



TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2021. november 24.

A repcét megbetegítő *Plenodomus* fajok fungicid-érzékenységének vizsgálata *in vitro* körülmények között

***In vitro* fungicide sensitivity testing of *Plenodomus* species in oilseed rape**

Készítette: **Csik Ádám János**
Növényorvos hallgató II. évfolyam
Nappali tagozat
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Budai Campus

Témavezetők: **Bagi Bianka** PhD-hallgató
MATE, Növényvédelmi Intézet,
Növénykórtani Tanszék
Dr. Petróczy Marietta egyetemi docens
MATE, Növényvédelmi Intézet
Növénykórtani Tanszék

Budapest
2021.11.03.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1. A repce plenodómuszos betegsége és kórokozói	5
2.2. A kórokozók jelentősége	5
2.3. A kórokozók rendszertani besorolása.....	6
2.4. A kórokozók gazdanövényköre	6
2.5. A kórokozók földrajzi elterjedése	7
2.6. A kórokozók biológiája	7
2.7. A kórokozók által okozott tünetek őszi káposztarepcén	8
2.8. A kórokozók morfológiai és tenyészbélyegei	9
2.9. A kórokozók azonosítása molekuláris módszerekkel.....	11
2.10. Lehetőségek a kórokozók elleni növényvédelemben	12
2.10.1. Genetikai védelem, a hibridek ellenállósága	12
2.10.2. Agrotechnikai védekezés	13
2.10.3. Kémiai növényvédelem	14
2.10.4. Fungicidek hatékonysága a repce plenodómuszos betegségének kórokozóival szemben.	15
2.11. A kísérlet során felhasznált hatóanyagok bemutatása	16
2.11.1. Mitokondriális Komplex II. inhibitorok (SDHI)	17
2.11.2. Mitokondriális Komplex III. inhibitorok (QoI).....	18
2.11.3. C14-demetiláz gátlók (DMI)	19
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	20
3.1. A vizsgálatok helyszíne és ideje.....	20
3.2. A minták gyűjtése, tárolása és feldolgozása.....	21
3.3. A kórokozók izolálása táptalajon, a tenyészetek jellemzése és fenntartása	21
3.4. A kórokozó molekuláris azonosítása	21
3.4.1. DNS kivonás CTAB módszerrel	22
3.4.2. Multiplex polimeráz-láncreakció (PCR)	22
3.5. Az izolált kórokozók patogenitásának vizsgálata.....	23
3.6. Fungicid hatóanyagok tesztelése a kórokozók micélium növekedésére.....	24
4. EREDMÉNYEK	27
4.1. A kórokozók azonosítása molekuláris módszerekkel.....	27
4.2. Az izolált kórokozók tenyészbélyegei	27
4.3. Patogenitási teszt	28
4.4. Fungicid hatóanyagok <i>in vitro</i> tesztelése a <i>Plenodomus</i> izolátumok micélium növekedésére ..	29

4.4.1. Boszkalid	29
4.4.2. Fluopiram	30
4.4.3. Azoxistrobin	32
4.4.4. Piraklostrobin	33
4.4.5. Tebukonazol	35
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK	37
6. ÖSSZEFOGLALÁS	40
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	41
8. IRODALOMJEGYZÉK	42

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az őszi káposztarepce (*Brassica napus* L.) a káposztafélék (*Brassicaceae*) családjába tartozó, szántóföldi olajos növény. Magja 40-50% olajat tartalmaz. A nemesítési munkáknak köszönhetően az új fajták/hibridek olaja már nem tartalmaz erukasavat, továbbá glükozinát tartalma is megfelelően alacsony. Összetétele alapján így a repceolaj kiválóan alkalmassá vált humán táplálkozásra, valamint az olajútás során keletkező repcedara természetes és jó minőségű kiegészítő takarmányforrást jelent az állattenyésztés iparágában. A repce olaját továbbá felhasználja a festék-, a textil-, a bőr-, a gumi-, a műanyag- és az energiaipar is (**Antal, 2005**).

A repce hazánkban - a napraforgó után - a második legnagyobb területen termesztett olajos növényünk. Vetésterülete kb. 300 ezer hektárra tehető, a hektáronkénti termésátlag 3 tonna (**Internet 1.**). A világon évente közel 70 millió tonna repcét termesztenek. Kanada, a világ legnagyobb repcetermesztője, a világtermelés 20-30%-át adja, míg az Európai Unió országaiban termesztett repcét a legmagasabb hozamokkal lehet jellemezni (**Internet 2.**). A nemesítő munkának köszönhetően a repceolaj széles körben felhasznált növényi olajjá vált, azonban a növény betegség ellenálló képessége csökkent. Ennek következtében a repce plenodómuszos betegsége egyre nagyobb kárt okoz a repcetermesztőknek (**Kightley et al., 2012**).

A repce plenodómuszos betegségét két egymással közeli rokonságban álló kórokozó idézi elő. A *Plenodomus lingam* (Tode) Höhn. hazai jelenléte és kártétele már évtizedek óta ismert. A legújabb vizsgálatok alapján azonban egy másik kórokozó, a *Plenodomus biglobosus* Shoemaker & Brun is jelen van a magyarországi repce állományokban (**Bagi et al., 2020**). A két kórokozót tünetek alapján elkülöníteni szinte lehetetlen. A külföldi tanulmányok azonban arról számolnak be, hogy a két faj biológiája kissé eltérő, és a fungicidek hatékonysága sem egységes a két *Plenodomus* faj tekintetében (**Huang et al., 2011**). A plenodómuszos betegség, vagy ahogy a termesztők ismerik, a fómás levélfoltosság és szárrák elleni növényvédelmi technológia sok-sok éve jól bevált stratégiát követ. **Varga (2014)** azonban már korábban is hangsúlyozta, hogy hazai szinten is kiemelten fontos lenne, a gombapopulációk rezisztenciájával kapcsolatos vizsgálatok elvégzése. A vizsgálatok elvégzése azért is fontos, mert az új *Plenodomus* faj kapcsán semmiféle hazai ismeret nem áll rendelkezésre a növényvédő szerek hatékonyságával kapcsolatban.

Munkánk során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- A betegség jellegzetes tüneteit mutató őszi káposztarepce növények vegetatív részeinek gyűjtése a kórokozók izolálása céljából;
- Az izolátumok faj szintű azonosítása tenyészbélyegek alapján, valamint nukleinsav alapú módszerrel;
- Az izolált kórokozók megbetegítő képességének igazolása;
- A *Plenodomus lingam* és *Plenodomus biglobosus* izolátumok fungicid hatóanyagokkal szembeni érzékenységének *in vitro* vizsgálata sorozathígításos, mérgezett agarlemez módszerrel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A repce plenodómuszos betegsége és kórokozói

A repce plenodómuszos betegségét két tömlősgomba (*Ascomycota*) egymással közeli rokonságban álló faja okozza: A *Plenodomus lingam* (Tode) Höhn. és a *Plenodomus biglobosus* Shoemaker & Brun (Van de Wouw és Howlett, 2020). A betegség a köznyelvben és a szakmai életben főmász levélfoltosság és szárrák néven ismert, de használják még a gyökérnyak és szárróhadás, továbbá a repce feketelábúsága elnevezéseket is. A repce plenodómuszos betegsége elleni védekezés a hazai repcetermesztés állandó részét képezi (Varga, 2014).

2.2. A kórokozók jelentősége

A repce plenodómuszos megbetegedése a keresztesvirágúak családjába tartozó növényeknek világszerte fontos betegsége, amely súlyos járványokat okoz Ausztráliában, Amerikában és Európában, valamint az elmúlt években a kórokozó megjelent Ázsiában is (Liu *et al.*, 2014). A becslések szerint világszerte több mint 1000 millió euró értékű veszteséget okoz a repcetermesztőknek (Fitt *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

Régebben a betegség okozta termésveszteség mértéke akár a 70%-ot is elérte (Seidel *et al.*, 1984). A járványok súlyossága termesztési szezononként és régióként eltérő lehet.

A populációkat két egymással közeli rokonságban lévő faj, a *Plenodomus lingam* és a *P. biglobosus* alkotja, melyek külön-külön, vagy egyszerre, akár egy növényen is előfordulhatnak. A *P. lingam* agresszívebb kórokozó, és rendszerint súlyosabb járványokat és jelentősebb termésveszteséget okoz (Fitt *et al.* 2006a, b). A fokozott kártétel az alapi részen kialakuló szárrákkal van szoros összefüggésben (Zhou *et al.* 1999), ugyanis a *P. biglobosus* által okozott elváltozások inkább a szár felsőbb részein fordulnak elő (West *et al.* 2001). A rendszeresen végzett megfigyelések alapján Nyugat-Európában magasabb a *P. lingam* aránya, Közép- és Kelet-Európában pedig a *P. biglobosus* van túlsúlyban.

A betegséget többnyire ősszel alkalmazott kémiai növényvédelemmel lehet leküzdeni. Gyakran egy őszi kezelés nem elegendő a betegség visszaszorításához. A kórokozók által okozott járványok súlyossága várhatóan növekedni fog a globális felmelegedéssel párhuzamosan, ezért a gazdanövény rezisztencianemesítése a betegség leküzdésére egyre fontosabbá válik (Dawidziuk *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016;).

2.3. A kórokozók rendszertani besorolása

A **Mycobank (2021)** és az EPPO adatbázisa (**Internet 4.**) szerint a repce plenodómuszos megbetegedését okozó *Plenodomus lingam* (Tode) Höhn. és *Plenodomus biglobosus* Shoemaker & Brun, Gruyter, Aveskamp & Verkleya gombák országán belül, az *Ascomycota* törzsbe, a *Pezizomycotina* altörzsbe, a *Dothideomycetes* osztályba, a *Pleosporomycetidae* alosztályba, a *Pleosporales* rendbe, a *Leptosphaeriaceae* családba és a *Plenodomus* nemzetségbe tartozik.

A *P. lingam* faj legitim elnevezése az elmúlt évtizedben többször változott. Korábban *Leptosphaeria maculans* Ces. & De Not. néven, a *Leptosphaeria* nemzetségbe sorolták, de ismert *Phoma lingam* (Tode) Desm.-ként, vagy *Sphaeropsis lingam* (Tode) Mussat-ként is (**Internet 5**). A *Plenodomus* nemzetség **Gruyter et. al (2013)** taxonómiai eredményei alapján véglegesedett, amikor a *Leptosphaeria* és *Phoma* fajok rendszertanát molekuláris módszerekkel új alapokra helyezték.

A *P. biglobosus*-t eredetileg *Leptosphaeria biglobosa* néven írták le. Utóbbira ma már csak szinonimaként tekinthetünk (**Internet 5**). A két kórokozót 2006-ban különítették el egymástól, amikor felfigyeltek arra, hogy a *P. lingam* egyes populációi nagyon eltérőek virulenciájukat és agresszivitásukat tekintve (**Internet 6; Fitt et al., 2006a; Gruyter et al., 2013**).

2.4. A kórokozók gazdanövényköre

A *Plenodomus lingam* és a *P. biglobosus* leginkább a *Brassica* nemzetségbe tartozó növényeket fertőzik (**Farr és Rossmann, 2021**), az őszi káposztarepce (*Brassica napus* L.) állományokban jelentős károkat okoznak. Fertőzik a *Brassica* növényfaj nemzetség más fajait is, mint például a tarlórépát (*Brassica rapa*), a barna mustárt (*B. juncea*) és a kelkáposztát (*B. oleracea*). Számos más termesztett és vadon élő növényt is megfertőzhetnek a kórokozók [pl.: retek (*Raphanus sativus* L.), kelbimbó (*B. oleracea* convar. *oleracea* var. *gemmifera*), fehér mustár (*Sinapsis alba*), lúdfű (*Arabidopsis thaliana*)]. Keresztesvirágú gyomfajokról, úgymint a repcsényretek (*Raphanus raphanistrum*), a szapora zsombor (*Sisymbrium officinale*), a mezei tarsóka (*Thlaspi arvense*) is kimutatták a kórokozókat (**Rouxel és Balesdent, 2005; Varga, 2014**).

2.5. A kórokozók földrajzi elterjedése

A *Plenodomus lingam* és a *P. biglobosus* széles körben elterjedtek, különösen a *Brassica* nemzetségbe tartozó növények termőterületén fordulnak elő. Kártételük jelentős Ausztráliában, Észak-Amerikában és Európában, de a kórokozók megtalálhatók a világ más részein, így Ázsiában, Afrikában és Dél-Amerikában is. A két kórokozó együttes előfordulásáról számoltak be Európa különböző országaiban, beleértve számos közép-európai országot (pl.: Lengyelország, Litvánia, Csehország). A kórokozók jelenléte a környező országokból is ismert. A *P. lingam*-ot Romániában már 1964-ben leírták, 1965-ben Horvátországban is észlelték. A *P. biglobosus* Szerbiában 2016-ban került leírásra (Mitrovic *et al.*, 2016).

Varga (2014) tanulmányában olvasható, hogy nem megfelelő növényvédelmi technológia esetén a *P. lingam* okozta betegség jelentős korlátozó tényezővé vált a repce termésmennyiségét tekintve a Kárpát-medencében. Termesztett repcén történő magyarországi megjelenéséről először 1996-ból találunk adatot (Varga, 2014). Ennek ismeretében feltételezhető, hogy vadrepcén már a korábbi időszakban is jelen lehetett a kórokozó. Az ivaros alak megjelenéséről az első adatok 2006-ból származnak (Magyar *et al.*, 2006). A *P. biglobosus*-t hazánkban 2018-ban izolálták először (Bagi *et al.*, 2020).

2.6. A kórokozók biológiája

Európában a repce növényeket többnyire ősszel fertőzik meg a pszeudotéciumokban termelődő askospórák, melyek az előző termesztési időszakból visszamaradt, fertőzött, elhalt szármaradványokon képződnek. Az askospórák szóródásának időszaka növényvédelmi szempontból kiemelt jelentőségű, mert bebizonyosodott, hogy a fungiciddel végzett kezelések akkor a leghatékonyabbak, ha a tömeges askospóra kiszóródás időszakában alkalmazzák őket, ami jellemzően egy csapadékos időszak után következik be. A kórokozók fejlődését, a pszeudotéciumok képződését az időjárás jelentős mértékben befolyásolhatja, továbbá az askospórák terjedéséhez a szeles időjárás is jelentős mértékben hozzájárul (West *et al.*, 2001; Varga, 2014). A fertőzés bekövetkeztéhez az optimális hőmérséklet tartomány igen széles (8-20 °C), így szinte egész évben számíthatunk a fertőzés megjelenésére.

A *Plenodomus lingam* gomba életciklusa összetett, jellemző rá, hogy hemibiotróf parazita életmódot folytat. Az askospórák a szikleveleken és a leveleken csíráznak, és a gázcsereenyílásokon keresztül behatolnak a növénybe. A gomba ezután a szárban és a levél szöveteiben intracellulárisan fejlődik, majd megjelennek a betegség tünetei a leveleken. Ezt a szakaszt a szakirodalom biotróf fázisnak nevezi. Nekrotróf fázisát a *P. lingam* késő tavasszal

kezdi meg Európában, ez a szakasz egészen a repce betakarításáig tart. Ekkor a szártőnél barnulást, nekrozist okoz (szárrák), ami a szártöréshez és hozamvesztéshez vezet. Betakarítást követően a gomba szaprofitaként folytatja életciklusát, a talajon maradt fertőzött növényi maradványokon, melyeken felszaporodik. Termőtestei túlélnek a termésközi időszakot, sőt spórái akár több éven át is megőrzik életképességüket. A gomba fertőzött vetőmaggal is terjed és évekig fertőzőképes marad. Ha azonban az általános gyakorlat szerint a vetésre használt vetőmagtétel kórokozómentesek, akkor a kórokozó a fertőzött növényi maradványokból kerül a növényállományba (West *et al.*, 2001; Varga, 2014; Dawidziuk *et al.*, 2013; Kerdraon *et al.*, 2020). Az egymást követő termesztési időszakok járványai nem függetlenek egymástól, így a járványügyi vizsgálatoknak átfogó képet kell alkotni a fertőzési folyamatokról. A fertőzött növényi maradványokat tartalmazó tarló lehetővé teszi a *P. lingam* és a *P. biglobosus* felszaporodását és a plenodómuszos megbetegedés súlyossága általában korrelál az előző évben kibocsátott aszkospórák mennyiségével (Bousset *et al.*, 2018; Kerdraon *et al.*, 2020).

2.7. A kórokozók által okozott tünetek őszi káposztarepcén

A *Plenodomus lingam* és a *P. biglobosus* által okozott tünetek nagyon hasonlóak egymáshoz, ezért tünetek alapján szinte lehetetlen elkülöníteni a kórokozókat. A *P. lingam* a növényt az összes fejlődési fázisában képes megbetegíteni, a tünetek az egész növényen jelentkezhetnek. A fertőzés ősszel alakul ki, a levélfoltok ősztől kora tavaszig figyelhetők meg. Az ősszel vetett növényeknél a kezdeti aszkospórák fertőzés után halvány, szabálytalan foltok alakulnak ki a szikleveleken, a leveleken, a száron vagy a levélnyélen. A foltok később kör alakúvá vagy oválissá válnak és hamvasszürkévé válnak (1. ábra) a megfertőzött növényi részek (Varga, 2014; Van de Wouw és Howlett, 2020). A piknídiumok ekkor akár szabad szemmel is megfigyelhetők (1. és 2. ábra).



1. ábra: A *P. lingam* okozta levélfoltosság repcén (Forrás: Internet 7.)

Néha a nekrotizálódott szövetek kitöredeznek, beszakadoznak (**1. ábra**) különösen nagy esőzések után, de egy keskeny, hamvasszürke sáv általában megmarad.

A aszkospórák által tavasszal elindított következő fertőzési hullám az idősebb leveleken már markánsabb tünetekkel jelentkezik, ekkor éles kontúrral határolt, koncentrikus, közepén világos foltok alakulnak ki a fertőzött növényeken. A fertőzés előrehaladtával a levelek klorózisa és száradása figyelhető meg. A száron a fertőzés következtében barnás-fekete színű rákos sebek alakulnak ki (**2. ábra**), különösen a repceszár-ormányos kártétele nyomán. A fertőzés következtében a szár bélállománya szürkés-fekete színezetűvé válik és már nem lesz képes ellátni funkcióját. Ezt a jelenséget nevezzük szárráknak, amely súlyos esetben szártöréshez vezethet.



2. ábra: A *P. lingam* okozta szárrák repcén (Forrás: **Internet 7.**)

A szár törése tavasztól nyárig, egészen a betakarításig tapasztalható. A betegség akár becőszintig is terjedhet, ebben az esetben a magok is fertőződnek. A betegség következtében a növény kivilágosodik, megdőlhet valamint kényszeréretté is válik, ami maga után vonja a termésvesztést. Szártünetek tekintetében a *P. biglobosus* inkább a szár felsőbb régiójában okoz tünetet, emiatt szártörést nem okoz (Fitt *et al.*, 2006 a, b; Bousset *et al.*, 2018).

2.8. A kórokozók morfológiai és tenyészbélyegei

A két *Plenodomus* faj elkülönítése a morfológiai bélyegek alapján nem egyszerű. A két faj alig különbözik a pszeudotéciumok és az aszkospórák méretét tekintve (**1. táblázat**). A kórokozók a vegetációs időszak során piknídiumokat képeznek, melyek morfológiailag szintén nagyon hasonlóak (**2. táblázat**). A *P. lingam* esetében a piknídium fekete, kerek, felülete sima, mérete $200 \times 200 \mu\text{m}$. A *P. lingam* esetében a piknídium nem tartalmaz parafíziseket. A piknídium fala mindkét faj esetében vékony hialin sejtekből áll (Shoemaker és Brun, 2001). Koreai *P. biglobosus* populáció jellemzése során feketésbarna, lapított gömb alakú piknídiumokat figyeltek meg (Hong *et al.*, 2009).

1. táblázat: A *P. lingam* és a *P. biglobosus* összehasonlítása az ivaros termőtest alapján
(Shoemaker és Brun, 2001)

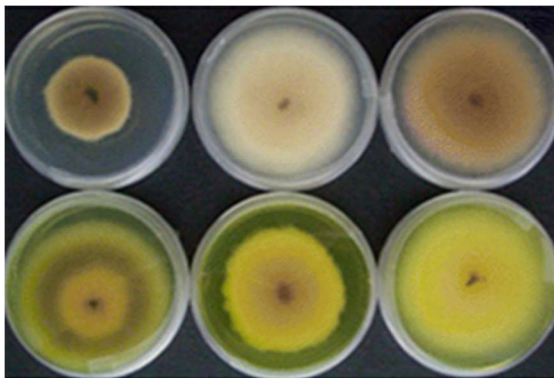
Morfológiai bélyeg	<i>P. lingam</i>	<i>P. biglobosus</i>
pszeudotécium alakja	gömb vagy ovális, alsó része lapított	
pszeudotécium mérete	300-400 µm	280-350 µm
pszeudotécium helye	szár epidermiszébe ágyazva	szár epidermisze alatti szövetben
aszospórák száma, színe	8 db színtelen	
aszospórák mérete	6,5 × 55 µm	6,5 × 45 µm
aszospórák felülete	sima	sima

2. táblázat: A *P. lingam* és a *P. biglobosus* összehasonlítása az ivartalan termőtest alapján
(Boerema *et al.*, 2004)

Morfológiai bélyeg	<i>P. lingam</i>	<i>P. biglobosus</i>
piknídium alakja	lapított gömb alakú	gömb alakú (szemölcsös)
piknídium mérete	150-400	150-350 (-400)
piknídium színe	fekete	fekete vagy szürkésbarna
konídiumok alakja	ellipszoid / lapított hengeres	
konídiumok mérete	(2,5)-3,5-4,5-(5) x 1-1,5- (2)µm	4-5 x 1,5-2µm
konídiumok színe	hialin	

Mindkét kórokozó tenyésztethető táptalajon, és sok esetben a *P. lingam* és a *P. biglobosus* el is különíthető egymástól (Boerema *et al.*, 2004). A szerzők szerint a *P. biglobosus* szabályos alakú, fehéresszürke tenyészetet képez, melyben sárgásbarna színű pigmentáció figyelhető meg (3. ábra), míg a *P. lingam* tenyészei szabályosak vagy szabálytalan alakúak, változatos színűek, azonban pigmentáció nem alakul ki a tenyésztés során. Hong és munkatársai (2009) koreai *P. biglobosus* izolátumok kapcsán szintén megfigyelték a sárgásbarna pigmentképződést a táptalajokban. Mitrovic és munkatársainak (2016) vizsgálata alapján PDA táptalajon tenyésztett (hőmérséklet 25±1 °C) *P. biglobosus* ötnapos tenyészeit gyors növekedési ütem és a szabályos kör alakú növekedés jellemzi. A szerzők említik, hogy a *P. biglobosus* 15 nap elteltével sárgásbarna pigmentet képez, míg a *P. lingam* esetében az ötnapos tenyészet szabálytalan kör alakú, növekedési üteme lassabb. Mitrovic és munkatársainak (2016) tanulmányában a micélium színe mindkét kórokozó esetén szürkésfehér vagy fehér, a tenyészet szerkezete laza. Egyes izolátumok esetén a tenyészetekben ivartalan szaporítóképletek képződnek. A piknídiumok alakja kerek, színük barna, egy vagy több üregből állnak. **Rahnama**

és munkatársai (2017) tanulmányában a *P. lingam* esetében szintén lassabb növekedési ütemről és szabálytalan alakú tenyészetekről számoltak be. Kutatásukban a micélium színe nagy változatosságot mutatott a fehértől a szürkéig.



3. ábra: *P. biglobosus* izolátumok eltérő intenzitású pigmentációja PDA táptalajon
(Liu *et al.*, 2014)

2.9. A kórokozók azonosítása molekuláris módszerekkel

A két vizsgált kórokozó morfológiai bélyegek alapján történő elkülönítése nehézkes és bizonytalan, ezért molekuláris módszerek alkalmazása ajánlott a két faj megkülönböztetésére. A *Plenodomus lingam* és a *P. biglobosus* kimutatására a fajspecifikus primerpárral végzett polimeráz-láncreakció az egyik leghatékonyabb és legkevésbé időigényes módszer (Rahnama *et al.*, 2017).

Liu és munkatársai (2006) a kórokozók ITS régióinak és 5,8S rRNS génjének felszaporítására ITS4 és ITS5 univerzális primereket használtak. A kapott termékek szekvenciáját meghatároztatták és a génbankban lévő szekvenciákkal összehasonlították. Ezek alapján lehetővé vált azoknak a primereknek a megtervezése, amelyeknek felhasználásával a két faj egyértelműen, az amplikon hosszúsága alapján, különíthető el egymástól. A PCR során a *P. lingam* izolátumok esetén 331 bp hosszúságú termék keletkezett, a *P. biglobosus* izolátumok esetén pedig 444 bp hosszúságú szakasz szaporodott fel (Liu *et al.*, 2006).

Jacques és munkatársai (2021) fajspecifikus, kvantitatív PCR (qPCR) vizsgálatot végeztek a két faj kimutatására és számszerűsítésére a repce szántóföldi mintáiban. Az ITS régiókon alapuló tesztnél specifikusabb eredmény született. Eredményeik alapján a *P. biglobosus* gyakorisága magasabb volt, mint korábban gondolták. Járványügyi és kolonizációs biológiai jellemzői nagyon hasonlóak a *P. lingam*-hoz. A két faj együttes jelenléte ugyanazon növény levelein és szárszöveiben kérdéseket vetnek fel a növények szövetein

belüli relatív előfordulási gyakoriságukról és biológiai kölcsönhatásaikról (**Jacques et al., 2021**).

Bagi és munkatársai (2020) hazai vizsgálatában a felhasznált tenyészetek örökítőanyagát multiplex PCR-rel értékelték, melyhez **Liu és munkatársai (2006)** által megtervezett fajspecifikus primereket használtak fel. A gélelektroforézis segítségével a *P. biglobosus* izolátumok egyértelműen megkülönböztethetők voltak a *P. lingam*-tól, amplikonhossz alapján. A kiválasztott izolátumok ITS régióinak és az 5,8S rRNS génjének BLAST keresései 99,7-100%-os hasonlósággal megegyeztek a referencia izolátumokkal (**Bagi et al., 2020**).

2.10. Lehetőségek a kórokozók elleni növényvédelemben

A repce plenodómuszos betegségének termésmennyiségre gyakorolt hatása agrotechnikai, kémiai és genetikai védekezési stratégiák kombinációjával jelentősen csökkenthető (**Van de Wouw et al., 2016; Zhang és Fernando, 2016**).

2.10.1. Genetikai védelem, a hibridek ellenállósága

A rezisztencianemesítés a plenodómuszos megbetegedés elleni küzdelem egyik fő eszköze. Kétféle rezisztencia létezik: a több génen alapuló kvantitatív (poligénikus rezisztencia) és az egy génen alapuló kvalitatív (rassz-specifikus) rezisztencia, ami a kórokozó meghatározott rassza ellen nyújt védelmet. A kvalitatív rezisztencia gén a génnel szembeni kölcsönhatásban fejeződik ki. A *Brassica* gazdanövény adott rezisztencia-génjéhez kapcsolódik egy avirulencia gén a *P. lingam*-ban. Az avirulencia génekről transzláció útján átíródó effektor fehérjék a betegség súlyosbításában vesznek részt. A kvalitatív rezisztencia kifejeződését általában korai fejlődési fázisban, szikleveles korban vizsgálják. Ezen a rezisztencia fajták jellemzően az Rlm gének által szabályozottak, amilyen például az Rlm7 és az Rlm3 gén. A repce Rlm génje a *P. lingam* Avr génjét ismeri fel, ami pedig működésbe lépteti a növény védekező mechanizmusát. A *B. napus* genom összetettsége és amfidiploid jellege megnehezítette az ellenállóságért felelős gének azonosítását és klónozását, ennek ellenére számos rezisztenciagén ismert: Rlm1, Rlm2, Rlm3, Rlm4, Rlm5, Rlm6, Rlm7, Rlm8, Rlm9, Rlm10, Rlm11, RlmS, LepR1, LepR2, LepR3. Amióta lehetővé vált az egyes szervezetek genomjainak szekvencia szintű megismerése, a *P. lingam* számos avirulencia génjét azonosították (AvrLm1, AvrLm2, AvrLm3, AvrLm5-9, AvrLm10, AvrLm11). A kvantitatív rezisztencia esetében számos kisebb gént határoztak meg, amelyek mindegyike kis mértékben hozzájárul az általánosan ellenálló fenotípus kialakulásához. Általában a kvantitatív rezisztenciát a növény kifejlett állapotában vizsgálják.

Bár a *P. lingam* – *Brassica* fajok kölcsönhatásának kvantitatív rezisztenciájáról keveset tudunk, a kvantitatív rezisztencia és a rassz-specifikus rezisztencia kombinációja tartósabb betegségek elleni védekezést eredményezhet (Kutcher *et al.*, 2010; Larkan *et al.*, 2015, Van de Wouw és Howlett, 2020).

Bár a rezisztencianemesítés az egyik legígéretesebb járványvédelmi stratégia a kórokozók elleni védekezés szempontjából, ennek ellenére fokozott figyelemmel kell végezni. Ugyanis a *P. lingam* szántóföldi populációi nagy evolúciós potenciállal rendelkeznek és néhány éven belül képesek áttörni a rassz-specifikus rezisztenciáért felelős géneket, ami újabb kihívást jelent a rezisztens fajtákra támaszkodó betegségek elleni védekezésben. A kilencvenes évek elején az Rlm3 rezisztenciagént bevezették a kanadai repcefajták esetében, mely hosszú évekig megfelelő rezisztenciát biztosított a fertőzéssel szemben. Azonban a 2000-es évek elején súlyos járványok törtek ki, annak következtében, hogy az Rlm3 rezisztencia génnel rendelkező repce hibridek már nem voltak képesek ellenállni a kórokozó fertőzésének. Az a tény, hogy az Rlm3 rezisztenciagént áttörte a kórokozó, megköveteli, hogy a nemesítők változatos és hatékony rezisztenciagénekkel rendelkező repcefajtákat fejlesszenek. A gombapopulációk rendszeres megfigyelése naprakész útmutatást nyújthatnak a megfelelő rezisztencia génekkel rendelkező hibridek termesztésében (Zhang és Fernando, 2016; Van de Wouw és Howlett, 2020).

2.10.2. Agrotechnikai védekezés

A plenodómuszos betegség kártételi küszöb alatt tartására irányuló alapvető agrotechnikai stratégiák közé tartozik a vetésfogo és a kórokozókkal fertőzött tarló elkerülése. A repce esetében legalább ötéves vetésforgó alkalmazása javasolt. A kórokozók a betakarítás után visszamaradt növényi maradványokon felszaporodhatnak, ezért a szántás nélküli és direkt vetési technológiák használata kerülendő. A betakarítást követően a tarlón mélyszántás alkalmazása javasolt, elősegítve a fertőzött növényi maradványok lebomlását. A növényvédelem során kiemelt figyelmet kell fordítani a *Brassicaceae* családba tartozó gyomok jelenlétére és az árvakelésekre, ugyanis a kórokozók ezeken is fennmaradhatnak (McCredde *et al.*, 2017; Varga, 2014).

Kiemelten fontos a megfelelő vetőmag választása, hiszen a kórokozók vetőmaggal is terjedhetnek, ezért csak ellenőrzött forrásból származó, megfelelően bevizsgált, fémzárolt vetőmagot érdemes használni. Ökológiai termesztésben a vetőmagok esetében lehetőség van forró vizes kezelésre, valamint a levélfoltok kialakulása után, a fertőzött levelek eltávolításával csökkenthető a táblán belüli másodlagos fertőzés, valamint a szárrák kialakulásának kockázata. Száraz időszakban végzett vetés esetén csökkenhet a fertőződés kockázata, ugyanis

alacsonyabb a szóródó aszkospórák száma. Vetéshez, a betegség terjedése szempontjából, azok a táblák a legalkalmasabbak, ahol az azt megelőző 4 évben nem termesztették a kórokozók egyik gazdanövényét sem (Kutcher *et al.*, 2010; Varga, 2014; Van de Wouw és Howlett, 2020).

2.10.3. Kémiai növényvédelem

A plenodómuszos betegség elleni védekezés három elemre épül:

- fungicides vetőmagcsávázás
- őszi fungicides állománykezelés
- tavaszi kétszeri fungicides állománykezelés (Varga, 2014)

A kémiai növényvédelem első lépése a vetőmagok megfelelő kezelése. A fungicid hatóanyaggal végzett vetőmagcsávázás segítségével elkerülhető a kórokozók szaporítóanyaggal történő terjedése. Ausztráliában a fluquikonazol tartalmú gombaölő szerekkel végzett vetőmagcsávázást és a műtrágyával bevont flutriafol hatóanyagú szerek barázdába történő kijuttatását már évtizedek óta alkalmazzák a betegségek megelőzése érdekében. Bizonyos esetekben vetőmag-csávázást és lombozat kezelést is alkalmaznak ugyanazon területen egyetlen szezonban, erős szelekciós nyomást gyakorolva a *P. lingam* populációira. Az ausztrál piacon új hatásmechanizmusú gombaölő szerként jelent meg a szukcinát-dehidrogenáz-gátló (SDHI) hatóanyagok csoportja, amely a vetőmag csávázására alkalmazható (Van de Wouw *et al.*, 2016; Van de Wouw *et al.*, 2018).

Peng és munkatársai (2020) a vetőmagkezelést költséghatékony megoldásnak vélik, azonban hangsúlyozzák, hogy nincs olyan regisztrált vetőmagkezelő termék, amely a föld felett kialakuló megbetegedést hatékonyan gátolná. Vizsgálatukban több fungicidet vizsgáltak a *P. lingam* okozta levélfoltosság és a szárrák kialakulásával szemben. Kontrollált környezeti feltételek mellett a fluopiram hatóanyag nagyobb hatékonyságot mutatott, mint a fluquikonazol hatóanyag a levélfoltok kialakulásának megelőzésében. Vizsgálatukban a ProsperEverGol és a HelixVibrance forgalomban lévő fungicidek hatástalanok voltak. A 30-150 g fluopiram/ 100 kg magmennyiség esetében nagyrészt gátolta a szikleveles fertőzést, a hatékonyságot azonban jelentősen befolyásolta a talaj nedvességtartalma a vetést követő 3 héten belül. A szukcinát-dehidrogenáz inhibitor fungicidek tipikus mechanizmusán kívül a fluopiram a PR-1 fehérjéket kódoló indikátorgén expresszióját is jelentősen segítette, jelezve a rezisztencia kialakulásának lehetőségét. A 75 és 150 g fluopiram/100 kg-os magmennyiség

esetén szántóföldi kísérletek során csökkentette a sziklevelek fertőződését, mind a kórokozókra fogékony, mind a rezisztens repcefajták esetében (**Peng et al., 2020**). Magyarországon az engedélyezett növényvédő szerek jegyzéke (2020.12.31.-i állapot) szerint gombaölő csávázószerként a fluopikolid és a fluoxastrobin hatóanyag tartalmú Scenic Gold és Integral Pro készítmények engedélyezettek (**Internet 8.**).

A plenodómuszos betegség elleni kémiai védekezés következő fontos eleme az őszi fungicides kezelés, melynek során különböző triazol típusú készítmények alkalmazása ajánlott. Ezek a készítmények a gombaölő hatáson túl, képesek a föld feletti vegetatív részek növekedésének korlátozására és a gyökérzet növekedésének serkentésére. Ezáltal a repce növény télállóbb lesz, a föld feletti vegetatív részek mennyisége csökken, mely önmagában is csökkenti a plenodómuszos fertőzés kockázatát. Ilyen triazol típusú hatóanyagok a difenokonazol, metkonazol, paklobutrazol, protiokonazol és a tebukonazol (**Varga, 2014**). Hazai forgalomban az engedélyezett növényvédő szerek jegyzéke (2020.12.31.-i állapot) szerint ilyen gombaölő, növekedés szabályozó szer pl. a CarambaTurbo, melynek hatóanyaga a metkonazol és a mepikvát-klorid; valamint a Torex, melynek hatóanyaga a difenokonazol és paklobutrazol (**Internet 8.**).

A tavasszal, az akár két alkalommal végzett fungicides állománykezelés a repce védelmének harmadik lépése, melyet szárbainduláskor és a fővirágzás idején kell végrehajtani. A szárbainduláskor triazol típusú készítmények alkalmazása, a fővirágzás idején pedig más hatásmechanizmusú, széles hatásspektrumú fungicid használata ajánlott. Az ebben az időszakban elvégzett kezelés, nemcsak a plenodómuszos megbetegedés ellen, hanem az alternáriás és szklerotíniás fertőzések megelőzése érdekében is fontos (**Varga, 2014**).

2.10.4. Fungicidek hatékonysága a repce plenodómuszos betegségének kórokozóival szemben

A fungicidek *P. biglobosus* elleni hatékonyságáról a hazai viszonylatban semmiféle adatunk nincs és a *P. lingam* kapcsán is kevés az információ.

A nemzetközi szakirodalomban több tanulmány vizsgálta a fungicidek *P. lingam*-ra és *P. biglobosus*-ra gyakorolt hatását. Egyes vizsgálatok kimutatták, hogy a *P. lingam* érzékenyebb a fungicidekre, mint a *P. biglobosus* (**Huang et al., 2011**). Különböző *P. lingam* izolátumok között mutattak ki eltéréseket kanadai kutatók a QoI (Quinone-outside inhibitor) fungicidekkel szemben (**Zhang és Fernando, 2018**). A tanulmányokból levonható a következtetés, miszerint a gombaölő szerek alkalmazásának időzítése döntő fontosságú a *P. lingam* és *P. biglobosus* elleni védekezésben, mert a készítmények a szár megfertőződését

követően már nem képesek hatékonyan kontrollálni a kórokozók terjedését. Megállapították, hogy a lombos állapotban lévő repceállományba kijuttatott fungicidek csökkentik a betegség súlyosságát és növelik a termés mennyiségét, főleg a plenodómuszos betegségre fogékony repcefajtáknál (Zhang és Fernando, 2018; Huang *et al.*, 2011).

Hwang és munkatársai (2016) piraklostrobin hatóanyagú készítménnyel kezelve megállapították, hogy hatóanyag alkalmazása csökkentette a betegség súlyosságát és növelte a termés hozamot a kezeletlen kontrollhoz képest. A fertőzés elleni védekezés akkor volt a legeredményesebb, ha a kezelést háromszor is elvégezték (fiatal növényeknél, korai virágzási szakaszban, késői virágzási szakaszban). Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a szezon elején alkalmazott gombaölő szerek megakadályozták a fiatal növények pusztulását és a későbbi szezonban történő alkalmazás csökkenti a másodlagos fertőzéseket valamint a termésvesztést (Hwang *et al.*, 2016). A repce növényvédelme kapcsán hazánkban is elérhető piraklostrobin hatóanyagú fungicid, ilyen például a Picasso Active növényvédő szer (Internet 8).

2.11. A kísérlet során felhasznált hatóanyagok bemutatása

Számos különböző hatáshelyű (specifikus) hatóanyag hatékony a repce plenodómuszos betegségével szemben, beleértve a DMI, a QoI, és az SDHI csoportba tartozó fungicideket (Eckert *et al.* 2010). Ezen csoportokban lévő hatóanyagok nagy előnye, hogy nagyrészüket szisztémikus kinetikával rendelkezik, nagy hátrányuk viszont, hogy az ugyanazon hatáshelyű, felszívódó hatóanyagokhoz köthető a fungicid rezisztencia kialakulása (Sörös, 2019; Internet 9.).

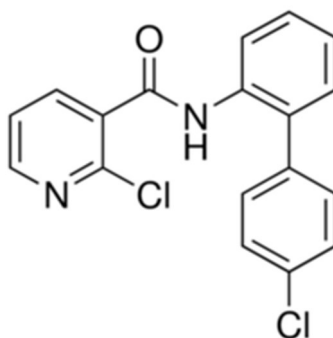
A gombaölő hatóanyagokat a Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), különböző kódok alapján csoportokba sorolja (3. táblázat), hogy segítséget nyújtson a rezisztencia és keresztrezisztencia kialakulás kockázatának csökkentéséhez (Internet 9., Internet 10.).

3. Táblázat: Hatóanyagok csoportosítása FRAC, 2021 alapján (Internet 10.)

Célzott hatáshelyű (specifikus) hatóanyagok				
Légzésgátlók				
Hatáshely	Kémiai csoport	Hatóanyag	FRAC kód	Megjegyzés
Mitokondriális Komplex II. szukcinát-dehidrogenáz-inhibitorok (SDHI)	piridin - karboxamidok	boszkalid	7	Rezisztencia és kereszt rezisztencia kialakulhat. Közepes és magas rezisztencia kockázat.
	piridinil-etil-benzamidok	fluopiram		
Mitokondriális Komplex III. quinone-outside-inhibitorok (QoI)	metoxi-akrilátok	azoxistrobin piraklostrobin	11	Rezisztencia és kereszt rezisztencia kialakulhat. Magas rezisztencia kockázat.
Szteroid-bioszintézist gátlók (SBI)				
C14-demetiláz gátlók (DMI)	Triazolok	tebukonazol	3	Rezisztencia és keresztrezisztencia kialakulhat. Közepes rezisztencia kockázat.

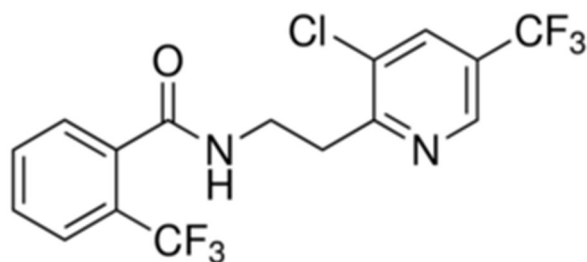
2.11.1. Mitokondriális Komplex II. inhibitorok (SDHI)

Az SDHI csoportba tartozó hatóanyagok, a szukcinát-dehidrogenáz enzim gátlásával fejtik ki hatásukat. A savamid csoport ezen vegyületek toxofór csoportja, ami elektronszívó csoportot tartalmazó karbonsavrészből, valamint lipofil karakterű anilinrészből tevődik össze. Egyik ilyen napjainkban is engedélyezett hatóanyag, a 2003-ban megjelent boszkalid (CAS 188425-85-6) (**4. ábra**). A boszkalid egy harmadik generációs SDHI, a piridin–karboxamidok első képviselője. Ismeretlen okokból az aszkuszos gombákra is kifejti hatását (**Sörös, 2019**).



4. ábra: A boszkalid kémiai szerkezete (Internet 11.)

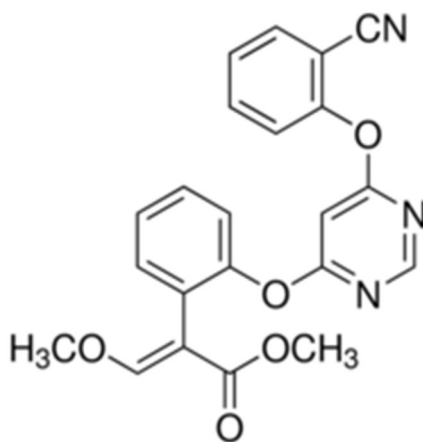
A fluopiram (CAS 659743-90-5) (**5. ábra**) az SDHI csoporton belül egy új kémiai alosztály, a piridinil-etil-benzamidok közé tartozik. Széles hatásspektrumú fungicid hatóanyag. Kedvező tulajdonsága a meglehetősen gyors transzlokáció a növényben. A strobilurinokhoz hasonlóan növeli a növényi sejtek klorofill tartalmát (**Sörös, 2019**). További kísérletek kimutatták kiváló nematocid hatását is (**Spinks *et al.*, 2020**).



5. ábra: A fluopiram kémiai szerkezete (**Internet 12.**)

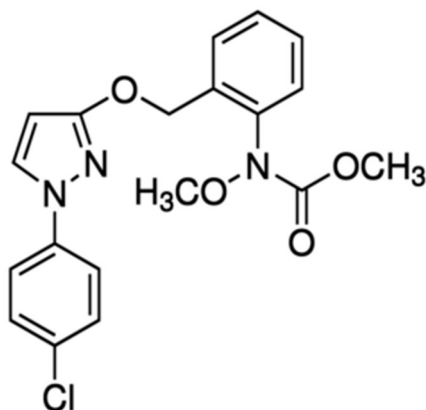
2.11.2. Mitokondriális Komplex III. inhibitorok (QoI)

A mitokondriális Komplex III. inhibitorok a légzési lánc quinone-outside régiójához kötődve fejtik ki gátló hatásukat. A QoI csoportba tartozó szintetikus hatóanyagokat, a *Strobilurus tenacellus* gomba strobilurin-A másodlagos metabolitjából állítják elő (**Sörös, 2019**). A lassú felszívódásuk következtében jó preventív hatással is rendelkeznek, gátolják a növény felszínén a gombaspórák csírázását. Az invázió során a megtelepedett kórokozót is elpusztítják kuratív és eradikatív hatásuk miatt (**Ypema és Gold, 1999**). Ilyen szintetikus vegyület az azoxistrobin (CAS 131860-33-8) (**6. ábra**) is. A kedvező szisztémikus tulajdonságát a növényben gyenge savvá hidrolizálódó észter csoportnak köszönheti a hatóanyag (**Sörös, 2019**).



6. ábra: Az azoxistrobin kémiai szerkezete (**Internet 13.**)

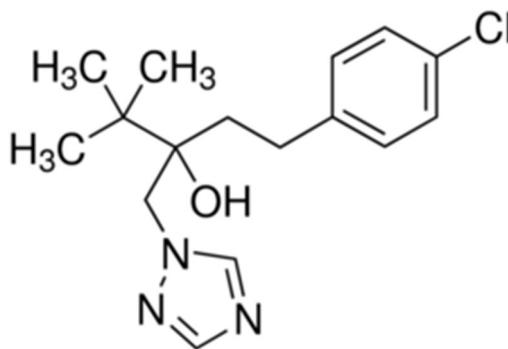
A piraklostrobin (CAS:175013-18-0) (**7. ábra**) a xilémben lezajló transzlokáció mellett transzlaminárisan is mozog. Gombaölő hatásán túlmenően, gátolja az öregedési folyamatokat a növényben. A peroxidáz aktivitás a piraklostrobinnal kezelt növényekben csaknem megkétszereződött enzimatis aktivitást mutatott, ami hozzájárulhat a stressz toleranciához. Ez a hatás, amelyet öt nappal a fungicid kezelés után állapítottak meg, több mint négy hétig fennmaradt (Köehle *et al.*, 2003).



7. ábra: A piraklostrobin kémiai szerkezete (Internet 14.)

2.11.3. C14-demetiláz gátlók (DMI)

A szteroidok *de novo* szintézisére az aszkuszos és bazídiumos gombák képesek. Az ergosterol bioszintézis gátlása révén a sejtmembrán szétesik, további sejtek nem képződnek. Ezen hatásmechanizmus alapján fejti ki hatását a tebukonazol (**8. ábra**). A triazolok csoportjába tartozó fungicid hatóanyag kémiai szerkezetére jellemző a gyenge savi karakterű alkoholos hidroxil csoport, amely floém szisztémikus kinetikát tesz lehetővé a hatóanyagnak a növényben (Sörös, 2019).



8. ábra: A tebukonazol kémiai szerkezete (Internet 15.)

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgálatok helyszíne és ideje

A plenodómuszos betegség tüneteit mutató vegetatív növényi részeket (**9. ábra**) 2021. május 30-án Tamási, valamint 2021. július 12-én Gyékényes térségében lévő üzemi repcetáblákról gyűjtöttem. A mintákat a MATE Budai Campus Növénykórtani Tanszék laboratóriumába szállítottam, ahol a kórokozók izolálását és a fungicid hatóanyagokkal kapcsolatos *in vitro* vizsgálatokat 2021. augusztusában és szeptemberében végeztem.



9. ábra: A plenodómuszos betegség jellegzetes tünetei őszi káposztarepce levelén
(Fotó: Csik Ádám, 2021)

A két helyszínről összesen 31 esetben izoláltuk a plenodómuszos betegség valamelyik kórokozóját, melyek közül 5 db izolátumot választottunk ki a hatóanyagokkal végzett vizsgálatokhoz (**4. táblázat**).

4. táblázat: Az izolátumok neve, származása, gyűjtési helye és ideje

Izolátum neve	Gyűjtés időpontja	Származási helye	Hibrid neve	Növényi rész
L279	2021.05.30.	Tamási	Hybrirock	levél
L280	2021.05.30.	Tamási	Hybrirock	levél
L291	2021.07. 12.	Gyékényes	Umberto KWS	szár
L295	2021.07. 12.	Gyékényes	Umberto KWS	szár
L308	2021.07. 12.	Gyékényes	Umberto KWS	szár

3.2. A minták gyűjtése, tárolása és feldolgozása

A tünetet mutató növényi részeket metszőollóval vágtam le, majd feliratozott papírzacskóba helyeztem és hűtőszekrényben 7 °C-on tároltam. A sporuláció elősegítésére a fertőzött leveleket és szárazakat, amelyeken szabad szemmel is látszódtak a piknídiumok, nedves kamrába helyeztem (**10. ábra**), majd három napig inkubáltam 24±3 °C-on, természetes fény mellett.



10. ábra: Fertőzött repceszárazak és levelek inkubálása nedves kamrában
(Fotó: Csik Ádám, 2021)

3.3. A kórokozók izolálása táptalajon, a tenyészetek jellemzése és fenntartása

A növényi mintákat Leica MZ6 sztereomikroszkóp segítségével vizsgáltam. Láng felett kihúzott üvegapillárisal leemeltem egy piknídium szájníylásából az előtörő konídium masszát, majd steril desztillált vízzel feltöltött mikrocentrifuga csövekbe mostam őket. A konídiumokat tartalmazó szuszpenziókból 100 ill. 200 µl-t szélesztettem lamináris fülkében (Thermo Scientific MSC 1.2) PDA (potato dextrose agar, burgonya dextróz agar, Biolab) táptalajon. A Petri-csészéket 24 °C-on, termosztátban inkubáltam, majd három nap elteltével a növekvő kolóniák átoltásával, monospórás (egykonídiumos) tenyészeteket állítottam elő.

A tenyészetek morfológiai tulajdonságait 28 nap után jellemeztem. Feljegyeztem a tenyészetek általános morfológiai jellemzőit (alak, szín, mintázottság stb.) Az izolátumokat a hatóanyagok *in vitro* teszteléséig PDA táptalajon tartottam fenn.

3.4. A kórokozó molekuláris azonosítása

Szakirodalmi ismeretek alapján a *P. lingam* és a *P. biglobosus* morfológiai bélyegek alapján történő azonosítása - a hasonló vagy átfedő tenyészbélyegek miatt - önmagában nem megbízható. Az izolált kórokozók fajsztintű meghatározását nukleinsav alapú, molekuláris módszerrel végeztük.

3.4.1. DNS kivonás CTAB módszerrel

Az össznukleinsav kivonásakor CTAB (hexadecil-trimetil-ammonium-bromid) módszert alkalmaztunk, ami egyszerű, gyors és alacsony költségű extrakciót tesz lehetővé. Bár más eljárásokhoz képest viszonylag alacsony hozamú, azonban meglehetősen jó minőségű DNS nyerhető ki ezzel a módszerrel (Zimmermann *et al.*, 1998).

A DNS kivonásához 12-18 napos tenyészeteket használtunk fel. Tenyészeteként, lamináris fülkében a gomba micéliumból 1 cm² darabot vágunk ki, majd steril dörzsmozsárban kvarchomok hozzáadásával roncsoltuk és homogenizáltuk. A mintához 700 µl CTAB (Duchefa Biochemier, Hollandia) puffert (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl pH: 8, 0,2% 2-ME) adtunk, és tovább dörzsöltük a mozsárban. Az elegyet mikrocentrifuga csövekbe töltöttük és asztali termosztátban 45 percen keresztül 65 °C-on inkubáltuk. A következő lépésben a nukleinsavakat tisztítottuk a szennyeződésektől, fehérjéktől. Az elegyet 700 µl izoamilalkoholos-kloroform 1:24 arányú elegyével összeráztuk, vortexeltük, majd 10 percen keresztül centrifugáltuk szobahőmérsékleten. A puffert és a nukleinsavakat tartalmazó felső fázist egy tiszta mikrocentrifuga csőbe pipettáztuk. Ezt a lépést megismételtük, majd a nukleinsavak denaturálása következett 600 µl izopropanol hozzáadásával. 5 perc centrifugálást követően a felső fázist leöntöttük. A visszamaradt üledéket 1 ml 70%-os etanollal mostuk, majd 5 perc centrifugálás után a felső fázist ismét leöntöttük. A visszamaradt üledéket 15 percig szikkasztottuk és vákuum koncentrátorral beszáritottuk. Utolsó lépésként az RNS-ek lebontása következett: a pelletet 50 µl 10 µg/ml RNase-t tartalmazó TE oldatban szuszpendáltuk (Maniatis *et al.*, 1989 alapján módosításokkal).

3.4.2. Multiplex polimeráz-lánreakció (PCR)

A multiplex PCR eljárás során a fajok azonosítása a keletkező PCR termék hosszúsága alapján történik. A reakcióhoz szükséges indító szekvenciákat Liu és munkatársai (2006) tervezték, mely alkalmas a két *Plenodomus* faj gyors és megbízható elkülönítésére. A primerszett egy univerzális reverse (LmacR) és két fajspecifikus forward primert (LmacF_ *P. lingam*, LbigF_ *P. biglobosus*) tartalmaz. A primerek segítségével a kórokozók ITS régiói és az 5,8 rRNS gén sokszorozódik meg a polimeráz lánreakció során. A fajszintű meghatározás a PCR termék mérete alapján lehetséges. A *P. lingam* esetén 331 bázispár hosszúságú, míg a *P. biglobosus* esetén 444 bázispár hosszúságú célszekvencia keletkezik.

A multiplex PCR-hez a következő komponenseket mértük össze:

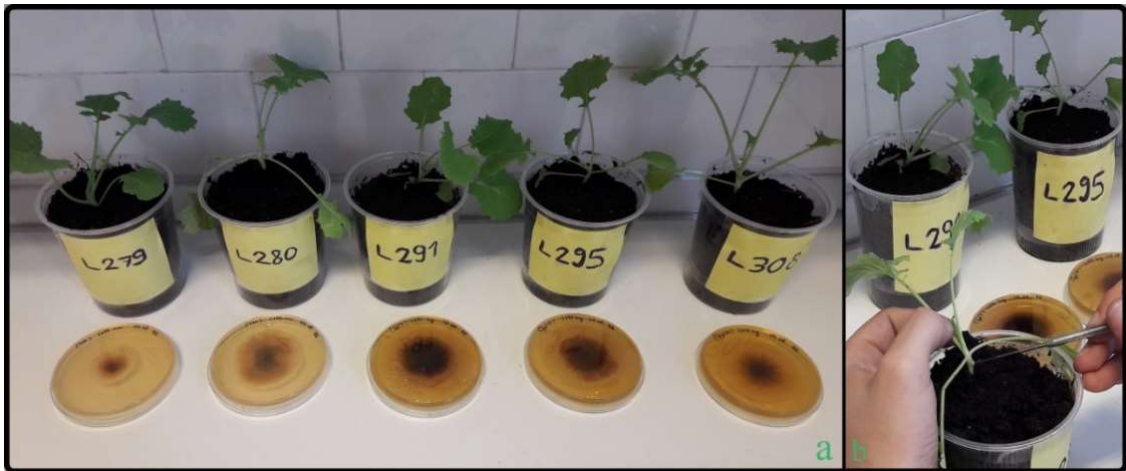
- 33,5 µl steril desztillált víz
- 3 µl DNS
- 3 µl MgCl₂ (20mM)
- 0,5 µl DreamTaq polimeráz enzim (5 U/µl)
- 5 µl 10x-es DreamTaq puffer
- 2 µl 5 mM dNTPs (DNS nukleotidok: Adenin, Guanin, Timin, Citozin),
- 1 µl LmacR (5'-GCAAAATGTGCTGCGCTCCAGG-3') (20 pmol/µl)
- 1 µl LmacF (5'-CTTGCCCAACCAATTGGATCCCCTA-3') (20 pmol/µl)
- 1 µl LbigF (5'-ATCAGGGGATTGGTGTTCAGCAGTTGA-3') (20 pmol/µl)

A PCR protokoll:

Az elődenaturáció 95 °C-on 3 percre tartott. A ciklusokon belül a DNS szálak megfelelő szétválasztásához az elegyet 95°C-on 15 mp-ig denaturáltuk. Következő lépésben hűteni kell a reakcióelegyet, az oligonukleotid szekvenciák (primerek) felkapcsolódásához. Az anellációt 70 °C-on 30 mp-ig végeztük. A ciklus utolsó lépése az ún. elongáció (lánc hosszabítás), mely során a reakcióelegy 72°C-ra való felmelegítése történt 60 mp-en keresztül. A lépések 30 cikluson keresztül ismétlődtek. Majd a terminális elongáció 72 °C-on további 10 percet vett igénybe. A készülék a PCR-termékeket 4 °C-on tárolta. A PCR eredményét 1%-os agaróz gélen gélelektroforézissel ellenőriztük. Az agaróz gél Eco Safe Nucleic Acid Staining Solution festéket (Biocenter) tartalmazott. A PCR termék méretét 100 bp-os DNS létrához (Thermo Scientific) viszonyítva határoztam meg, fajszeniten azonosítva így az izolált kórokozókat.

3. 5. Az izolált kórokozók patogenitásának vizsgálata

A fungicid hatóanyagokkal végzett vizsgálatokat megelőzően annak bizonyítására, hogy az izolátumok megbetegítő képesek, patogenitási tesztet végeztünk a Koch-posztulátumok alapján. A vizsgálatához csávázatlan vetőmagból növényeket neveltem, melyeket kb. 3-5 leveles állapotban mesterségesen fertőztünk. Steril lándzsátűvel a cserepes repce növényeink szárát óvatosan megsebeztem (**11. ábra**), majd az izolátumok monospóras tenyészeiből micéliumdarabokat helyeztünk a sebzési pontokba. A kontroll növényeket a steril PDA koronggal inokuláltuk. A fertőzési pontot parafilmrel zártuk le, majd szobahőmérsékleten 24±3 °C-on természetes fény mellett inkubáltuk a növényeket. A patogenitási teszt eredményét 6 nap elteltével értékeltük



11. ábra: Patogenitási teszt: a fiatal repce növények mesterséges fertőzése
(Fotó: Csik Ádám (a), Bagi Bianka (b) 2021)

3.6. Fungicid hatóanyagok tesztelése a kórokozók micélium növekedésére

A hatóanyagok tesztelésére sorozathígítási, mérgezett agarlemez módszer alkalmaztunk (**12. ábra**). A vizsgálat alkalmas a kórokozók micélium növekedésére gyakorolt hatásának értékelésére, valamint az esetleges hatékonyságcsökkenés kialakulásának megállapítására. A vizsgálat során tiszta hatóanyagokkal dolgoztunk (**5. táblázat**).



12. ábra: Sorozathígítási mérgezett agarlemez elkészítése
(Fotó: Petróczy Marietta, 2021)

A hazánkban is engedélyezett boszkalid, fluopiram, azoxistrobin, piraklostrobin, valamint tebukonazol hatóanyagokat (**5. táblázat**) 2,10,20,30 mg/L-es koncentrációban (**6. táblázat**), 4 ismétlésben vizsgáltuk.

5. táblázat: A vizsgálatba vont fungicid hatóanyagok jellemző adatai

Hatóanyag neve	Gyártó	Oldószer	Hatás mechanizmus	A hatóanyagot tartalmazó növényvédő szer
boszkalid	Merck Kft.	izopropanol	SDHI	pl. Pictor Active, Cantus, Efilor
fluopiram	Merck Kft.	metanol	SDHI	pl. Eldorado, Propulse
azoxistrobin	Merck Kft.	metanol	QoI	pl. Amistar Gold, Mirador Forte
piraklostrobin	Merck Kft.	izopropanol	QoI	pl. Picasso Active, Pictor Active
tebukonazol	Merck Kft.	izopropanol	DMI	pl. Andromeda, Fezan, Mirador Forte

A PubChem adatbázis szerint ezek a hatóanyagok vízben nem, vagy csak nagyon gyengén oldódnak (**Internet 16.**), ezért az adatbázis alapján, a hatóanyagtól függően izopropanolt vagy metanolt használtunk oldószerként.

A PDA (Biolab Magyarország) táptalajt a gyártó utasítása szerint készítettem el. 39 g PDA-t 1 liter desztillált vízzel összemértem, majd autoklávban sterilizáltam kb. 121 °C-on, 30 percen keresztül.

A PDA-hoz hatóanyagoként törzsoldatot készítettünk. Mikrocentrifuga csövekbe 0,0001 g pontosságú precíziós mérlegen mértük ki a hatóanyagokat, majd a feloldáshoz szükséges oldószert pipettával adtuk hozzá. Négy Erlenmeyer lombikot feltöltöttünk 250 ml steril, folyékony PDA táptalajjal, majd megvártuk, hogy kézmelegre hűljön, ezután hozzámértük a hatóanyagot tartalmazó törzsoldatot 2, 10, 20, 30 mg/L-es koncentrációban. A mérgezett táptalajt 85 mm átmérőjű műanyag Petri-csészékbe öntöttem (20 ml/ Petri csésze). A mérgezett agarlemezek közepére 16-18 napos tiszta tenyészetekből 5 mm átmérőjű micélium korongokat helyeztem.

A hatóanyagok gátló hatását kétféle kontrollhoz hasonlítottuk. Az oldószert és hatóanyagot nem tartalmazó kontroll mellett, annak kizárására, hogy az alkalmazott oldószerek befolyásolják a kórokozók növekedését, elkészítettük az oldószert tartalmazó kontrollt is. A Petri-csészéket feliratoztuk, parafilmmel lezártuk, majd 24 °C-on, termosztátban inkubáltuk.

6. táblázat: Hatóanyagok feloldása oldószerben, a készített elegyek koncentrációja, valamint az adott koncentrációhoz szükséges törzsoldat összetevői

Hatóanyag	Hatóanyag feloldódása oldószerben (g/L)	Vizsgált elegy koncentrációja (mg/L)	Törzsoldat	
			Hatóanyag mennyisége (mg)	Oldószer mennyisége (μl)
boszkalid	10g boszkalid / 1 liter izopropanol (Internet 17.)	2mg/1 liter PDA	2 mg	200 μl
		10mg/1 liter PDA	10 mg	1000 μl
		20mg/1 liter PDA	20 mg	2000 μl
		30mg/1 liter PDA	30 mg	3000 μl
fluopiram	250 g fluopiram / 1 liter metanol (Internet 18.)	2mg/1 liter PDA	2 mg	8 μl
		10mg/1 liter PDA	10 mg	40 μl
		20mg/1 liter PDA	20 mg	80 μl
		30mg/1 liter PDA	30 mg	120 μl
azoxistrobin	20 g azoxistrobin / 1 liter metanol (Internet 19.)	2mg/1 liter PDA	2 mg	100 μl
		10mg/1 liter PDA	10 mg	500 μl
		20mg/1 liter PDA	20 mg	1000 μl
		30mg/1 liter PDA	30 mg	1500 μl
piraklostrobin	30 g piraklostrobin / 1 liter izopropanol (Internet 20.)	2mg/1 liter PDA	2 mg	66,67 μl
		10mg/1 liter PDA	10 mg	333,33 μl
		20mg/1 liter PDA	20 mg	666,67 μl
		30mg/1 liter PDA	30 mg	1000 μl
tebukonazol	100 g tebukonazol / 1 liter izopropanol (Internet 21.)	2mg/1 liter PDA	2 mg	20 μl
		10mg/1 liter PDA	10 mg	100 μl
		20mg/1 liter PDA	20 mg	200 μl
		30mg/1 liter PDA	30 mg	300 μl

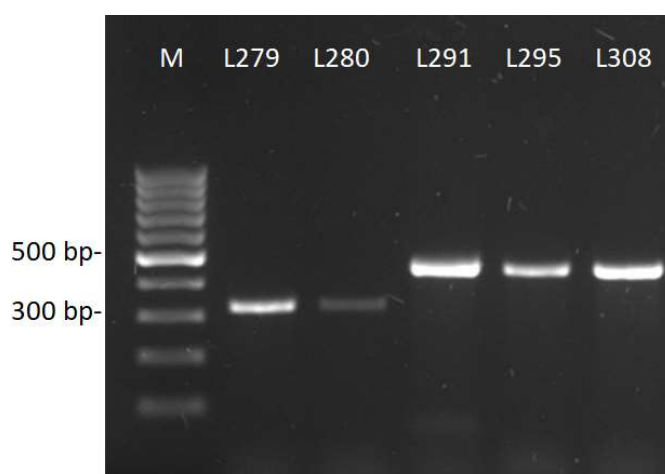
A tenyészetek növekedését a leoltás utáni 10. napig kísértem figyelemmel. A tenyészetek átmérőjét a 3., 7. és 10. napon vonalzóval mértem meg mm pontossággal, mérésenként kétszer, egymásra merőlegesen. A továbbiakban a két érték átlagával dolgoztam. A tenyészetek változását fényképekkel is dokumentáltam. A kapott adatokat Microsoft Excel programmal értékeltük és ábráztuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A kórokozók azonosítása molekuláris módszerekkel

A repce leveleiről származó L279-es és L280-as izolátumok esetében a gélelektroforézis eredménye alapján - kb. 330 bp hosszúságú PCR termék keletkezett (**13. ábra**), ezért a kórokozót *Plenodomus lingam*-ként határoztuk meg.

Az L291-es, L295-ös, L308-as izolátumok esetében a gélelektroforézis kb. 450 bp hosszúságú PCR termékek jelenlétét mutatta az agaróz gélben (**13. ábra**), így megállapítható, hogy a repce szárából izolált kórokozók a *P. biglobosus* fajhoz tartoznak.



13. ábra: *Plenodomus* izolátumok fajszerű azonosítása a PCR-t követő gélelektroforézissel
(Fotó: Csik Ádám 2021)

4.2. Az izolált kórokozók tenyésztési jellemzői

Az izolátumok tenyésztési jellemzőit PDA táptalajon a leoltást követő 28. napon dokumentáltuk (**14. és 15. ábra**). A *P. lingam* és a *P. biglobosus* tenyészetek színbeli eltérést mutattak, valamint a *P. lingam* esetében a két izolátum között is különbségeket figyeltünk meg.

Az L279-es *P. lingam* izolátum esetében a micélium szabályos kör alakban növekedett. A tenyészet széle enyhén hullámos, színi oldalán a leoltási pont körül a micélium szürkésfehér, a leoltási ponttól kifelé haladva világosodik. A tenyészetben foltoszerű, világos színű légmicélium-növekedés figyelhető meg. A fonáki oldalán a leoltási pont körül a tenyészet sötétbarna színű, majd kifelé haladva barnássárgává válik (**14. ábra**).

Az L280-as *P. lingam* micéliuma szabálytalan kör alakban növekedett. A színi oldalon a leoltási pont körül barnás színű, kifelé haladva szürkésfehér dús légmicélium képződik. Fonáki oldalán a telep színe egységes sötétbarna, csak a szegélye kivilágosodik (**14. ábra**).



14. ábra: *P. lingam* (L279, L280) 28 napos tenyésze PDA táptalajon
(Fotó: Csik Ádám 2021)

A *Plenodomus biglobosus* morfológiailag egymáshoz nagyon hasonló telepeket képzett **(15. ábra)**. A telepek szabályos kör alakban növekedtek, színi oldalukon a micélium színe szürkésfehér. A micélium az átoltás helyétől kifelé világosodik, a telep szélén a micélium lazább szerkezetű. A telepek fonákján sötétbarna elszíneződés tapasztalható az átoltási pont körül, majd kifelé haladva a telepek szegélye narancsos színű a pigment képződés miatt.



15. ábra: *P. biglobosus* (L291, L295, L308) 28 napos tenyésze PDA táptalajon
(Fotó: Csik Ádám 2021)

4.3. Patogenitási teszt

A mesterségesen megfertőzött cserepes repce növényeken 4 nap eltelte után már a betegségre jellemző tünetek jelentkeztek **(16. ábra)**. Az inokulálás pontja fölötti levelek sárgulni kezdtek. A 6. napon az L280-as, L291-es, L295-ös, L308-as tenyészet micéliumával inokulált növények lankadtak és elpusztultak. Az L279-es izolátum micéliumával inokulált növény az inokulációt követő 9. napon szintén elpusztult. A repce növények szárán a fertőzési pont körül barna színű szövetelhalás alakult ki.

A kontroll növényen az értékelés napjáig a betegségre jellemző tünet nem jelent meg.

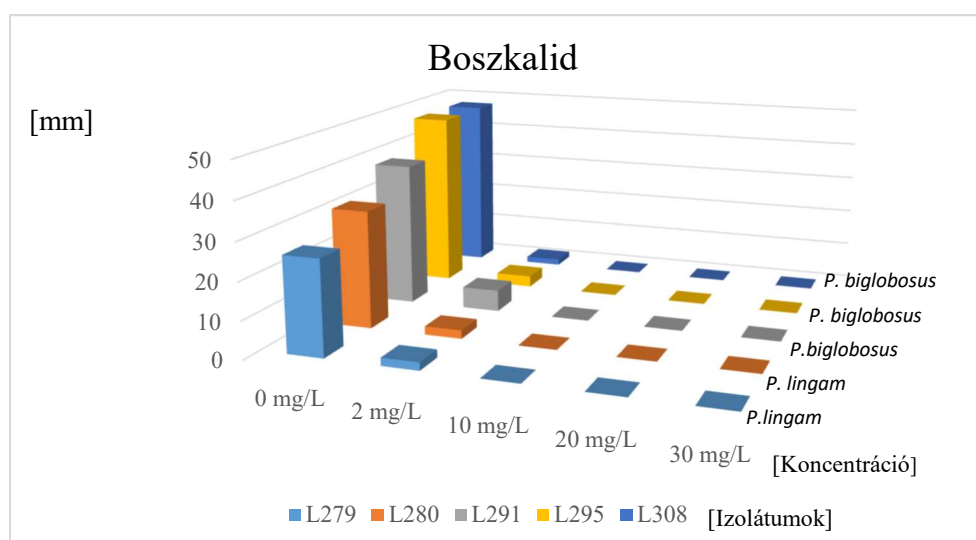


16. ábra: *Plenodomus* izolátomokkal fertőzött repce növények az inokulálást követő 6. napon
(Fotó: Csik Ádám 2021)

4.4. Fungicid hatóanyagok *in vitro* tesztelése a *Plenodomus* izolátumok micélium növekedésére

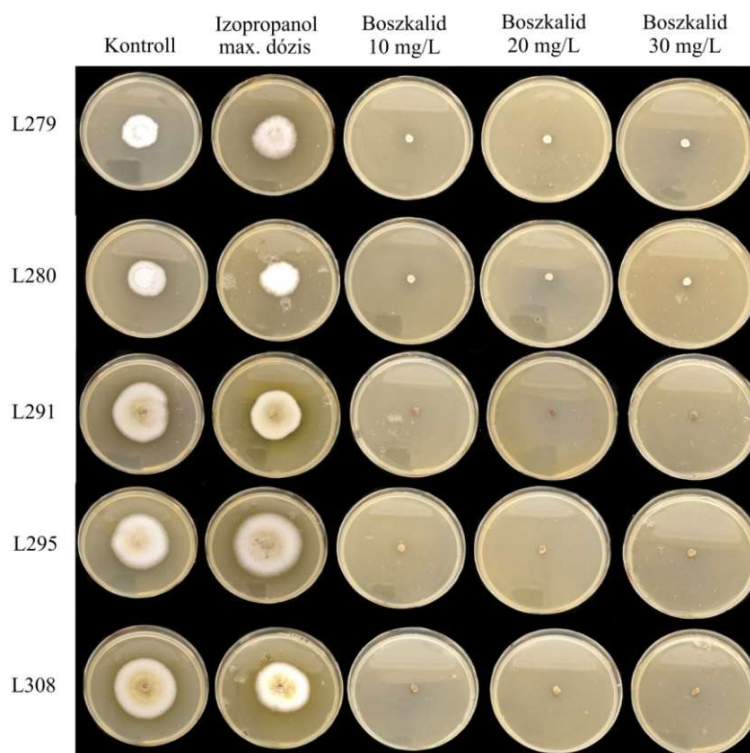
4.4.1. Boszkalid

Az SDHI hatástani csoport tagjaként a boszkalid hatékonyan gátolta a vizsgált *Plenodomus* izolátumok fejlődését a mérgezett agarlemezeken (**17. ábra**). A 10, 20, 30 mg/L-es koncentrációkban a hatóanyag teljesen gátolta a micéliumnövekedést mind a két kórokozó esetében (**18. ábra**). A legkisebb, 2 mg/L-es dózisban mind a két faj tenyészetei kis mértékben növekedésnek indultak. A kontrollhoz viszonyítva a *P.lingam* telepek átmérője átlagosan 93%-kal, a *P. biglobosus* telepek átmérője pedig 92%-kal csökkent a 2 mg/L-es koncentráció esetében.



17. ábra: A boszkalid hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micélium növekedésére
a 10. napon

Az oldószerként alkalmazott izopropanol a legmagasabb alkalmazott dózisban (3000 µl/L) sem befolyásolta a *Plenodomus* izolátumok fejlődését (15. ábra), Növekedés üteme megegyezett a kontrollal, így a gátló hatás kizárólag a boszkalid hatóanyagnak tulajdonítható.

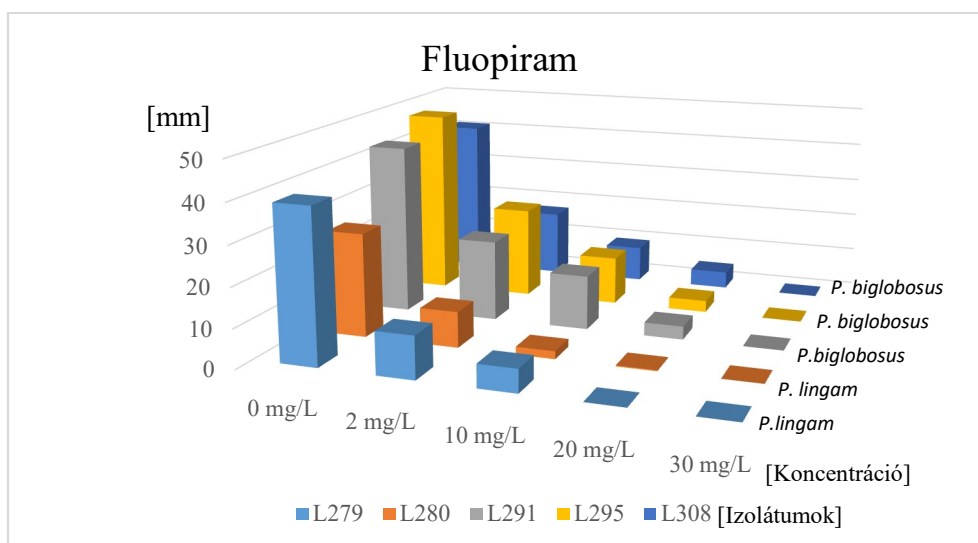


18. ábra: *Plenodomus* izolátumok növekedése izopropanol, ill. boszkalid tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon
(Fotó: Csik Ádám 2021)

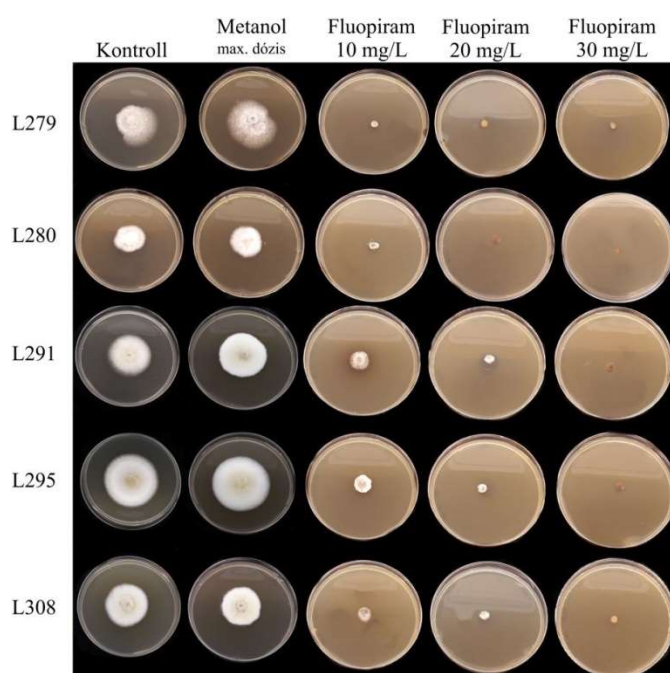
4.4.2. Fluopiram

A fluopiram (SDHI) hatékonysága dózisonként és fajonként is különbözött (19. és 20. ábra). A legmagasabb, 30 mg/L-es koncentrációban, minden izolátum esetében fungicid hatást figyeltünk meg. Az alacsonyabb, 20 mg/L-es dózisban a *Plenodomus lingam* tenyészetek micélium növekedése szintén teljesen gátolt volt valamennyi izolátumnál, azonban a *P. biglobosus* fajhoz tartozó L291-es, L295-ös és L308-as izolátumok növekedésnek indultak (19. és 20. ábra). 20 mg/L-es dózis használatakor a *P. biglobosus* átlagos telepátmérője a kontroll telepátmérőjének 8,2% -át érte el. A 10- és 2 mg/L-es koncentráció esetében is megfigyelhető a két faj közötti különbség, viszont a magasabb koncentrációktól eltérően a 10- és 2 mg/L-es dózis használatakor a *P. lingam* telepek micéliumnövekedése is elindult. 10 mg/L-es dózist alkalmazva a *P. lingam* telepek átmérője a kontroll 14%-át, a *P. biglobosus* telepek átmérője a kontroll 27%-át érte el a 10. napon. A 2 mg/L-es koncentrációban a *P. lingam* tenyészetek

átlagosan 31%-os, a *P. biglobosus* tenyészetek átlagosan 46%-os telepátmérőt értek el a kontrollhoz képest.



19. ábra: A fluopiram hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micélium növekedésére a 10. napon



20. ábra: *Plenodomus* izolátumok növekedése metanol, ill. fluopiram tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon

(Fotó: Csik Ádám 2021)

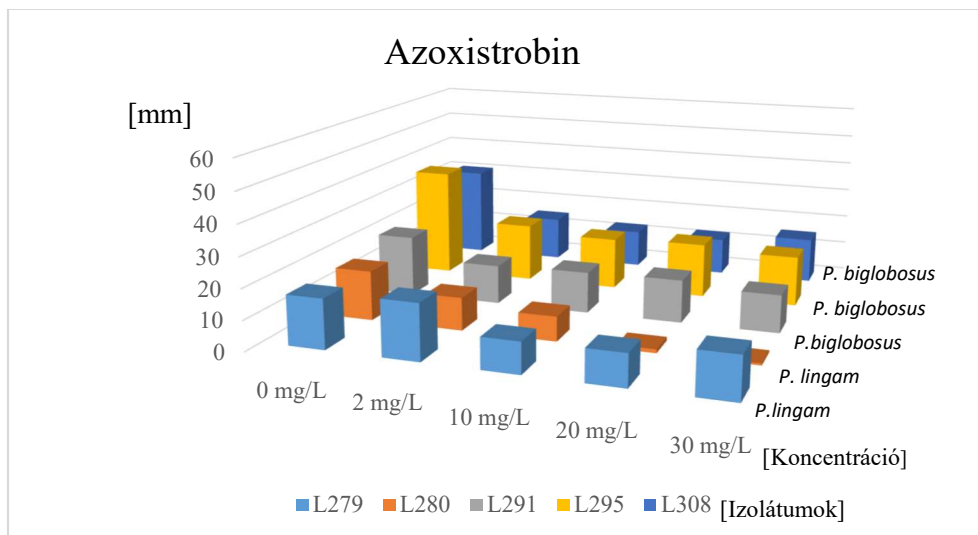
A fluopiram oldószereként használt metanol a legmagasabb alkalmazott dózisban (1500 µl/L) sem befolyásolta *Plenodomus* izolátumok fejlődését (20. ábra). A növekedés üteme megegyezett a hatóanyagot és oldószert nem tartalmazó kontrollal, így a sorozathígítás során tapasztalt gátló hatás kizárólag a fluopiram hatóanyagnak tulajdonítható.

4.4.3. Azoxistrobin

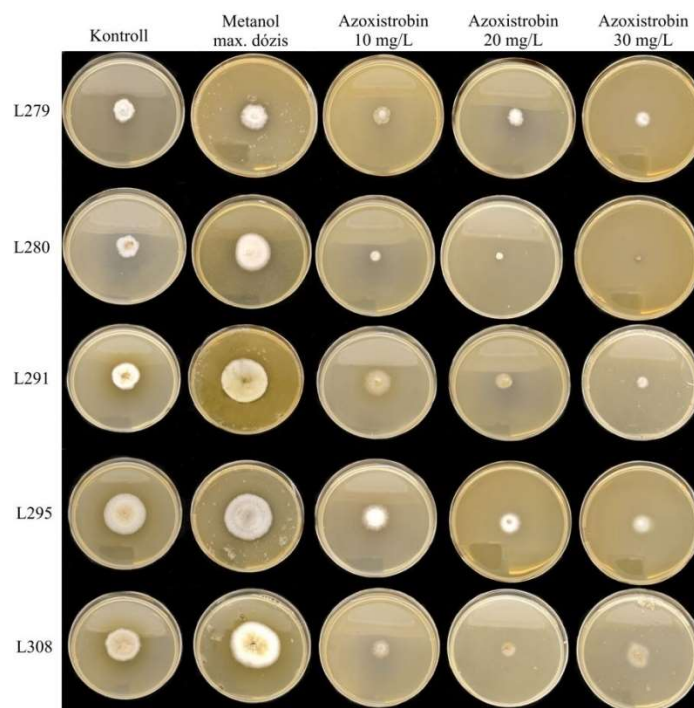
A QoI hatástani csoportba tartozó azoxistrobin hatóanyag az izolátumok többségére (az L280-es *Plenodomus lingam* izolátum kivételével) egyik vizsgált koncentrációban sem bizonyult gombaölő hatásúnak, csak gyenge fungisztikus hatást figyeltünk meg (21. és 22. ábra).

A *P. biglobosus* izolátumok telepátmérője koncentrációnként számottevően nem változott az azoxistrobin tartalmú mérgezett agarlemezeken: A telepek átmérője átlagosan 45%-ban maradt el a kontrollhoz képest. Egyedül az L280-as *P. lingam* izolátum mutatkozott érzékenynek a hatóanyag két magasabb dózisára. A kórokozó növekedése 20 mg/L-es koncentrációban 92,5%-kal, 30 mg/L koncentrációban 96%-kal maradt el a kontrollhoz képest.

A két faj közül összességében a *P. biglobosus* ellenállóbbnak tűnik a hatóanyaggal szemben, a mérgezett táptalajon a tenyészetek átlagos átmérője nagyobb volt a *P. lingam* tenyészetekéhez képest. Az oldószerként használt metanol nem befolyásolta az izolátumok növekedését a táptalajon (22. ábra).



21. ábra: Az azoxistrobin hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micélium növekedésére a 10. napon



22. ábra: *Plenodomus* izolátumok növekedése metanol, ill. azoxistrobin tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon

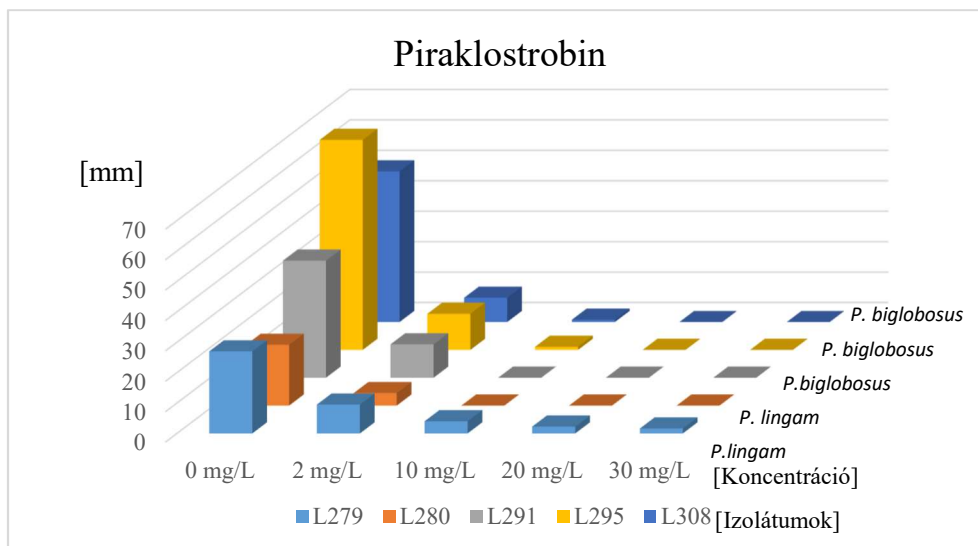
4.4.4. Piraklostrobin

A piraklostrobin (QoI) 10, 20, 30 mg/L-es koncentrációiban fungicid hatást figyeltünk meg az összes *Plenodomus biglobosus* izolátum esetében, valamint az L280-as *P. lingam* izolátumnál is (23. és 24. ábra).

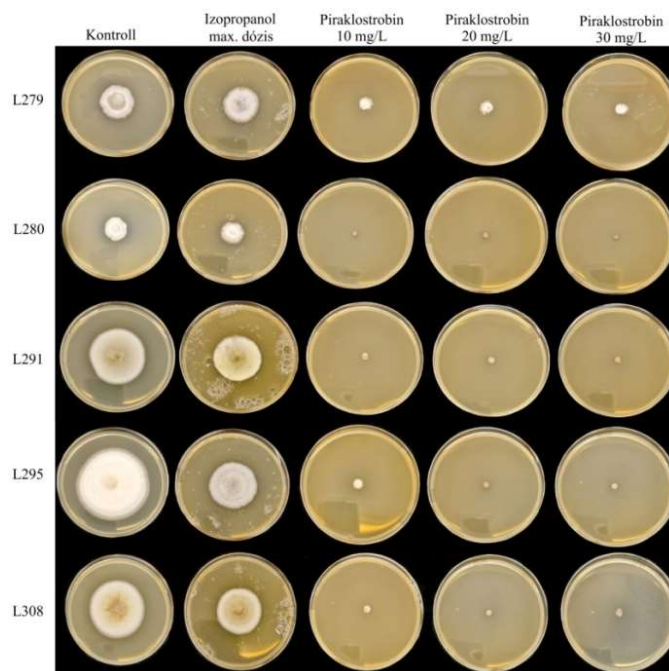
Az L279-es *P. lingam* izolátum azonban a legmagasabb (30 mg/L-es) dózist alkalmazva is növekedésnek indult a mérgezett agarlemezek felszínén, bár a tenyészet átmérője 94%-kal kisebb volt a kontrollhoz viszonyítva.

A 2 mg/L-es dózis esetében a *P. lingam* izolátumok telepátmérője átlagosan 72%-kal, a *P. biglobosus* telepek átlagosan 80%-kal maradtak el a kontrollhoz képest.

Az oldószerként alkalmazott izopropanol a legmagasabb alkalmazott dózisban (3000 µl/L) sem befolyásolta a *Plenodomus* izolátumok fejlődését (24. ábra), így a gátló hatás kizárólag a piraklostrobin hatóanyagnak tulajdonítható.



23. ábra: A piraklostrobin hatékonysága a *Pleurotus* izolátumok micélium növekedésére a 10. napon



24. ábra: *Pleurotus* izolátumok növekedése izopropanol, ill. piraklostrobin tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon
(Fotó: Csik Ádám 2021)

4.4.5. Tebukonazol

A DMI hatástani csoportba tartozó tebukonazol izolátumonként és dózisonként eltérő hatékonyságot mutatott (25. és 26. ábra).

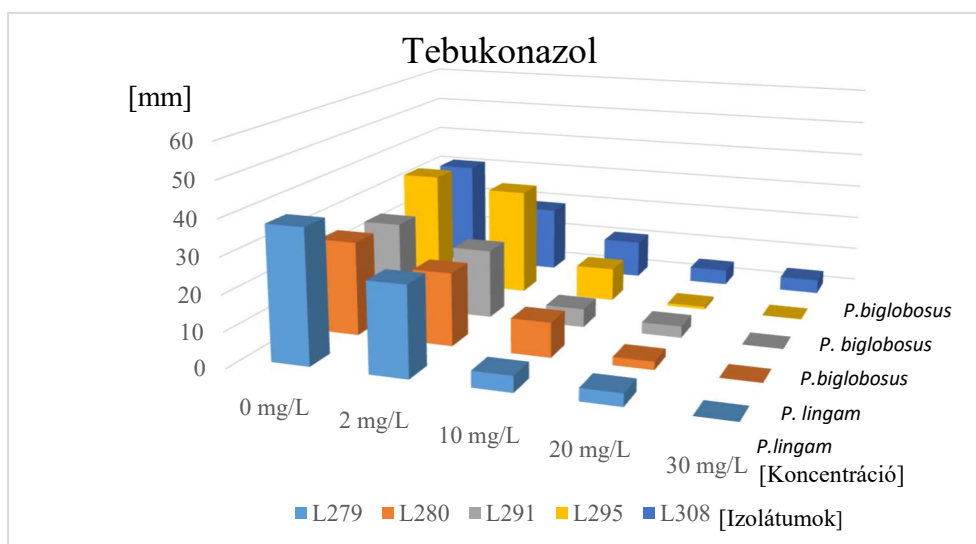
A 30 mg/L-es koncentrációban az L279-es és az L280-as *P. lingam* izolátum, az L291-es, valamint az L295-ös *P. biglobosus* izolátum micélium növekedését teljes mértékben gátolta a hatóanyag. Az L308-as *P. biglobosus* izolátum még a legmagasabb vizsgált hatóanyagtartalom esetében is növekedésnek indult, bár a telep átmérője 89,5%-kal elmaradt a kontrollhoz képest.

A 20 mg/L-es dózis alkalmazásakor az átlagos telepátmérő közel azonos volt, mind a két faj tekintetében. Az izolátumok átmérője 92,5%-kal maradt el a kontrollhoz képest.

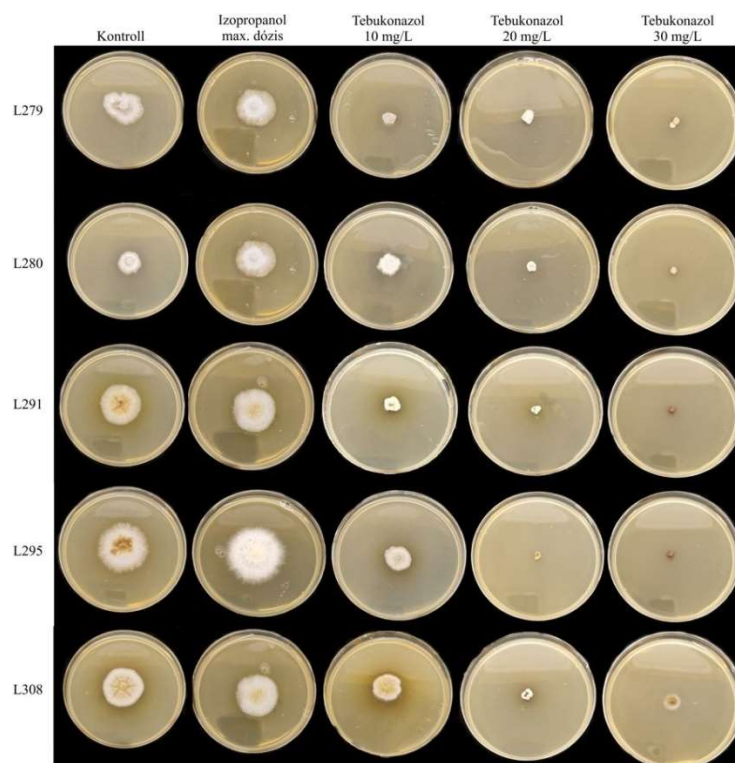
A 10 mg/L-es dózis alkalmazásakor a két faj között telepátmérőben 4% különbséget tapasztaltunk. A *P. lingam* tenyészetek átlagosan 81%-kal, a *P. biglobosus* tenyészetek átlagosan 77%-kal maradtak el a kontrollhoz képest.

A 2 mg/L-es dózis használatakor a *P. lingam* izolátumok telepátmérője átlagosan 62%-kal, a *P. biglobosus* izolátumok átmérője átlagosan 61%-kal maradt el a kontrolltól.

Az oldószerként alkalmazott izopropanol ebben az esetben sem volt hatással a *Plenodomus* izolátumok fejlődésére (26. ábra).



25. ábra: A tebukonazol hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micélium növekedésére a 10. napon



26. ábra: *Plenodomus* izolátumok növekedése izopropanol, ill. tebukonazol tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon
(Fotó: Csik Ádám 2021)

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK

Mindkét *Plenodomus* faj egyszerűen tenyésztethető táptalajon, ahogy azt **Boerema és mtsai. (2004)** említik tanulmányukban. A konídiumokat PDA táptalajon szélesztve a spórák 2-3 nap elteltével csíratömlőt és hífákat fejlesztettek. Az átoltást követően 10-14 nap elteltével már jól megfigyelhetők a jellegzetes tenyészbélyegek. A legszembetűnőbb határozóbélyeg a pigmentképzés, ami alapján a *P. biglobosus* izolátumok elkülönülnek a *P. lingam* tenyészetektől. A sárgásbarna színanyagképzésről számos tanulmány beszámol (**Boerema et al., 2004; Hong et al., 2009; Mitrovic et al., 2016**), az L291-es, L295-ös, L308-as izolátumok esetében mi is megfigyeltünk sárgásbarna, ill. narancssárgás pigmentációt. Ezeket az izolátumokat a multiplex pcr eredménye alapján is a *P. biglobosus* fajhoz soroltuk.

A **Liu és mtsai. (2006)** által tervezett primer alapján a két faj egyértelműen elkülöníthető egymástól a PCR termék hosszúsága alapján. Az eredeti cikkből tudjuk, hogy PCR során a *P. lingam* izolátumok esetén 331 bp hosszúságú, a *P. biglobosus* izolátumok esetén pedig 444 bp hosszúságú szakasz keletkezik. A gélelektroforézis alapján a termék pontos hosszúsága természetesen nem határozható meg, de ez az azonosítást nem befolyásolja.

A patogenitási tesztet sikeresen elvégeztük, bizonyítva a kórokozók megbetegítő képességét. Néhány éve, az új nemzetközi irányvonal szerint a megbetegítő képességet csak élő növényeket fertőzve lehet értékelni, a leválasztott növényi részek (pl. levelek) fertőzését a kutatások közlése során már nem fogadják el. Ezért repce növényeket neveltem a patogenitás igazolásához, melyeket 3-6 leveles korban fertőztünk. A megfertőzött repce növények mortalitása 100%-os az inokulálást követő 9 napon belül. A steril táptalajjal fertőzött kontroll növényen a vizsgálat napjáig nem jelentkeztek tünetek.

A hatóanyagok teszteléséhez 2 db *P. lingam* és 3 db *P. biglobosus* izolátumot választottunk ki. A *P. biglobosus* kórokozót 2018-ban izolálták először hazánkban (**Bagi és mtsai., 2020**). A vizsgálatunk során megállapított fungicid hatékonysági eredmények a *Plenodomus biglobosus* kórokozó kapcsán az első hazánkban. Vizsgálatunkhoz a NÉBIH által is használt és elfogadott mérgezett agarlemez vizsgálati módszert használtuk (**Internet 3.**). **Aponyiné és mtsai (2004)** szerint ez a módszer alkalmas a fungicid micélium növekedést, konídium csírázást befolyásoló hatásának elbírálására: ún. első, szkríning vizsgálatra és *in vitro* tenyésztethető kórokozók fungicid érzékenységi (rezisztencia) szintjének elbírálására. A módszer alapja, hogy a vizsgálandó készítménnyel ún. mérgezett agar-lemezt készítünk, és azon értékeljük a micélium növekedést, konídium csírázást. Szerettük volna a konídiumok csírázására is tesztelni a fungicid hatóanyagokat, azonban a két *Plenodomus* faj nagyon ritkán

sporulál táptalajon. A kiválasztott 5 izolátum esetében nem figyeltünk meg piknídiumokat sem a fiatal, sem az idősebb tenyészetekben. Konzulensem Bagi Bianka doktori kutatómunkája során több, mint 300 alkalommal izolált *Plenodomus* fajt repce növényről, közülük azonban csak 5-6 izolátum esetében figyelt meg piknídium képződést a táptalajon (**Bagi, 2021 szóbeli közlés**). **Mitrovic és munkatársainak (2016)** is azt említik, hogy csak egyes izolátumok esetén képződnek a tenyészetekben ivartalan szaporítóképletek, ennek okáról azonban nem tesznek említést. Ezért a hatóanyagok gátló hatását, csak a micélium növekedésére teszteltük.

Vizsgálataink során nem forgalomban lévő növényvédő szerekkel, hanem tiszta hatóanyagokkal dolgoztunk. Ennek oka, hogy ugyanaz a hatóanyag számos engedélyezett készítményben előfordul, legtöbbször más hatóanyaggal kombinációban, egyéb adjuvánsok és adalékanyagok mellett. Így nem lehetett volna a hatóanyagokról valós képet alkotni.

A legkiegyenlítettebb hatással a boszkalid rendelkezett: 10 mg/L hatóanyag tartalomig fungicid hatással bírt, valamennyi izolátum esetében. A 2 mg/L-es dózis esetén az izolátumok már növekedésnek indultak. A boszkalid hatóanyag megtalálható kombinációban a PictorActive, és az Efilor, vagy önmagában a Cantus nevű készítményben.

A fluopiram fungicid hatásához magasabb hatóanyag koncentráció szükséges (20 mg/L-es és a 30 mg/L dózis között). Azonban a kórokozók közül a *P. lingam* érzékenyebb a hatóanyagra mint a *P. biglobosus*.

A piraklostrobin fungicid hatású koncentrációja a boszkalidhoz hasonlóan a 2 mg/L-es és a 10 mg/L-es dózis között található, de az egyik *Plenodomus* izolátum (L279-es *P. lingam*) a vizsgált legmagasabb koncentrációban is növekedésnek indult. Ez előrevetíti azt, hogy a hazai populációban vélhetően lesznek olyan populációk, amelyek ellenállósággal rendelkeznek a hatóanyaggal szemben.

A strobilurin hatóanyagok kapcsán magas a rezisztencia kialakulásának kockázata (**Internet 10.**), ahogy számos más kórokozó kapcsán (*Erysiphe necator*, *Venturia inaequalis*) hazánkban is ismert a rezisztencia kialakulása a QoI hatóanyag csoporttal szemben. Érdekes a szintén ebbe a hatóanyagcsoportba tartozó azoxistrobin gyenge hatékonysága vizsgálataink során. A hatóanyagok hatásmechanizmusa nagyon hasonló, ezért a FRAC szerint a keresztrezisztencia kialakulásának kockázata nagy a strobilurin típusú vegyületeknél (**Internet 10.**), ez azonban eredményeinkből nem látszik. Az azoxistrobin a piraklostrobinnal ellentétben a vizsgált legmagasabb dózisban (30 mg/L) sem gátolta az izolátumok növekedését (kivéve az L280-as *P. lingam* izolátumot). A tebukonazol hatóanyag fungicid hatását a 20 és 30 mg/L-es dózis között lehet pontosan megállapítani. Azonban volt olyan *P. biglobosus* izolátum (L308) ami a 30mg/L-es dózissal is ellenállt. Fennáll a veszélye a rezisztens populációk

kialakulásának ennél a hatóanyagnál is, de összességében elmondható, hogy jelenleg hatékony a szer mind a két kórokozóval szemben.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az őszi káposztarepce termesztésekor a plenodómuszos betegség jelentős gazdasági kárt okoz a repcetermesztőknek.

A megbetegedést két, egymással közeli rokonságban álló kórokozó idézi elő: a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus*. A *P. lingam* hazai jelenléte és kártétele már évtizedek óta ismert, a *P. biglobosus*-t azonban csak néhány éve mutatták ki a hazai repcetáblákon. A *P. biglobosus* gomba esetében semmiféle hazai ismeret nem állt rendelkezésre a növényvédő szerek hatékonyságával kapcsolatban, viszont a külföldi tanulmányok arról számolnak be, hogy a két faj biológiája kissé eltérő, és a fungicidek különböző hatékonysággal működnek a kórokozók ellen.

Kutatásom során beteg növényi részeket gyűjtöttünk, ezekből állítottuk elő a kórokozók tiszta tenyészetét. A két kórokozót morfológiailag nehéz megkülönböztetni, pontos azonosítás csak molekuláris módszerek alkalmazásával lehetséges. Vizsgálataink során specifikus primerszel multiplex pcr tesztet végeztünk és megállapítottuk pontosan melyik kórokozó fertőzte meg a repce növényeket.

A kórokozók fungicidekkel szembeni érzékenységét mérgezett agarlemez módszerrel vizsgáltuk. Tiszta hatóanyagokkal dolgoztunk: boszkalid (SDHI), fluopiram (SDHI), azoxistrobin (QoI), piraklostrobin (QoI) és tebukonazol (DMI), hogy egyéb adjuváns ne befolyásolja az eredményeket. A hatóanyagokat 2, 10, 20 és 30 mg/L koncentrációban kevertük a PDA táptalajhoz. Eredményeinket a hatóanyagot nem tartalmazó kontrollal, valamint az oldószert tartalmazó kontrollal hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a két faj bizonyos hatóanyagokra eltérően reagál, valamint az izolátumok között is vannak különbségek, ami a hazai populációkban a rezisztencia kialakulásának kockázatát vetíti előre.

Természetesen sokkal teljesebb képet kaphattunk volna, ha több izolátummal és nagyobb ismétlésszámmal dolgozunk. Magasabb ismétlésszám esetén megbízható statisztika is illeszthető lett volna az eredményekre. Tiszta hatóanyaggal végezni a vizsgálatokat azonban nagyon költséges: ennek a néhány izolátumnak a tesztelése is több százezer forintba került. Ennek ellenére azt gondolom, hogy az eredmények gyakorlati szempontból is értékesek, mert meghatározható belőlük, hogy az egyes hatóanyagoknál melyek azok a koncentrációk, amelyek általában teljes gátlást okoznak és melyek azok, amiken már vélhetően elindul a kórokozók fejlődése, így a későbbi vizsgálatok ezekre az értékekre optimalizálva állíthatók be.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Növényvédelmi Intézet, Budai Campus, Növénykórtani Tanszék, munkatársainak, hogy támogattak és biztosították a kutatáshoz szükséges feltételeket.

Külön szeretném megköszönni konzulenseimnek, Dr. Petróczy Mariettának és Bagi Biankának, hogy szakmai tudásukkal és útmutatásaikkal segítették a dolgozat elkészítését.

A kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatta, a Tématerületi Kiválósági Program 2020- Intézményi Kiválóság Alprogram (TKP2020-IKA-12) növénynevelés, növényvédelemmel kapcsolatos kutatások tématerületi programja keretében.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Antal. J. (2005): Növény természetstan 2: Gyökér és gumós növények. Hüvelyesek olaj és ipari növények. Mezőgazda kiadó, Budapest. 575–676. ISBN: 9789632864402
2. Aponyiné G. I., Kis Gy., Magyariné L. N. (2004): Fungicid és baktericid vizsgálati módszertan. FVM Növény- és Talajvédelmi Főosztálya, Budapest 52–55.
3. Bagi, B., Nagy, C., Toth, A., Palkovics, L., Petroczy, M. (2020): *Plenodomus biglobosus* on oilseedrape in Hungary. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(2):345–351. DOI: <https://doi.org/10.14601/Phyto-11099>
4. Bousset, L., Ermel, M., Lebreton, L. (2018): The full life cycle of *Leptosphaeria maculans* completed on inoculated oilseedrape incubated undercontrolled conditions. *Plant Pathology*, 67(6): 1321–1328. <https://doi.org/10.1111/ppa.12853>
5. Boerema, G. H., Gruyter J., Joordeloos M. E., Hamers M., (2004): *Phoma* indentification manual, differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. 320–386. ISBN: 085199743
6. Dawidziuk, A., Popiel, D., Jędryczka, M. (2013): The influence of *Trichoderma* species on *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* growth on agar media and in oilseedrape plants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 92: 119–126.
7. Eckert, M. R., Rossall S., Selley, A., Fitt B. D. L (2010): Effects of fungicides on *in vitro* spore germination and mycelial growth of the phytopathogens *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* (phoma stemcanker of oilseed rape). *Pest Management Science*, 66: 396–405. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1890>
8. Farr, D. F., Rossman, A. Y. (2021): Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved October 30, 2021, <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
9. Fitt, B. D. L., Brun, H., Barbetti, M. J., Rimmer, S. R. (2006a). World-wide Importance of *Phoma* Stem Canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology*, 114: 3–15. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2233-5>
10. Fitt, B. D. L., Evans, N., Howlett, B. J., Cooke, B. M. (2006b) (Eds). Sustainable strategies for managing *Brassica napus* (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). Springer, Dordrecht, the Netherlands, p. 126. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-005-8307-6>

11. Fitt, B. D. L., Fraaije, B. A., Chandramohan, P., Shaw, M. W. (2011): Impacts of changing air composition on severity of arable crop disease epidemics. *Plant Pathology*, 60(1): 44–53. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02413.x>
12. Gruyter, de J., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. (2013): Redisposition of Phoma-like anamorphs in *Pleosporales*. *Studies in Mycology*, 75: 1–36. DOI: <https://doi.org/10.3114/sim0004>
13. Hong S., Wang G. K., Shin, D. B., Won C. H., Kee Lee Yong, Yeob Lee Sang. (2009): Occurrence of Stem Canker on Rape Caused by *Leptosphaeria biglobosa* in Korea. *Plant Pathology Journal*, 25(3): 294–298. DOI: <https://doi.org/10.5423/PPJ.2009.25.3.294>
14. Huang, Y. J., Hood, J. R., Eckert, M. R., Stonard, J. F., Cools, H. J., King, G. J., Fitt, B. D. (2011): Effects of fungicide on growth of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in relation to development of phoma stemcanker on oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathology*, 60(4): 607–620. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02416.x>
15. Huang, Y. J., Jestin, C., Welham, S. J., King, G. J., Manzanares-Dauleux, Fitt, B. D. L., Delourme, R. (2016): Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics*, 129(1): 169–180. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2620-z>
16. Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Peng, G., Ahmed, H., Zhou, Q., Turnbull, G. (2016): Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) severity and yield loss in canola in Alberta, Canada. *Plants*, 5(3): 31. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants5030031>
17. Jacques, N., Balesdent, M. H., Rouxel, T., Laval, V. (2021): New specific quantitative real-time PCR assays shed light on the epidemiology of two species of the *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex. *Plant Pathology*, 70(3): 643–654. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13323>
18. Kerdraon, L., Barret, M., Balesdent, M. H., Suffert, F., & Laval, V., (2020): Impact of a resistance gene against a fungal pathogen on the plant host residue microbiome: The case of the *Leptosphaeria maculans*–*Brassica napus* pathosystem. *Molecular Plant Pathology*, 21 (12): 1545–1558. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12994>
19. Kightley, S. P. J., Knight, S. M., Bingham, I. J., Lang, B., Philpott, H. L., (2012): The impact of changes to agronomic practice on farm yield trends in oilseed rape. *Aspects of Applied Biology*. 117: 137–144.
20. Kutcher, H. R., Balesdent, M. H., Rimmer, S. R., Rouxel, T., Chèvre, A. M., Delourme, R., Brun, H. (2010): Frequency of avirulence genes in *Leptosphaeria maculans* in western

- Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 32 (1): 77–85. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661003594109>
21. Köhle, H., Grossmann, K., Jabs, T., Gerhard, M., Kaiser, W., Glaab, J., Herms, S. (2003). Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. 60–68.
 22. Larkan, N. J., Ma, L., Borhan, M. H. (2015): The *Brassica napus* receptor-like protein RLM 2 is encoded by a second allele of the LepR3/Rlm2 blackleg resistance locus. Plant Biotechnology Journal. 13(7): 983–992. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.12341>
 23. Liu, S. Y., Liu, Z., Fitt, B. D., Evans, N., Foster, S. J., Huang, Y. J., Lucas, J. A. (2006): Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stemcanker) in *Brassica napus* (oilseedrape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. Plant Pathology, 55(3): 401–412. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01354.x>
 24. Liu Z., Latunde-Dada, A. O., Avise M. Hall, Fitt B. D. L. (2014): Phoma stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* ‘*brassicae*’. European Journal of Plant Pathology 140: 841–857. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0513-7>
 25. Magyar, D., Barasits, T., Fischl, G., Fernando, W. G. D. (2006): First report of the natural occurrence of the teleomorph of *Leptosphaeria maculans* on oilseedrape and airborne dispersal of ascospores in Hungary. Journal of Phytopathology, 154(7-8): 428–431. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01122.x>
 26. Maniatis, T., Sambrook, I., Fritsch, E. F. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
 27. McCredden, J., Cowley, R. B., Marcroft, S. J., Van de Wouw, A. P. (2017): Changes in farming practices impact on spore release patterns of the blackleg pathogen, *Leptosphaeria maculans*. Crop and Pasture Science, 69(1): 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP16404>
 28. Mitrović, P., Marjanović-Jeromela, A., Trkulja, V., Milovac, Ž., Terzić, S. (2016): The first occurrence of stemcanker on oilseedrape caused by *Leptosphaeria biglobosa* in Serbia. Ratarstvo i povrtarstvo/Field and Vegetable Crops Research, 53(2): 53–60. DOI: <https://doi.org/10.5937/ratpov53-8997>
 29. Peng, G., Liu, X., McLaren, D. L., McGregor, L., Yu, F. (2020): Seed treatment with the fungicide fluopyram limit scotyledon infection by *Leptosphaeria maculans* and reduces blackleg of canola. Canadian Journal of Plant Pathology, 42(4): 480–492. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1725132>

30. Rahnama, K., Nasrollanejad, S., Yamchi, A. (2017): Morphological and molecular identification of *Leptosphaeria maculans* in canolaseeds and flowers collected from the North Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 50(11–12): 526–539. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1339986>
31. Rouxel, T., Balesdent, M. H. (2005): The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. Molecular Plant Pathology, 6(3): 225–241. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00282.x>
32. Seidel, D., Daebeler, F., Amelung, D., Engel, K. H., Lücke, W. (1984): Auftreten, Schadwirkung und Bekämpfung von *Phoma lingam* an Winterraps. Nachrichtenblatt Pflanzenschutz DDR, 38: 120–123.
33. Shoemaker, R. A., Brun, H. (2001): The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. Canadian Journal of Botany, 79(4): 412–419. DOI: <https://doi.org/10.1139/b01-019>
34. Spinks, C. S., Emerson, M., Faske T. R. (2020). Assesment of Seed-Applied Fluopyram for Managment of Meloidogyne Incognita in Soybean. Nematropica 50(1): 1–9. DOI: <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-083>
35. Sörös Cs. (2019): Növényvédelmi kémia és toxikológia, Typotex eKiadó, 85-126. o. ISBN: 9789634930570
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.235>
36. Van de Wouw, A. P., Marcroft, S. J., Howlett, B. J. (2016): Blackleg disease of canola in Australia. Crop and Pasture Science, 67(4): 273–283. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP15221>
37. Van de Wouw, A., Idnurm, A., Marcroft, S. (2018): Fungicide resistance in Australian *Leptosphaeria maculans* populations. Aus Canola 2018 Co-hosts, 191.
38. Van de Wouw, A. P., Howlett, B. J. (2020): Advances in understanding the *Leptosphaeria maculans*-Brassica pathosystem and the irimpacton disease management. Canadian Journal of Plant Pathology, 42(2): 149–163. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1643788>
39. Varga Zs. (2014): A repce főmás betegsége. Agrofórum. 25 évf. 7. sz. 40–45.
40. West, J. S., Kharbanda, P. D., Barbetti, M. J., & Fitt, B. D. (2001): Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phomastemcanker) on oilseedrape in Australia, Canada and Europe. Plantpathology, 50(1): 10–27. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00546.x>

41. Ypema H. L., Gold R. E. (1999): Kresoxim - methyl: modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease*, 83(1). DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.1.4>
42. Zhang, X., White, R. P., Demir, E., Jedryczka, M., Lange, R. M., Islam, M., Fitt, B. D. (2014): *Leptosphaeria* spp., phoma stemcanker and potential spread of *L. maculans* on oilseed rape crops in China. *Plant Pathology*, 63(3): 598-612. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12146>
43. Zhang, X., Fernando, W. G. D. (2016): Insights into fighting against blackleg disease of *Brassica napus* in Canada. *Crop Pasture Science*, 69(1): 40-47. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP16401>
44. Zhou, Y., Fitt, B. D. L., Welham, S. J., Gladders, P., Sansford, C. E., West, J. S. (1999): Effects of severity and timing of stem canker (*Leptosphaeria maculans*) symptoms on yield of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 715–728. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008761219493>
45. Zimmermann, A., Lüthy, J., Pauli, U. (1998): Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods of nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitung für Lebensm. Unters. Forsch.*, 207: 81-90. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170050299>

Internetes hivatkozások:

Internet 1. KSH (2019):

<https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/stattukor/fobbnoveny/2019/index.html>

(letöltés ideje: 2021. 09. 11.)

Internet 2: USDA (2021): <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>

(letöltés ideje: 2021. 09. 11.)

Internet 3. NÉBIH (2004):

<https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/517057/Fungicid+m%C3%B3dszertan+komplet+t+.pdf/b334d107-21f5-7850-c4cc-0aa1ce7941b0?t=1590648000679>

(letöltés ideje: 2021. 09. 11.)

Internet 4. EPPO Global Database (2021): *Plenodomus lingam* (LEPTMA)

<https://gd.eppo.int/taxon/LEPTMA> (letöltés ideje: 2021. 09. 14.)

Internet 5. Mycobank (2021): <https://www.mycobank.org/> (letöltés ideje: 2021. 09. 14.)

Internet 6. EPPO Global Database (2021): *Plenodomus biglobosus* (LEPTBG)

<https://gd.eppo.int/taxon/LEPTBG> (letöltés ideje: 2021. 09. 14.)

Internet 7. EPPO Global Database Database (2021): *Plenodomus lingam* (LEPTMA) ábra:

<https://gd.eppo.int/taxon/LEPTMA/photos>

Internet 8. NÉBIH (2020): Engedélyezett növényvédő szerek jegyzéke (2020.12.31-i állapot)

<https://novenyvedoszer.nebih.gov.hu/Engedelykereso/kereso> (letöltés ideje: 2021.09.17.)

Internet 9. A fungicid-rezisztencia jelentősége (2019):

<https://www.agroforum.hu/szaccikkek/novenyvedelem-szaccikkek/a-fungicid-rezisztencia-jelentosege/>

Internet 10. FRAC (2021): [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2)

[list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2) (letöltés ideje: 2021. 10. 07.)

Internet 11. boszkalid ábra:

<https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/boscalid34321188425856?context=product>

(letöltés ideje: 2021.09.17.)

Internet 12. fluopiram ábra:

<https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/fluopyram39671658066354?context=product>

[t](https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/fluopyram39671658066354?context=product) (letöltés ideje: 2021.09.17.):

Internet 13. azoxistrobin ábra:

<https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/azoxystrobin40339131860338?context=product>

[uct](https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/azoxystrobin40339131860338?context=product) (letöltés ideje: 2021.09.17.)

Internet 14. piraklostrobin ábra:

<https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/pyraclostrobin38782175013180?context=product>

[duct](https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/pyraclostrobin38782175013180?context=product) (letöltés ideje: 2021.09.17.)

Internet 15. tebukonazol ábra:

<https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/tebuconazole30782107534963?context=product>

[uct](https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/tebuconazole30782107534963?context=product) (letöltés ideje: 2021.09.17.)

Internet 16. PubChem (2021): <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Internet 17. boszkalid adatlap: <https://www.fao.org/3/a1125e/a1125e05.pdf>

(letöltés ideje: 2021. 10. 07.)

Internet 18. fluopiram adatlap:

https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation10/Fluopyram.pdf (letöltés ideje: 2021. 10. 07.)

Internet 19. azoxistrobin adatlap: <https://www.fao.org/3/ca2760en/ca2760en.pdf>

(letöltés ideje: 2021.09.17.)

Internet 20. piraklostrobin adatlap:

https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation04/Pyraclostrobinaf.pdf (letöltés ideje: 2021. 10. 07.)

Internet 21. tebukonazol adatlap:

https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation94/tebucona.pdf (letöltés ideje: 2021. 10. 07.)