsaptuk, majd centrifugálással ülepitettük a nukleinsavakat. A pelletet 70%-os etanollal mostuk, majd vákuumszáritóban beszáritottuk. Az össznukleinsavat 50 μ l 10 μ g/ml RNase-t tartalmazó TE-oldatban oldottuk

vissza (**Maniatis és mtsai., 1989**). Az izolátumok DNS-ét a továbbiakban -20 °C-os hőmérsékleten tároltuk.

3.3.4.2. Polimeráz-láncreakció (PCR) vizsgálat

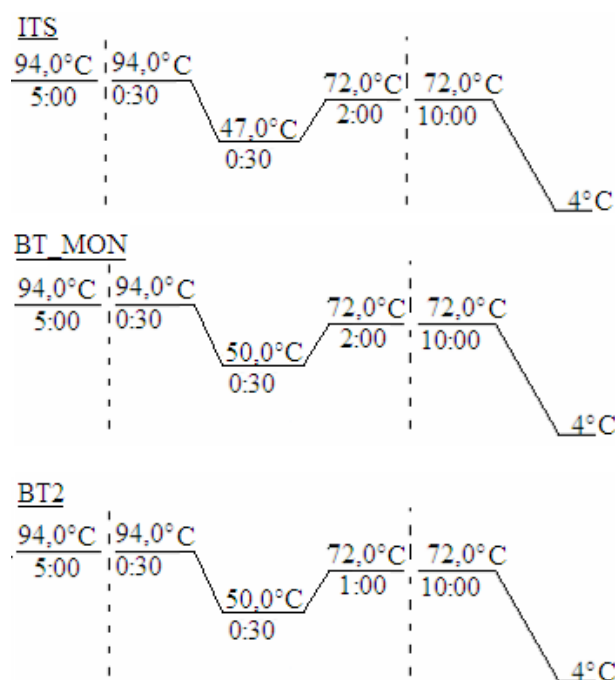
A gomba genomjából polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk a különböző fragmentumokat.

A reakciókban felhasznált elegy végtérfogata 50 µl, a következő összetételben:

- 3 µl DNS (~0,6 µg)
- 5 µl puffer (+KCl, -MgCl₂)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2 µl 5mM-os dNTPs (nukleotidok: A, G, C, T)
- 1 µl forward primer (20pmol/µl)
- 1 µl reverse primer (20pmol/µl)
- 0,5 µl Taq polimeráz enzim (5u/µl)
- 34,5 µl steril víz

Az elsődleges denaturálás (94 °C, 5 perc) során a DNS szálát összekötő hidrogénkötések felbomlanak, a kettős hélix szerkezet megszűnik, a DNS két szála elválik egymástól. A ciklusok során a denaturáció, az annealáció (a primerek kötődése) és az elongáció (láncszababbítás) 35x ismétlődik. Az annealáció hőmérsékletét az irodalmi adatok és az indítószekvenciák olvadáspontja alapján, a láncszababbítás időtartamát pedig az amplifikálandó szakasz hosszúsága alapján határoztuk meg az egyes reakcióknál (**6. ábra**). A folyamat zárásaként az elongációs szakasszal megegyező hőmérsékleten (72 °C-on, 10 perc) fejezi be az enzim az elmaradt szálakat felépítését.

A PCR terméket, a reakciót követően 1%-os GelRed-et tartalmazó agaróz gélben futtattuk. Tisztítását High Pure PCR Product Purification Kit-tel végeztük, a gyártó utasításait követve. A tisztított PCR termék koncentrációját spektrofotométer segítségével mértük meg. A PCR terméket 50 ng/µl koncentráció felett direkt szekvencia meghatározásra küldtük a szegedi BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiail Intézetbe.



6. ábra. A PCR protokoll az egyes indítószekvenciák esetén

3.3.4.3 A vizsgált régiók elemzése a nukleotid sorrend alapján és a rokonsági viszonyok megállapítása

A szekvencia meghatározását az ABI 3500 (Applied Biosystems) típusú szekvenáló automatával végezték, a szakaszok bázissorrendjét a forward és reverse primerek segítségével mindkét irányból leolvasták.

A szekvenciákat a CLC Sequence Viewer 6.5.3. szoftversegítségével illesztettük össze, a filogenetikai törzsfák (UPGMA módszer) megrajzolását és a megbízhatóság becslésére szolgáló bootstrap analízist szintén ezzel a programmal végeztük.

Saját izolátumaink szekvenciáját az NCBI nemzetközi adatbázisban található, alábbi szekvenciákkal hasonlítottuk össze:

M. amelanchieris: **Z73769**;

M. aucupariae: **Z73771**;

M. azeleae: **AB182266**;

M. fructicola: **AY283676, AY283677, AY283678, AY283679, AY283680,**

HM051382.1, HM051383, HQ709265, HQ908769, HQ908789;

M. fructigena: **EF207429, HQ166375, HQ908771**;

M. jezoensis: **AB182265**;

M. laxa: **AY349149, EF153015, HQ846952, HQ908772.1;**

M. linhartiana: **HM581953, HM581954.1;**

M. mali: **AB125619;**

M. mumecola: **HQ908774, HQ908775;**

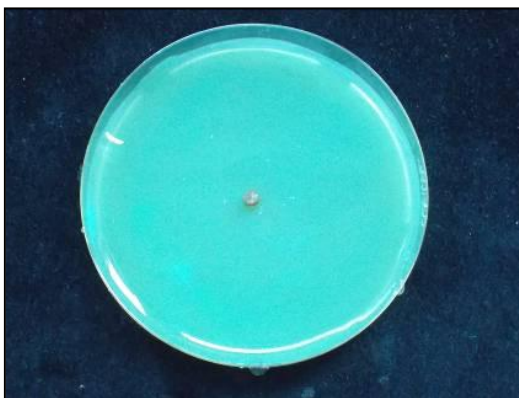
M. padi: **Z73791.1;**

M. polystroma: **JF820317;**

M. yunnanensis: **HQ908773.**

3.3.5. Növényvédő szerekkel végzett *in vitro* hatásvizsgálat a *M. linhartiana* micéliumának növekedésére

A hatásvizsgálat során a növényvédő szerek gyakorlatban használt dózisát (**2. táblázat**), valamint annak a tízszeres hígítását teszteltük a *M. linhartiana* micéliumának növekedésére mérgezett agarlemez módszerrel. A növényvédő szereket steril, kézmelegre hűtött PDA táptalajhoz kevertük, a kétféle dózisban, a lamináris fülkében. A táptalaj megszilárdulását követően, a tiszta tenyészetből, steril dugófúróval öt milliméter átmérőjű, a kórokozó micéliumával átszőtt korongot helyeztünk a táptalaj közepére (**7. ábra**). A kezeletlen kontroll esetében, fungicidet nem tartalmazó PDA táptalajra helyeztük a kórokozó micéliumát. Mindkét izolátum esetében, növényvédő szerenként és koncentrációnként 2-2 ismétlést végeztünk. A tenyészeteket 24 °C-on, sötétben inkubáltuk. A hatásvizsgálat eredményét akkor értékeltük, amikor a kontroll Petri-csészében lévő táptalajt teljesen benőtte a gomba micéliuma. Az értékelés során a mérgezett agarlemez felületén növekvő tenyészetet két egymásra merőleges átmérő mentén mértük meg. A kapott eredmények átlagából kiszámítottuk az izolátumok kontrollhoz viszonyított növekedését.



7. ábra. A mérgezett agarlemez módszer, a növényvédő szerekkel végzett hatásvizsgálathoz (Fotó: Papp Ágnes, 2013)

4. Eredmények

4.1. A birs monilíniás betegségének tünetei

A siófoki és a harkányi birsfákon 2013 májusában hajtáselhalást figyeltünk meg. A levelek a levélnyélétől kiindulva a főér, illetve a nagyobb erek mentén barnultak. Az erek közötti levélszövet – gyakran ék alakban – megbarnult, majd az egész levéllemez fokozatosan elhalt (**8. ábra**). Bizonyos esetekben a teljes hajtás elhalását is megfigyeltük.

A virágokon semmiféle tünet nem jelent meg, ami a kórokozó fertőzésére utalt volna.



8. ábra. *Monilinia linhartiana* okozta tünetek birs levelein Siófokon (balra) és Harkányon (jobbra) (Fotó: Lantos Anna, 2013)

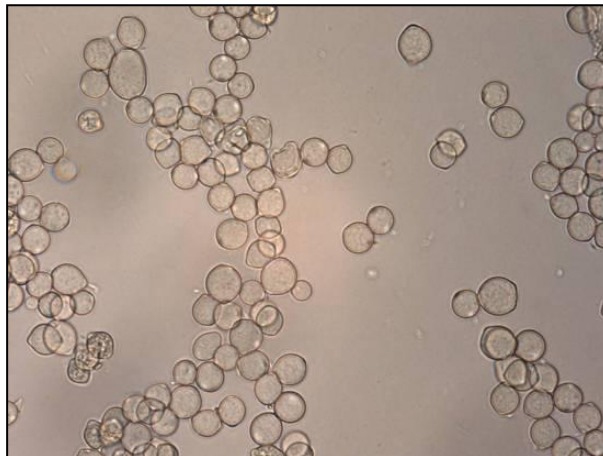
A fertőzött levelek felületén, a levél nyelétől kiinduló, az erek mentén végigfutó világosszürke színű bevonat alakult ki (**9. ábra**). Az egész levéllemezre kiterjedő összefüggő bevonatot nem figyeltünk meg.

4.2. A *Monilinia linhartiana* morfológiai bélyegei

Mikroszkóppal vizsgálva a leveleken jelentkező szürkés bevonatot, *Monilinia* nemzetség *Disjunctoriae* alcsoportjára jellemző konídiumláncokat figyeltünk meg. A makrokonídiumok között diszjunktórok képződtek. A konídiumok hialinok (nagy tömegben halványszürke színűek), egysejtűek, ellipszis illetve citrom alakúak voltak (**10. ábra**).



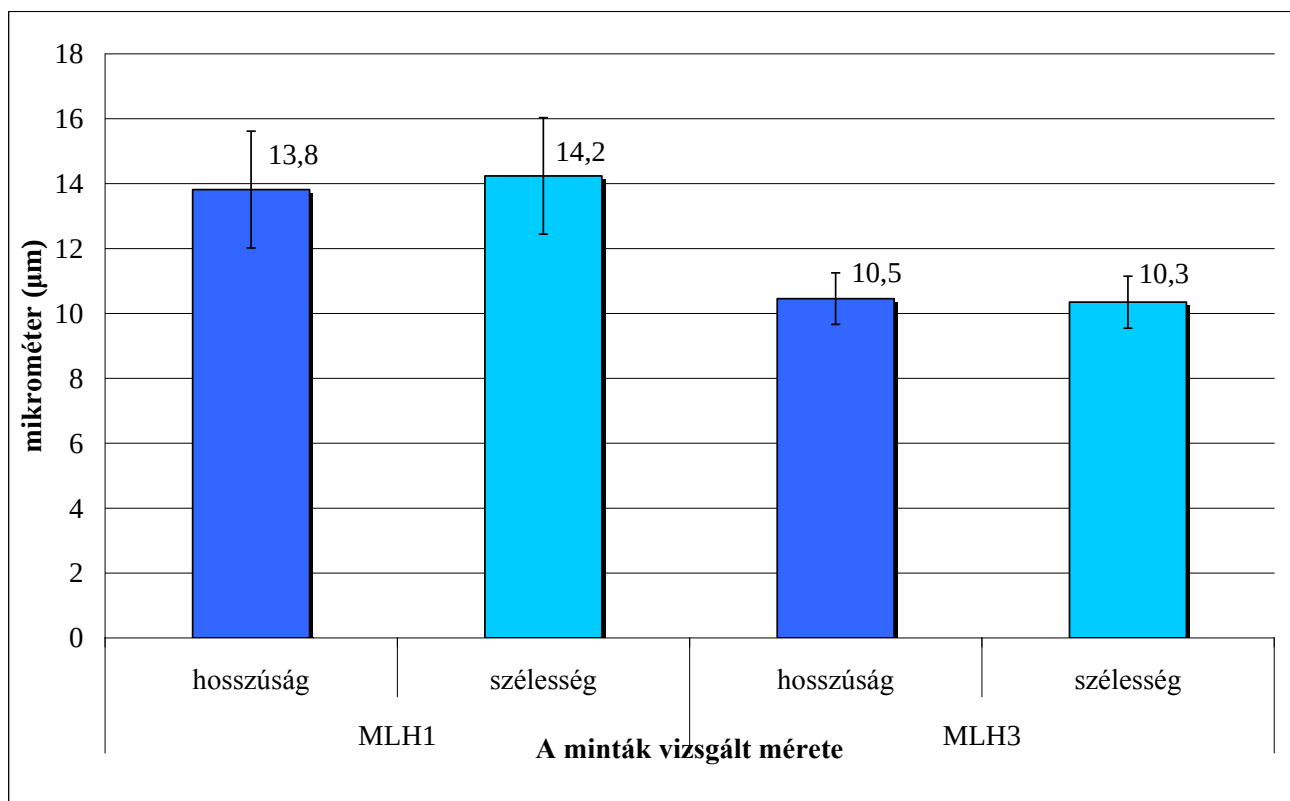
9. ábra. Konídiumláncok alkotta szürke bevonat birs levélen a harkányi felhagyott gyümölcsösben (Fotó: Oláh Richárd, 2013)



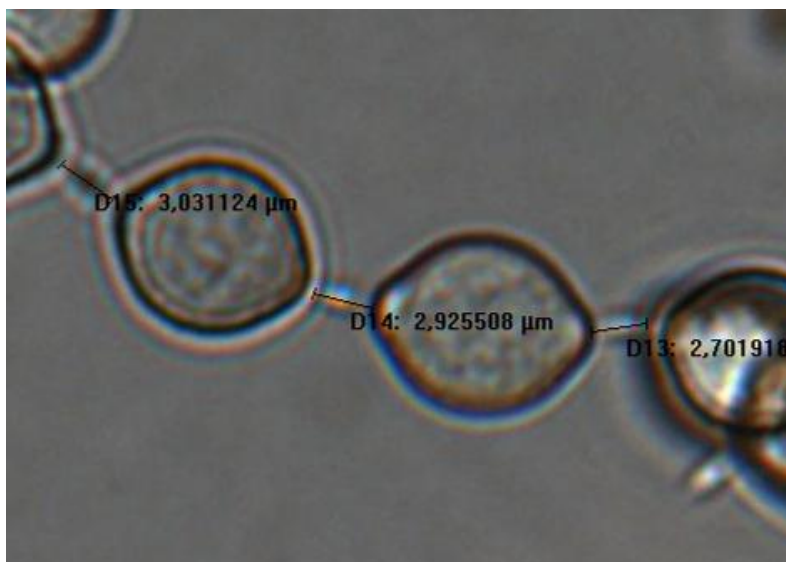
10. ábra. A *M. linhartiana* konídiumai 600x-os nagyításban (Fotó: Lantos Anna, 2013)

Száz-száz konídium vizsgálata után az MLH1-es izolátum konídium méreteinek átlagos és szélső értékei: $(6, 2-) 13,8 (- 26, 5) \times (7, 2 -) 14,2 (- 23, 0) \mu\text{m}$ között változtak, míg az MLH3-as izolátum konídiumai $(6, 2-) 10,5 (-14, 0) \times (6, 5-) 10,3 (-14, 0) \mu\text{m}$ méretűek voltak (**11. ábra**).

A diszjunktórok átlagosan $2,5 \mu\text{m}$ (MLH1-es izolátum), illetve $2,8 \mu\text{m}$ (MLH3-as izolátum) hosszúságúak (**12. ábra**).



11. ábra. Az MLH1 és MLH3 izolátum konídiumainak átlagos méretei, szórással



12. ábra. A *M. linhartiana* konídiumlánc diszjunktorokkal
(Fotó: Papp Ágnes, 2013)

4.3. A *Monilinia linhartiana* tenyészbélyegei

Az egyes táptalajokon a *M. linhartiana* tenyészte más-más morfológiai bélyegekkal rendelkezett (13. ábra, 3. táblázat). A táptalajok közötti különbség a micélium növekedésének ütemében mutatkozott meg (3. táblázat). A gomba tenyészte valamennyi táptalajon sárgás alapszínű volt, eltérően az irodalmi adatoktól.

PDA táptalajon a kórokozó fiatal tenyészte szabálytalan alakú, vékony, táptalajból enyhén kiemelkedő. Az MLH1-es tenyészet széle enyhén csipkézett, míg az MLH3-as tenyészet széle majdnem épnek mondható. A tenyészetek alapszíne halványsárga/világosbarna, a leoltási ponttól kiinduló sötétebb barna foltokkal. Az idős tenyészetek sötét barnákká válnak. Az idős tenyészetekben fehér légmiciélium képződött a leoltási pont körül. A tenyészetben konídiumok nem képződtek (13. ábra). A gomba micéliuma ezen a táptalajon növekedett a leggyorsabban.

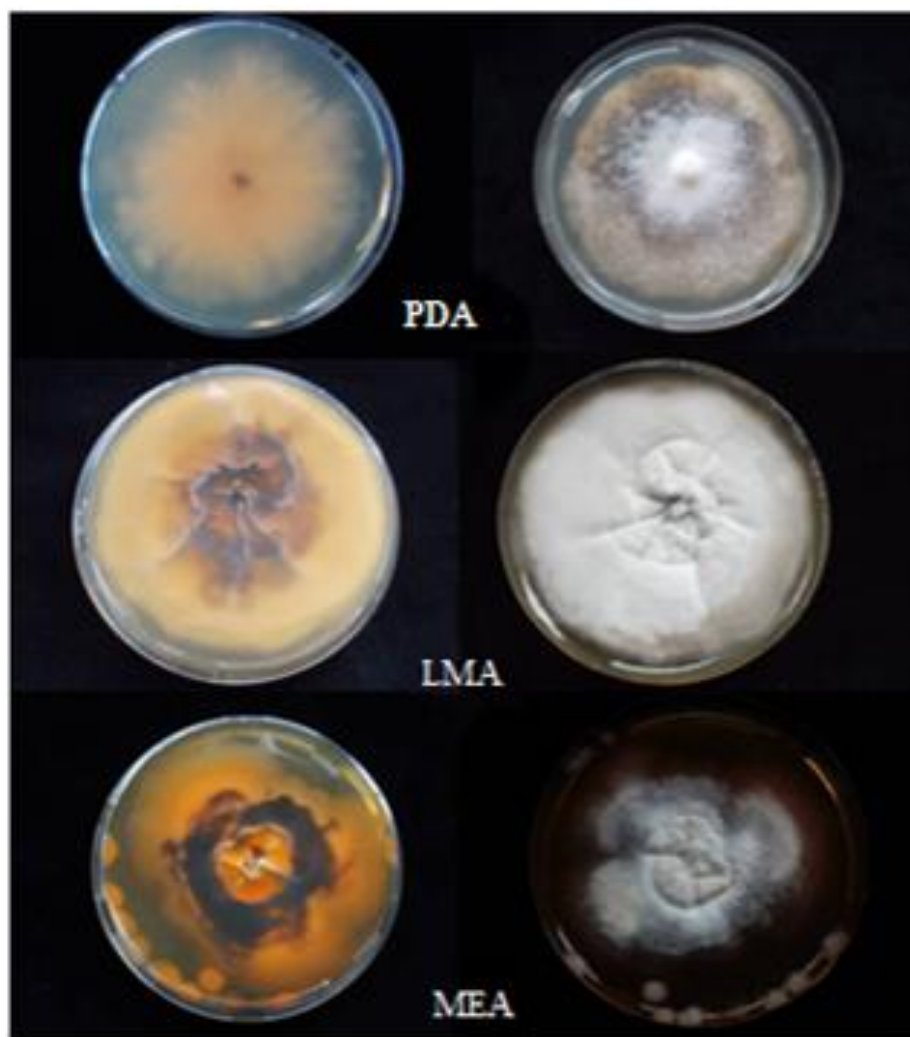
Leonian maláta agaron a gomba tenyészte krémsárga színű, a leoltási pont körül sötétebb barna színezettel. A tenyészetek ép szélűek, színükön fehér nemezes légmiciélium képződött (13. ábra, 3. táblázat).

Maláta kivonat agaron a tenyészet színe élénk narancssárga. A leoltási pont körül sötétbarna gyűrű jelent meg. A tenyészetben gyér légmiciélium képződést és mikrokonídium képződést figyeltem meg (13. ábra, 3. táblázat).

3. táblázat

A MLH1, MLH3 izolátumok tenyészbélyegei PDA, LMA és MEA táptalajon

Izolátum	Táptalaj típusa	Tenyészet alapszíne	Tenyészet mintázata	Tenyészet széle	Növekedési üteme (mm/nap)
MLH1	PDA	halványsárga, mogyoróbarna	sugaras elrendeződésű	enyhén csipkézett	5,6
	LMA	vajsárga	leoltási pontnál sötétebb	ép	3,7
	MEA	narancssárga	körkörös	ép	3,4
MLH3	PDA	halványsárga, enyhén barna	sugaras elrendeződésű	majdnem ép	5,0
	LMA	krémsárga	leoltási pontnál sötétebb	szabályos, ép	3,7
	MEA	narancssárga	körkörös	hullámos	3,4



13. ábra. Az MLH3-as izolátum tenyészbélyegei PDA, LMA, MEA táptalajon
(Fotó: Lantos Anna, Papp Ágnes, 2013)

4.4. Az izolátumok megbetegítő képességének igazolása

A kórokozóval inokulált birs leveleken a főér és a belőle elágazó vastagabb erek mentén nekrosis jelent meg, majd 3-4 hét elteltével levélnyéltől a levélcsúcs felé haladó elhalás alakult ki (**14. ábra**). Az erek közötti levéllemez megbarnult, azonban a főtűnet nem jelent meg a felületén. A steril PDA koronggal inokulált levelek az értékelés napjáig egészségesek maradtak.

A mesterségesen fertőzött hajtásokon barnás-, fekete szöveti elhalás lépett fel. Az inokulált fiatal terméseket felvágva, az epidermisztől a magház irányába a gyümölcshús sötétbarnás, vagy feketésbarnás elszíneződést mutatott. A magok is megfeketedtek, a magház körül fekete gyűrű alakult ki. A kontroll terméseken elváltozás nem jelentkezett.

Az inokulált növényi részekről sikerült a gombát újraizolálni, igazolva mindkét izolátum megbetegítő képességét.



14. ábra. Az MLH1-es izolátummal inokulált birs levél és fiatal termések (balra), valamint a kontrol levél és termések (jobbra) (Fotó: Papp Ágnes, 2013)

4.5. A *Monilinia linhartiana* azonosítása molekuláris biológiai módszerrel

A tünetek és morfológiai bélyegek értékelését követően az izolátumok molekuláris vizsgálata is igazolta, hogy mindkét esetben a *M. linhartiana* kórokozót izoláltuk az elhaló birshajtásokról.

Az ITS5 és NL4 primerekkel a polimeráz láncreakció során 1156 bp hosszúságú PCR terméket amplifikáltunk mindkét izolátumunkból, melyek szekvenciája a primerek közötti 1115 bp hosszúságú szakaszon teljesen megegyezett.

A β -tubulin gént vizsgálva BT2a-BT2b primerpár által kiemelt 425 bp hosszúságú szakasz bázissorrendje is teljesen megegyezik a MLH1 és MLH3 izolátumok tekintetében. A BTMon primerpárral a MLH3-as izolátumból 1603 bp hosszúságú PCR termék amplifikálódott (1563 bp + primerek hosszúsága). A *Monilinia linhartiana* kórokozó kapcsán ezek a legelső szekvencia adatok a kórokozó β -tubulin génjéről. Az izolátumaink (MLH1, MLH3) szekvenciáit elküldtük az NCBI nemzetközi adatbázisba.

4.5.1. *Monilinia* fajok összehasonlítása az ITS régió szekvencia részlete alapján

Izolátumaink szekvenciáit, az NCBI nemzetközi adatbázisában szereplő *Monilinia* fajok szekvenciáival hasonlítottuk össze, ahol mindösszesen két darab *M. linhartiana* szekvencia található (**Moral és mtsai., 2011**). Az MLH1 és MLH3 izolátumok szekvenciája 99% feletti homológiát mutatott a két spanyol izolátummal (**15. ábra**). A két izolátum egymástól egy timinben (T) különbözik a 122-es pozícióban. A mi izolátumainktól 4, illetve 5 bázisban térnek el.

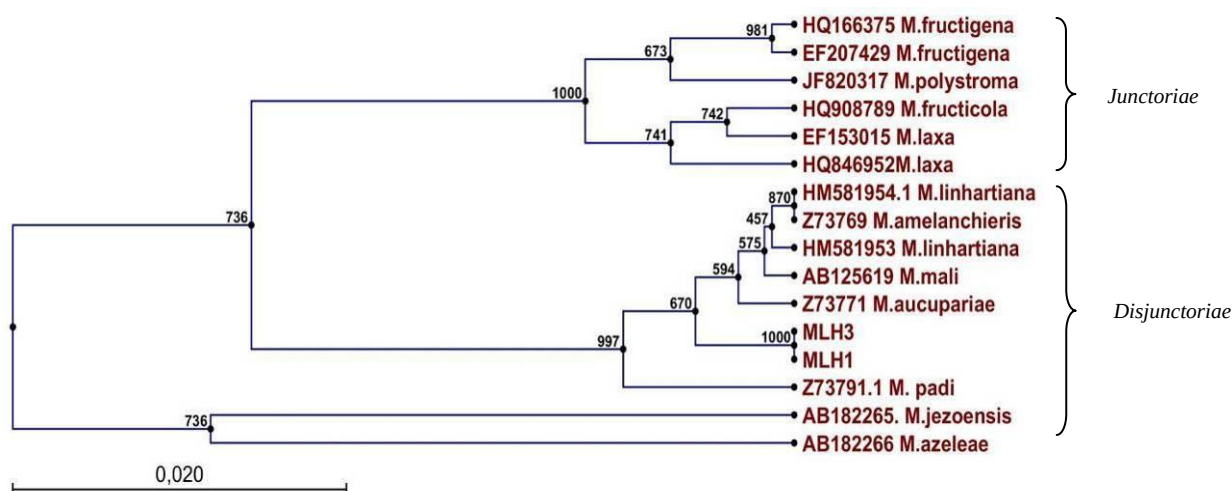


15. ábra. *Monilinia linhartiana* izolátumok ITS régiójának összehasonlítása

Az ITS régió alapján elemezve a rokonsági kapcsolatokat, bevontunk a vizsgálatba további *Monilinia* fajokat is, amelyeknek ITS régiójából szerepel szekvenciárészlet az adatbázisban. Egyedül a *M. johnsonii* faj Z73783 hivatkozási számmal ellátott izolátumát hagytuk ki az analízisből, mert **Moral és mtsai. (2011)** valószínűsítették, hogy ezt a fajt rosszul azonosították leírói.

Az adatbázisba elsősorban rövid szekvencia részleteket töltöttek fel az egyes *Monilinia* fajok ITS régiójából, így az izolátumokat csak 446 bp hosszúságú szakaszon tudtuk összehasonlítani. A filogenetikai törzsfán jól elkülönülnek a diszjunktorkal rendelkező fajok, a diszjunktorkkal nem rendelkezőktől (**16. ábra**). A *Junctoriae* csoport tagjai egy külön ágon helyezkednek el. A *Rosaceae* család fajait fertőző *Monilinia* fajok ITS régiója nagyfokú hasonlóságot mutat. A két magyar izolátum a törzsfán nem csak a spanyol *M. linhartiana* izolátumokkal mutatja a legnagyobb hasonlóságot (**16. ábra**), ez egyértelműen abból adódik, hogy az adatbázisban szereplő rövid szekvenciák miatt, csak az ITS régió egyharmada alapján tudtuk az összehasonlítást elvégezni. Ez a rövid szakasz pedig nem reprezentálja megfelelően a fajok közötti, amúgy is kicsiny eltéréseket.

Az ITS régió vizsgált szakasza alapján a *M. linhartiana* izolátumok legközelebbi rokonságban a *M. amelanchieris*, *M. mali*, *M. aucupariae* fajokkal állnak. Az *Ericaceae* családot fertőző fajok jól elkülönülő ágon helyezkednek el (**16. ábra**).



16. ábra. *Monilinia* fajok filogenetikai törzsfája az ITS szekvencia részlete alapján

Magyarázat a 16. ábrához: A vízszintes vonalak az *Monilinia* izolátumok filogenetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. A referencia izolátumokat azzal a hivatkozási kóddal (és mellette a kórokozó nevével) jelöltük, amely alapján megtalálhatók az adatbázisban.

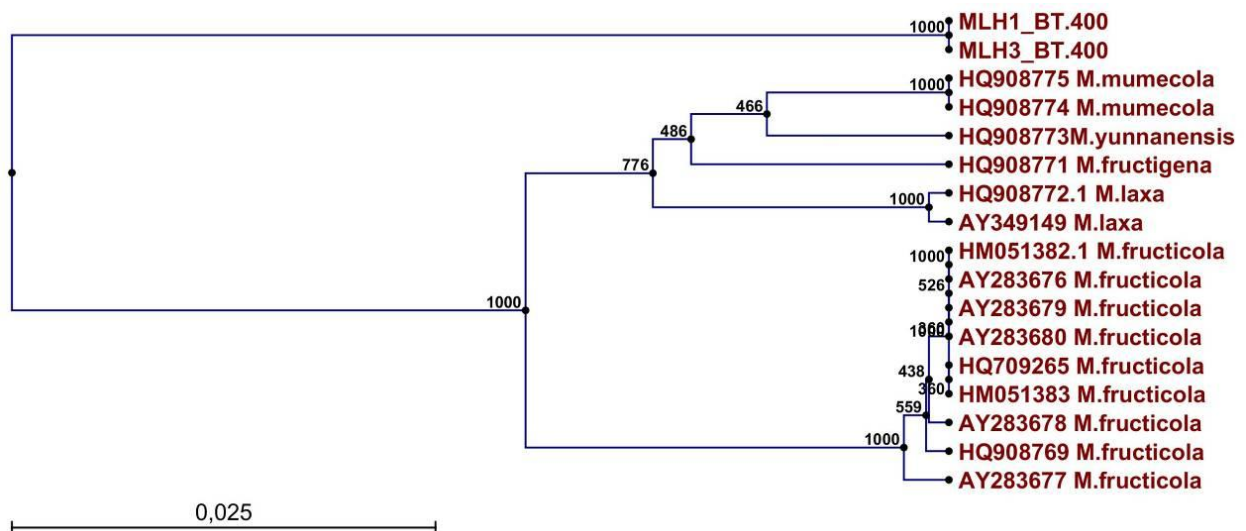
4.5.2. *Monilinia* fajok összehasonlítása a β -tubulin gén szekvencia részlete alapján

A β -tubulin gén összehasonlításánál az adatbázisban szereplő összes *Monilinia* fajt vizsgáltuk, amelyből elérhető szekvencia adatot találtunk a régió kapcsán. A *M. linhartiana* β -tubulin génjéről nem közöltek még nukleotid sorrendet.

A magyar izolátumok szekvenciáját összevetve az adatbázis szekvenciáival megállapítottuk, hogy más *Monilinia* izolátumok β -tubulin génjének szekvenciájával 98-99%-os homológiát mutatnak. A filogenetikai törzsfák kismértékben eltérő a rövidebb (425 bp) szakasz (**17. ábra**), illetve a hosszabb (1563 bp) szakasz (**18. ábra**) esetén.

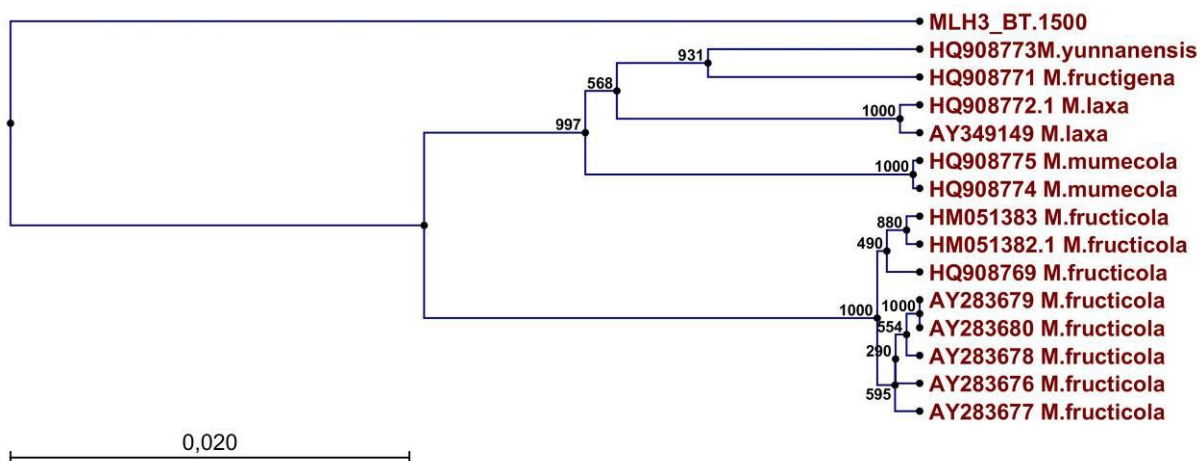
Mindkét esetben három nagyobb ág rajzolódik ki a törzsfákon. A *M. linhartiana* izolátumok elkülönülnek az összes többi *Monilinia* fajtól, valamint a *M. fruticola* faj izolátumai is elkülönült csoportban helyezkednek el (**17., 18. ábra**). A *M. laxa*, *M. mumecola*, *M. fructigena* és *M. yunnaensis* fajok rokonsági viszonyai a vizsgált szakasz méretének változásával kissé átrendeződnek, de minden esetben az egy fajhoz tartozó izolátumok mutatják a legnagyobb hasonlóságot egymással.

A hosszabb génrészlet vizsgálata során már megjelennek a diszjunktorkkal rendelkező és diszjunktorkkal nem rendelkező fajok közti különbségek. A *M. laxa* izolátumok a *M. fructigena* izolátummal mutatnak közelebbi rokonságot, míg a *M. mumecola* izolátumok a *M. yunnaensis* izolátummal **(18. ábra)**.



17. ábra. *Monilinia* fajok filogenetikai törzsfája a β -tubulin gén rövidebb (425 bp) részlete alapján

Magyarázat a 17. ábrához: A vízszintes vonalak az *Monilinia* izolátumok filogenetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. A referencia izolátumokat azzal a hivatkozási kóddal (és mellette a kórokozó nevével) jelöltük, amely alapján megtalálható az adatbázisban.



18. ábra. *Monilinia* fajok filogenetikai törzsfája a β -tubulin gén hosszabb (kb. 1500 bp) részlete alapján

Magyarázat a 18. ábrához: A vízszintes vonalak az *Monilinia* izolátumok filogenetikai távolságát mutatják a vizsgált szekvenciák alapján. A függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. A referencia izolátumokat azzal a hivatkozási kóddal (és mellette a kórokozó nevével) jelöltük, amely alapján megtalálható az adatbázisban.

4.6. A növényvédő szerekkel végzett *in vitro* hatásvizsgálatok

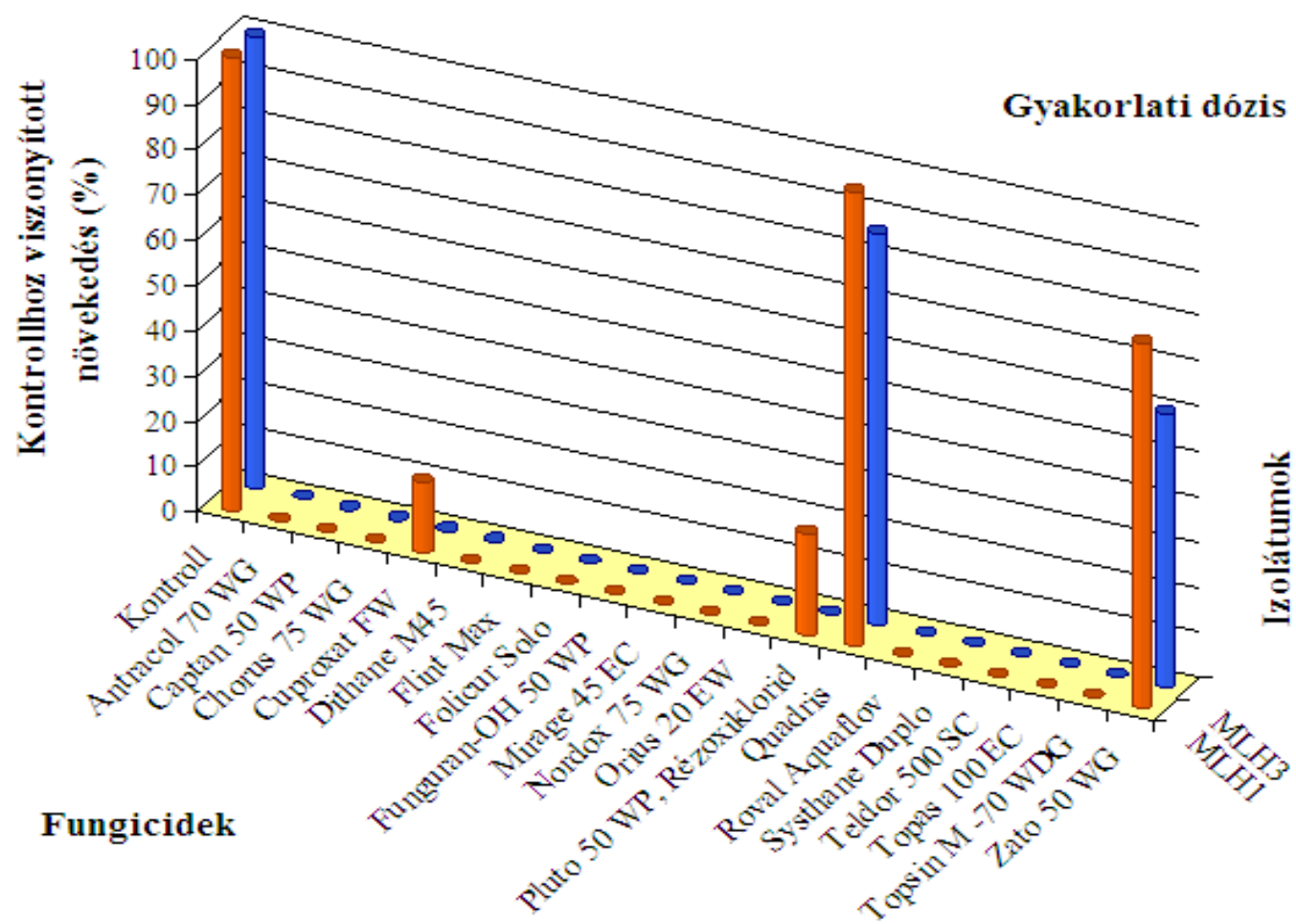
A mérgezett agarlemez módszer alkalmasnak bizonyult a növényvédő szerek hatékonyságának *in vitro* vizsgálatra.

A tesztelt tizenkilenc készítmény közül a tizenkettő (Antracol 70 WG, Captan 50 WP, Dithane-M45, Flint max, Folicur Solo, Mirage 45EC, Orius 20 EW, Systhane Duplo, Teldor 500 SC, Topas 100 EC, Topsin-M 70 WG) teljes mértékben gátolta a kórokozó micéliumának növekedését, mind gyakorlati dózisban, mind a gyakorlati dózis tízszeres hígításában (**18-20. ábra**).

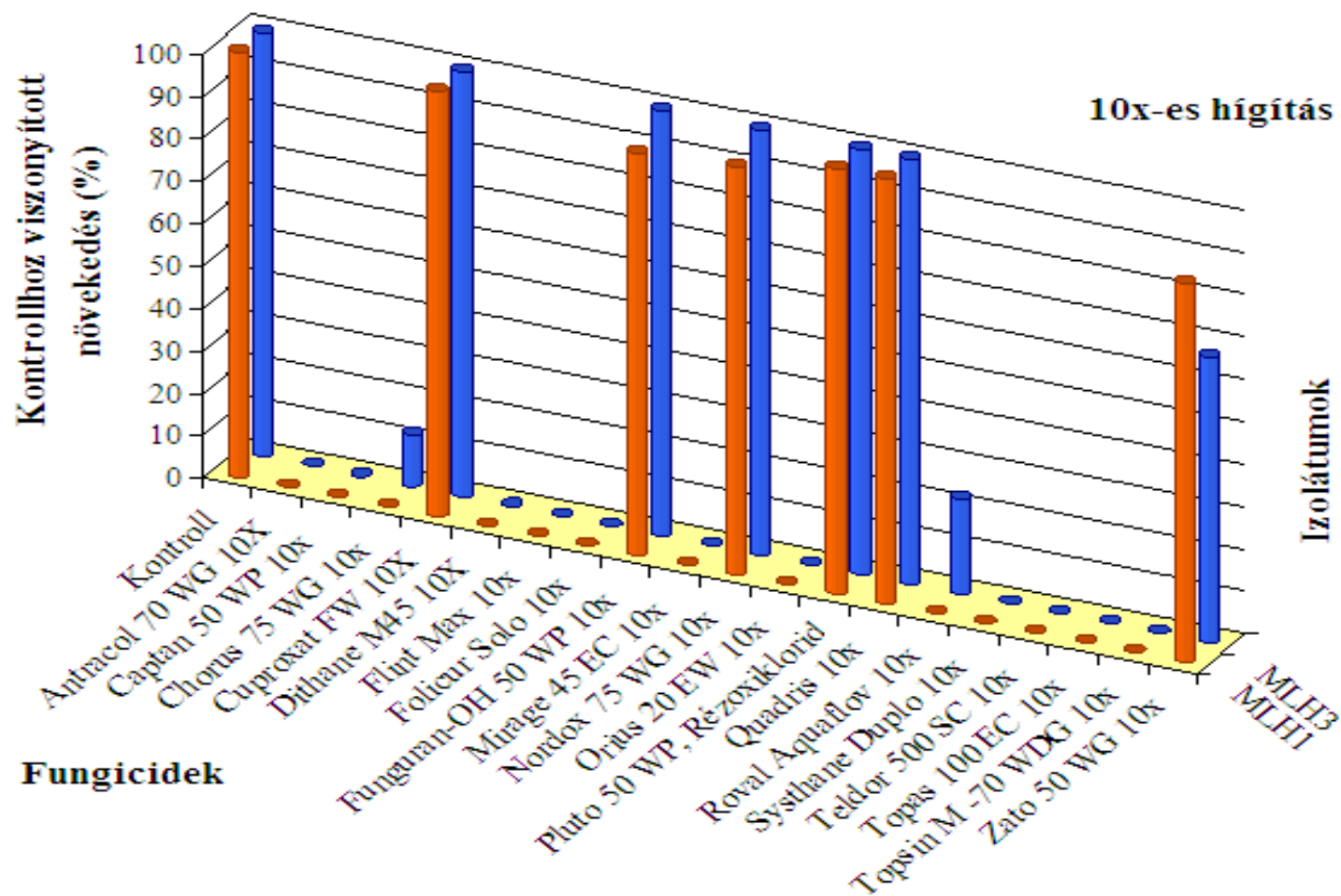
A készítmények gyakorlati dózisát vizsgálva mindkét izolátum esetében a Quadris és a Zato bizonyult a legkevésbé hatékonyak (**18. ábra**). A siófoki ültetvényből származó MLH1 izolátum növekedésnek indult a Cuproxat és a Pluto tartalmú mérgezett agarlemezekre, míg a kémiai növényvédelemben nem részesülő fákról származó MLH3-as izolátum egyáltalán nem fejlődött rajta (**18. ábra**). Az MLH3-as izolátum esetében a Roval

Aquaflow csak fungisztatikus hatással rendelkezett, igen alacsony mértékben (1%), így növekedni kezdett a gomba micéliuma a mérgezett agarlemezeken.

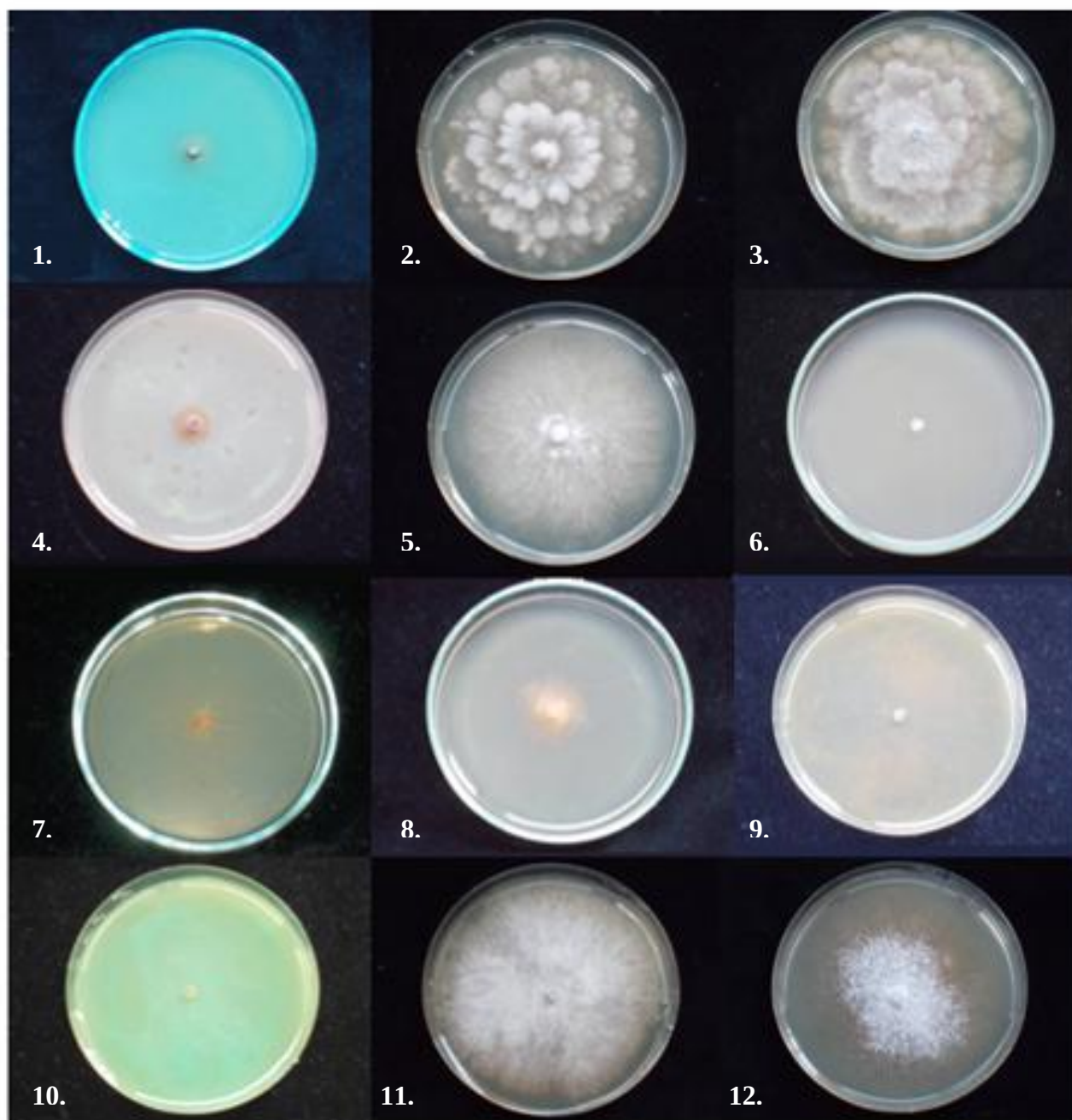
A gyakorlati dózis tízszeres hígításban több peszticid hatása is csökkent **(19. ábra)**. Az MLH1-es izolátum esetében a Cuproxat, a Pluto és Quadris tartalmú agarlemezeket a kontrollhoz hasonlóan csaknem teljesen benőtte a kórokozó **(20. ábra)**. A tenyészet átmérője a Zato használatakor 89%-os, a Funguran esetében 95%-os, a Nordoxnál 96%-os volt a kontrollhoz képest. Az MLH3-as izolátum esetében az alacsonyabb dózisban teljesen hatástalannak bizonyult a Cuproxat, a Funguran, a Nordox, a Pluto és a Quadris. A Zato esetében a micélium a táptalaj 67 %-át nőtte be. A Chorus használatakor 12%-os, és a Rovral Aquaflow alkalmazásakor 22%-os kontrollhoz viszonyított növekedést mértünk. Valamennyi réz hatóanyagú (rézszulfát, rézhidroxid, réz(I)oxid, rézoxiklorid) készítmény teljesen elvesztette hatékonyságát a gyakorlati dózis tízszeres hígításában **(19. ábra)**.



18. ábra. A fungicidek gyakorlatban alkalmazott dózisának *in vitro* hatékonysága az MLH1 és MLH3 izolátumok micéliumának növekedésére mérgezett agarlemezeken



19. ábra. A gyakorlati dózis 10x-es hígításának *in vitro* hatékonysága az MLH1 és MLH3 izolátumok micéliumának növekedésére mérgezett agarlemezekken



20. ábra. A növényvédő szerek hatása a *Monilinia linhartiana* izolátumok növekedésére
(Fotó: Papp Ágnes, 2013)

Magyarázat:

1. MLH3 izolátum_Cuproxat
2. MLH1 izolátum_Cuproxat 10x
3. MLH3 izolátum_Cuproxat 10x
4. MLH1 izolátum_Pluto
5. MLH1 izolátum_Pluto 10x
6. MLH1 izolátum_Orius

7. MLH3 izolátum_Rovral Aquaflov 10x
8. MLH3 izolátum_Rovral Aquaflov 10x
9. MLH3 izolátum_Nordox
10. MLH1 izolátum_Funguran
11. MLH3 izolátum_Funguran 10x
12. MLH1 izolátum_Zato

5. Eredmények megvitatása, következtetések

A birs levelein a levélnyéltől kiinduló, a főér, illetve a nagyobb erek mentén haladó barnulást tapasztaltunk, ahogy az **Sumstine (1913)** is leírja. Az erek közötti levélszövet gyakran ék alakban megbarnul, majd az egész levéllemez fokozatosan elhal. **Nevado és mtsai. (2011)** is hasonlóan jellemezte a *M. linhartiana* levélen okozott tüneteit. A virágokon a harkányi illetve a siófoki gyümölcsösben semmiféle tünetet nem figyeltünk meg, megegyezően **Glits (2000)** által leírtakkal, azonban **Batra (1991)** megfigyelt a betegség következtében elbarnult virágokat. Az általunk vizsgált leveleken a főéren és erek mentén végigfutó szürkés színű bevonat alakult ki. **Wormald (1926)** szerint a leveleken egybefüggő bevonat képződik, mi azonban ilyet nem tapasztaltunk.

A leveleken jelentkező szürkés bevonat nem más, mint a növény felületén megjelenő konídiumláncok tömege. A makrokonídiumok között **Batra-hoz (1991)** hasonlóan diszjunktórok képződését figyeltük meg, amely a *Monilinia* fajok *Disjunctriae* alcsoportjára jellemző. A gomba makrokonídiumai színüket tekintve hialinok, egysejtűek, ellipszis illetve citrom alakúak, megegyezően **Moral és mtsai. (2011)** adataival. Az általunk mért konídiumok hosszúságának és szélességének átlagos méretei és szélsőértékei egybe estek az irodalmi adatokban felsoroltakkal (**Csorba és Berend, 1965; Bánhegyi és mtsai., 1985**).

Két izolátumunk PDA táptalajon szabálytalan alakú, halványsárga/világosbarna alapszínű telepet képezett, a leoltási ponttól körül sötétebb barna foltokkal. Ezzel szemben **Moral és mtsai. (2011)** ugyanezen a táptalajon fehér alapszínű, szürke középpel rendelkező tenyészeteket figyeltek meg. Az MLH1-es tenyészet széle enyhén csipkézett volt, míg az MLH3-as tenyészet széle majdnem épek mondható. **Moral és mtsai. (2011)** szerint a tenyészetek épszelűek. A spanyol kutatók szerint a tenyészetek felszíne bolyhos, a mi izolátumaink csak gyér légmicéliumot képeztek a leoltási pont körül PDA táptalajon. Mindkét izolátumunk PDA táptalajon növekedett a leggyorsabban, hasonlóan **Moral és mtsai. (2011)** eredményeihez. A tenyészbélyegek vizsgálata során PDA táptalajon megfigyelt különbségek adódhatnak abból is, hogy pl. más gyártótól származik a táptalaj. Eredményeink alapján mindhárom táptalajt (PDA, LMA, MEA) alkalmasnak tartjuk a *M. linhartiana* izolálására és tenyésztésére. Bár PDA táptalajon növekszik leggyorsabban, mégis a Leonian maláta agart javasolnánk leginkább a kórokozó tenyésztésére, mert ezen a táptalajon lényegesen nagyobb micélium tömeget képzett a gomba.

Mindkét izolátum patogenitását bizonyítottuk birslevelek és hajtások mesterséges fertőzésével. Fiatal inokulált terméseket kettévágva, az epidermisztől a magház irányába

haladó, sötét-, feketésbarnás elszíneződést figyeltünk meg a gyümölcshúsban. A magház körül is fekete gyűrű alakult ki. Eredményeink megegyeznek **Moral és mtsai. (2011)** által leírtakkal.

Az ITS régió alkalmasnak bizonyult a kórokozó fajsztípus meghatározására, ahogy azt **White és mtsai. (1990)** megállapították. Ebben a régióban csak igen kismértékű változékonyságot figyeltünk meg, amely egybevág **Baura és mtsai. (1992)**, valamint **Zambino és Szabo (1993)** eredményeivel, mely szerint a fajon belüli változékonyság 2% alatti. **Moral és mtsai. (2011)** szerint a régióban a *M. linhartiana* kórokozó a *M. amelanchieris* és a *M. mali* fajokkal mutatta a legközelebbi rokonságot. Mi is hasonló eredményre jutottunk. Eredményeink szerint azonban a fent említett két kórokozó mellett a *M. aucupariae* is közeli rokonságban áll a *M. linhartiana*-val.

A *M. linhartiana* β -tubulin génjéből elsőként közöltünk szekvencia adatot, amely a későbbiekben teljesebbé teheti a *Monilinia* fajok evolúciójáról alkotott képet.

Az *in vitro* tesztelt tizenkilenc készítmény közül tizenkettő teljes mértékben gátolta a kórokozó micéliumának növekedését, mind gyakorlati dózisban, mind a gyakorlati dózis tízszeres hígításában. A leghatékonyabbnak bizonyult peszticidek közül a Flint Max, a Folicur Solo, az Orius 20 EW, a Systhane Duplo és Topas 100 EC használható fel a kórokozó elleni növényvédelemben az AKG keretein belül is. Az Antracol 70 WG, a Dithane-M45 és a Topsin-M 70 WDG, amely szintén teljes mértékben gátolta a kórokozó növekedését, felhasználható ugyan birs kultúrában, azonban az AKG-ban a feltételesen engedélyezett készítmények közé sorolták őket. A szintén hatékony Captan 50 WP érvényessége bár 2011. 09. 30-án lejárt, de kaptán hatóanyaggal rendelkezésre áll helyette a Merpan 48 SC vagy az Orthocid 80 WDG. A kaptán hatóanyagot **Altinyay (1975)** is hatékonynak találta. A Mirage 45EC és a Teldor 500 SC készítmények kiváló hatékonyságúnak bizonyultak a birs monilíniás betegségével szemben, de csak csonthéjas kultúrákban engedélyezett a felhasználásuk. Az általunk vizsgált réz tartalmú készítményeket kevésbé találtuk hatékonynak a *Monilinia linhartiana* kórokozóval szemben, mint **Radman (1970)** és **Popescu (2011)**.

6. Összefoglalás

A *Monilinia linhartiana* a birs legjelentősebb kórokozója, mely hajtáselhalást és a fiatal termések mumifikálódását idézi elő. A kórokozó bár világszerte elterjedt a birs ültetvényekben és Magyarországon is régóta ismert, az elmúlt évtizedekben alig végeztek újabb vizsgálatokat a kórokozóval kapcsolatban. Munkánk során célul tűztük ki a kórokozó izolálását, a tünetek jellemzését, a gomba morfológiai, valamint molekuláris azonosítását és jellemzését, továbbá fungicidek hatékonyságának *in vitro* vizsgálatát.

Munkánk során két izolátumot gyűjtöttünk 2013 májusában, Siófokról és Harkányból. A kórokozót PDA táptalajon izoláltuk, majd háromféle táptalajon (PDA, LMA, MEA) jellemeztük a kórokozó tenyészbélyegeit. Jellemeztük a gomba konídiumláncainak és konídiumainak morfológiáját. Az izolálást követően patogenitási tesztet végeztünk a kórokozó megbetegítő képességének bizonyítására. A molekuláris vizsgálat során az ITS régió és a β -tubulin gén bázissorrendje alapján összehasonlítottuk a két izolátum szekvenciáját az NCBI adatbázisban szereplő *Monilinia* fajok szekvenciáival.

A levelek a levélnyélről kiindulva a főér, illetve a nagyobb erek mentén barnultak, majd az egész levéllemez fokozatosan elhalt. Mikroszkóppal vizsgálva a leveleken megjelenő szürkés bevonatot, *Monilinia* nemzetség *Disjunctoriae* alcsoportjára jellemző konídiumláncokat figyeltünk meg. A makrokonídiumok között diszjunktörök képződtek. A konídiumok hialinok, egysejtűek, citrom alakúak voltak. Az egyes táptalajokon a *M. linhartiana* tenyészet más-más morfológiai bélyegekkel rendelkezett, de valamennyin jól tenésztethető volt. A gomba tenyészet valamennyi táptalajon sárgás alapszínű volt, eltérően az irodalmi adatoktól. Felületén fehér légmicélium képződött.

Az ITS régióban csak igen kismértékű változékonyságot figyeltünk meg. A *M. linhartiana* kórokozó a *M. amelanchieris*, a *M. mali* és a *M. aucupariae* fajokkal mutatta a legközelebbi rokonságot a vizsgált szakaszon. A *M. linhartiana* β -tubulin génjéből elsőként közöltünk szekvencia adatot, amely a későbbiekben teljesebbé teheti a *Monilinia* fajok evolúciójáról alkotott képet.

A fungicidekkel végzett *in vitro* hatásvizsgálat során 19 növényvédő szer gyakorlatban használt dózisát, valamint annak tízszeres hígítását teszteltük a *Monilinia linhartiana* micéliumának növekedésére mérgezett agarlemez módszerrel. A legjobb hatékonyságot az Antracol 70 WG, Captan50 WP, Dithane-M45, Flint Max, Folicur Solo, Mirage 45EC, Orius 20 EW, Systhane Duplo, Teldor 500 SC, Topas 100 EC, Topsin-M 70 WDG esetében tapasztaltuk. A rézsulfát, rézhidroxid, réz(I)oxid és rézoxiklorid hatóanyagú szerek a

gyakorlati dózis tízszeres hígításban már hatástalannak bizonyultak. A *Monilinia linhartiana* micéliumának növekedését a strobilurin hatóanyagcsoportban tartozó készítmények nem gátolták.

Vizsgálataink eredményeivel hozzájárultunk a kórokozó hazai populációjának klasszikus mikológiai és molekuláris jellemzéséhez, valamint a hatékony növényvédelmi technológia optimalizálásához.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Palkovics László, tanszékvezető úrnak, továbbá szeretném megköszönni a dolgozat elkészítéséhez nyújtott rengeteg segítséget konzulenseimnek Dr. Petróczy Mariettának és Lantos Annának.

8. Irodalomjegyzék

1. **Altinyay, N.** (1972): Investigations on the biology situation and chemical control of *Monilinia linhartiana* Prill. et Dell. on the quinces in Amasya. Yeni Desen, Ankara. 44.
2. **Altinyay, N.** (1975): Amasya ve Samsun illerinde ayvalarda zarar yapan *Monilia linhartiana* Prill. et Del'in apothes olusumu uzerinde arastirmalar. Bitki Koruma Bul. 15 (3): 139–161.
3. **Anonymus** (2013): International Mycological Association Fungal Databases Nomenclature and Species Banks (www.mycobank.org).
4. **Batra, L. R.** (1991): World species of *Monilinia* (Fungi): Their ecology, biosystematics and control. Mycologia Memoir 16: 40–164
5. **Balaž, J.** (2000): *Monilia* spp. – kao parazit voćaka. Biljni lekar. 28 (2–3): 155–162.
6. **Bánhegyi J.; Tóth S.; Ubrizsy G. és Vörös J.** (1985): Magyarország mikroszkopikus gombáinak határozókönyve. Akadémiai Kiadó. Budapest. 557.
7. **Baura, G.; Szaro, T. M. and Bruns, T. D.** (1992): *Gastrosuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. Mycologia 84: 592–597.
8. **Berkhout, C. M.** (1923): De Schimmelgeslachten *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *Torula*. Doctorate Thesis, Published by Univ. Utrecht. 12–35.
9. **Bessey, E. A.** (1905): Fruit trees. In: Jaczewski, A. A. (1804): Yearbook of Information concerning Diseases and Injuries of Cultivated and Wild Economic Plants. First Year. 1903. pp. 166. St. Petersburg, Russian. The Journal of Mycology, 11 (4): 170–179.
10. **Buchwald, N. F.** (1987): *Sclerotiniaceae* Daniae. En floristisk systematisk oversigt over de i Danmark fundne Knoldbaegersvampe. II. del. *Friesia* 11: 287–328.
11. **Byrde, R. J. W. and Willetts, H. J.** (1977): The brown rot fungi of fruit. Their biology and control. Pergamon Press, Oxford, UK.
12. **Cabello, D.** (2008): Etiología y Epidemiología de la Moniliosis del Membrillero Causada por *Monilinia linhartiana*. Córdoba, Spain: University of Córdoba, Proyecto Fin de Carrera.
13. **Campbell, C. L. and Madden, L. V.** (1990): Introduction to Plant Disease Epidemiology John Wiley and Sons, New York, USA.
14. **Cannon, P. F.; Hawksworth, D. L. and Sherwood-Pike, M. A.** (1985): The British *Ascomycotina*. An Annotated Checklist. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 302.

15. **Carbone, I. and Kohn, L.** (1993): Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia*. 85: 415–427.
16. **Croxall, H. E.; Collingwood, C. A. and Jenkins, J. E. E.** (1951): Observation on brown rot (*Sclerotinia fructigena*) of apples in relation to injury caused by earwigs (*Forficula auricularia*). *Annals of Applied Biology*. 38: 833–843.
17. **Csorba Z. és Berend I.** (1965): Ascomycetes In: Ubrizsy G.: Növénykórtan. II. kötet. Akadémiai Kiadó. Budapest. 286–288.
18. **Dennis, R. W. G.** (1956): A revision of the British *Helotiaceae* in the herbarium of the Royal Botanic Gardens, Kew, with notes on related European species. *Mycol. Pap.* 62: 1216.
19. **Dimitrova, E. and Gyosheva, M.** (2010): Checklist of Bulgarian *Helotiales*. *Phytologia Balcanica*. 16 (1): 3–21.
20. **Farr, D. F. and Rossman, A. Y.** (2013): Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved October 22, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>
21. **Fischer, G. W.** (1930): A study of the fruit diseases occurring in a mid western market. *Butler Univ. bot. Stud.* 1: 105–127.
22. **Garic, R. S.; Stamenkovic and Canak, M.** (1990): Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 20, The effect of *Cydia molesta* on the incidence of *Monilinia spp.* on quince fruits by 603–606.
23. **Gäumann, E. A.** (1928): Comparative morphology of Fungi. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
24. **Georghiou, G. P. and Papadopoulos, C.** (1957): A second list of Cyprus fungi. Government of Cyprus, Department of Agriculture: 38.
25. **Glass, N. L. and Donaldson, G. C.** (1995): Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.
26. **Glits M.** (2000): Gyümölcsfélék betegségei. In: Glits M. és Folk Gy. (2000): Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 190–192.
27. **Harrison, T. H.** (1928): Brown-rot of fruits and associated diseases in Australia. Part I. History of the disease and determination of the casual organism. *J. Proc. Roy. Soc.* 62: 99–154.
28. **Holst-Jensen, A.; Kohn, L. M.; Jakobsen, K. S. and Schumacher, T.** (1997): Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia* (*Sclerotiniaceae*) based on coding and noncoding rDNA sequences. *American Journal of Botany*. 84 (5): 686–701.
29. **Honey, E. E.** (1928): The monilioid species of *Sclerotinia*. *Mycologia* 20: 127–157.
30. **Honey, E. E.** (1936): North American species of *Monilinia* I. Occurrence, grouping, and life –histories. *American Journal of Botany*. 23: 100–106.

31. **Hrustić, J.; Grahovac, M.; Mihajlović, M.; Delibašić, G.; Ivanović, M.; Nikolić, M. and Tanović, B.** (2012): Molecular detection of *Monilinia fructigena* as Causal Agent of Brown Rot on Quince. *Pestic. Phytomed.* 27 (1): 15–24.
32. **Hu, M.; Cox, K. D.; Schnabel, G. and Luo, C.** (2011): *Monilinia* species causing brown rot of peach in china. *PLOS ONE* 6 (9): e24990. doi:10.1371/journal.pone.0024990
33. **Ibragimov, G. R. and Abbasov, T. F.** (1976): The occurrence of the ascus state of *Monilia fructigena* (Schroet.) Honey and *M. cydoniae* (Schell.) Honey in Azerbaijan.
34. **Ivanov, B. (1928)**: Plant diseases in Bulgaria up to 1926. In: *God. Otchet Durzh. Zemed.Opitna & Kontrolna Stantsiya Sofia for 1926*: 150–166.
35. **Koch, R.** (1876): Untersuchungen Über die Aetiologie der Wundinfektionskrankheiten. Leipzig: F. C. W. Vogel. 8–62.
36. **Kövics Gy.** (2000): Növénybetegséget okozó gombák névtára. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 82–158.
37. **van Leeuwen, G. C. M.** (2000): The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia spp.*), with special reference to *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey. PhD Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
38. **Maniatis, T.; Sambrook, J. and Fritsch, E. F.** (1989): Molecular cloning: A laboratory manual.- Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
39. **Massee, G.** (1915): Diseases of cultivated plants and trees. The Macmillan company.
40. **Moral, J.; Lovera, M.; Beni'tez, M. J.; Arquerro, O. and Trapero, A.** (2007): First report of *Botryosphaeria obtusa* causing fruit rot of quince (*Cydonia oblonga*) in Spain. *Plant Pathology* 56: 351.
41. **Moral, J.; Cabello, D.; Beni'tez, M. J.; Lovera, M.; Arquerro, O. and Trapero, A.** (2008): Epidemiology of *Monilia* disease of quince in southern Spain. *Journal of Plant Pathology* 90 (Suppl. 1): 182.
42. **Moral, J.; Muñoz-Dí'ez, C. C.; Cabello, D.; Arquerob, O.; Loverab, M.; Beni'tez, M. J. and Traperoa, A.** (2011): Characterization of monilia disease caused by *Monilinia linhartiana* on quince in southern Spain. *Plant Patology* 60: 1128–1139.
43. **Naidenov, V.** (1915): New disease of quince at home. *Zemledelie*, 20 (7): 190–191.
44. **Nevado, M. I. C.; de la Cruz Blanco, J. I.; López, A. J. G.; Fernández, A. C. and Merino, R. S.** (2011): Moniliosis del membrillero. *Monilinia linhartiana*. Fichas técnicas de sanidad vegetal. No: 069.
45. **Nyéki J.** (2004): Birs. In: Papp János (2004): A gyümölcsök termesztése. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
46. **Ocskó Z., Erdős Gy. és Molnár J.** (2011): Növényvédő szerek, termésnövelő anyagok. Reálsisztéma Dabasi Nyomda Zrt. Budapest. 8–488.

47. **Osterwalder, A.** (1917): Die Blattfleckenkrankheit der Quitte. Schweizer. Zeitschr. f. Obst- u. Weinbau: 257.
48. **Pantidou, M. E.** (1973): Fungus-host index for Greece. Benaki Phytopathol. Inst., Kiphissia, Athens., 382.
49. **Pieper, A.** (1912): Die Moniliakrankheit der Quitten (*Monilia linhartiana*). Zeitschr. f. Obst- u. Gartenbau: 87.
50. **Popescu, E.** (2011): Study of the Effect of Some Environmental Systems for Plant Protection in Production of Fruit in the Alpine Region of Central Rhodope Mountains. Plant Science. 48 (3): 299–303.
51. **Prillieux, E. E.** (1892): Sur une maladie du cognassier. Bull. Soc. Bot. F. XXXIX: 209–12.
52. **Prillieux, E. E. and Delacroix, E. G.** (1893): *Ciboria (Stromatinia) linhartiana* forme ascospore de *Monilia linhartiana*, Sacc. Bulletin de la Société Mycologique de France. 9 (3): 196–202.
53. **Radman, I. J.** (1970): Efficacite des traitements du cognassier a differentes phases de sa vigitation contre *Monilia linhartiana*. ZaStita Bilja 110–111: 331–333.
54. **Rüegg, J. and Siegfried, W.** (1993): Fruit production in Switzerland: significance and control of disease caused by *Monilia* fungi. Pesticide Outlook. 4 (2): 15–18.
55. **Schellenberg, C.** (1899): Ueber die Sclerotinienkrankheit der Quitten. Berichte Deutsch. Bot. Gesellsch. XVII: 205–15.
56. **Schellenberg, C.** (1923): Infektionsversuche mit Vertretern der Gattung *Sclerotinia*. Actes Soc. Helvétique Sci. Nat. CIV: 16–12.
57. **Sumstine, D. R.** (1913): Studies in North American *Hyphomycetes*: II. The Tribe *Oosporeae*. Mycologia. 5 (2): 45–61.
58. **Szabó I.,** (2012): A zselnicemeggy kórokozói. Erdészeti Lapok CXLVII: 6.
59. **Tafradzhiiski, I. and Angelov, T.** (1977): Studies on the *Sclerotinia cydoniae* Schellenberg on quince. Grad. Loz. Nauka 14 (6): 16–21.
60. **Tafradzhiiski, I. and Angelov, T.** (1979): Ovary perishing in quince and its control. Fungus disease caused by *Sclerotinia cydoniae* an *Monilinia cydoniae*. Rastitelna Zashchita 27 (4): 22–24.
61. **Tomaz, I. L. and Costa, M. E.** (1980): A new disease of quince caused by *Monilinia* Sacc. in Portugal. Anais do Instituto Superior de Agronomia 39: 179–90.
62. **White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. and Taylor, J. W.** (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
63. **Wormald, H.** (1926): On the occurrence in Britain of the conidial stage of *Sclerotinia Cydoniae* Schell. Transactions of the British Mycological Society. 10 (4): 303–306.

- 64. Wormald, H.** (1954): The brown rot diseases of fruit trees. Her Majesty's Stationery Office, London. 1–113.
- 65. Woronin, M.** (1895): Die Sklerotinienerkrankheit der gemeinen Traubenkirsche und der Ebersche. Mém. de l'Acad. de St Pétersbourg. 8 (2): 1.
- 66. Woronin, M.** (1880): Die Sklerotinienerkrankheit der Vaccinienbeere. Mém. de l'Acad. de St Pétersbourg, Série 7, (36).
- 67. Zambino, P. J. and Szabo, L. J.** (1993): Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. Mycologia 85: 401–414.