



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2023. május 12.

Kórokozók hosszútávú fenntartásának lehetőségei laboratóriumi körülmények között

Possibilities for long-term preservation of pathogens in the laboratory

Készítette:

Juhász Dániel

ZNR558

Növényorvosi mesterképzés

Nappali

Budai Campus

Témavezetők:

Kocsis Ivett, PhD-hallgató

Dr. Markó Gábor, egyetemi docens

Dr. Petróczy Marietta, egyetemi docens

MATE, Budai Campus, Növényvédelmi Intézet,
Növénykórtani Tanszék

Lehetséges OTDK szekció:

Agrártudományi szekció

**Budapest
2023.**

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	3. oldal
2. CÉLKITŰZÉS	4. oldal
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6. oldal
3.1 A növénypatogén modellszervezetek bemutatása	6. oldal
3.1.1 <i>Botrytis cinerea</i>	6. oldal
3.1.2 <i>Monilinia</i> spp.	10. oldal
3.2 Kórokozók fenntartása, tárolási módszerek	14. oldal
3.2.1 <i>Botrytis cinerea</i>	16. oldal
3.2.2 <i>Monilinia</i> spp.	17. oldal
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	19. oldal
4.1. Helyszín és eszközök	19. oldal
4.2. Kórokozók izolálása	19. oldal
4.3. A vizsgálat menete	21. oldal
4.4 A tenyészetek növekedésének mérése	23. oldal
4.5 Statisztikai elemzés	23. oldal
5. EREDMÉNYEK	25. oldal
5.1 <i>Botrytis cinerea</i>	25. oldal
5.2 <i>Monilinia fructigena</i>	29. oldal
5.3 <i>Monilinia laxa</i>	32. oldal
6. KÖVETKEZTETÉSEK	35. oldal
7. ÖSSZEFOGLALÁS	38. oldal
8. IRODALOMJEGYZÉK	40. oldal
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	45. oldal
10. MELLÉKLETEK	46. oldal

1. BEVEZETÉS

A növényi kórokozók fenntartása és megőrzése alapvető eleme a rövid- és hosszútávú in vitro vizsgálatoknak. Karen és mtsai. (2004) szerint az egyes kórokozók fenntarthatóságának vizsgálata segítséget nyújthat egy faj azonosításában, megismerésében, valamint további kísérletek alapjául szolgálhat. A gombák hosszútávú megőrzése különféle vizsgálatokra a mikológia egyik fontos aspektusa. A morfológiai jellemzéshez, a patogenitási tesztekhez és a molekuláris vizsgálatokhoz szükség van a kórokozó tiszta tenyészetére. Egy-egy hosszabb távú vizsgálat során (pl. doktori vagy pályázati kutatás, génmegőrzés) az adott izolátumokat vagy gomba törzseket hosszú évekig vagy akár évtizedekig fenntarthatják. Elsődleges szempont, hogy a hosszú időn át tárolt izolátumoknak vagy törzseknek életképesnek kell maradniuk a tárolás végéig és azt követően is, ugyanakkor a tárolás alatt nyugalmi állapotban kell maradniuk a mutációk elkerülése érdekében (Borman és mtsai., 2006).

A *Botrytis* és a *Monilinia* fajok világviszonylatban a legjelentősebb kórokozók közé tartoznak, szabadföldön és tárolás során is minden évben komoly veszteséget okozhatnak. Mindkét nemzetség tagjai alapvetően egyszerűen izolálhatók, tenyésztethők és fenntarthatók univerzális táptalajokon. A kórokozók virulenciájának jellemzéséhez, a fungicidek hatékonyságának teszteléséhez vagy akár növényvédőszer-rezisztencia vizsgálatokhoz gyakran hosszadalmas laboratóriumi vizsgálatok szükségesek, mely során elengedhetetlen, hogy az izolátumaink életképesek maradjanak és hosszútávon megőrizték eredeti növekedési képességüket és morfológiai jellemzőiket.

A növénypatogén gombák hosszútávú megőrzésére számos módszer áll rendelkezésre. A fagyasztás, illetve a liofilezés (syn. liofilizálás) elterjedt eljárások, utóbbi fagyasztva szárítást jelent. A kriokonzerválás kevésbé elterjedt, meglehetősen magas költségei miatt. A fenntartás és tárolás történhet továbbá ásványi olajban, steril táptalajon, vagy szilikagélen (Karen és mtsai., 2004), a felsorolt módszerek többsége azonban speciális berendezést és felszerelést igényel, mely a kisebb laboratóriumok számára nehezen elérhető. Olyan alacsony költségű, de hatékony tárolási módszer használata szükséges, mely jó alternatívája lehet a drágább fenntartási módoknak. A *Botrytis* és *Monilinia* fajokkal sok éve folynak vizsgálatok a Növénykórtani Tanszéken, azonban kevés szakirodalmi forrás szól a hosszútávú, táptalajon történő fenntartásukról, fagyasztásukról, ami további motiváció volt a kísérlet elvégzéséhez, valamint arra is választ kaphatunk, hogyan viselik ezek a kórokozók a mélyen fagypont alatti hőmérsékleteket, ill. a fagyasztás okoz-e valamilyen változást bennük.

2. CÉLKITÚZÉS

Kutatásom elsődleges célja, hogy feltárjam az alkalmazott tárolási körülmények közül azokat a legfontosabb tényezőket, amelyek befolyásolják a *Botrytis* és a *Monilinia* izolátumok hosszútávú megőrzését. Azt feltételeztem, hogy a különböző tárolási körülmények között tartott izolátumok eltérő növekedési mintázatot mutatnak attól függően, hogy az adott tárolást befolyásoló tényezők együttesen hogyan hatnak az adott izolátum életképességére. Jelen vizsgálatban a tárolási hőmérséklet, a tárolási idő és az alkalmazott fedés módja változókat, egyidejűleg teszteltük *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* és *Monilinia laxa* több izolátumán. A vizsgálatok során azokat a beállítási értékeket használtuk, amelyek általánosan elfogadottak a kórokozók hosszútávú laboratóriumi tárolása során.

A vizsgálat eredményeként összehasonlíthatóvá válnak a különböző tárolási körülmények egymáshoz viszonyított hatásai, így a jövőben a feltárt hatások fontos adalékai lehetnek a tesztelt fajok laboratóriumi fenntartó vizsgálatainak. Korábban Williamson és mtsai. (2007) mutatták be azt, hogy a *Botrytis cinerea* a hűtött áru kereskedelmének növekedésével vált igazán jelentős kórokozóvá, mert fagypont közelében is hosszú ideig képes volt életben maradni, majd hatékonyan növekedni. E példa jól illusztrálja, hogy a fagyasztva tárolt élelmiszereinkkel vagy élelmiszeripari nyersanyagokkal együtt a növénypatogén kórokozók milyen sokáig maradhatnak életképesek, illetve őrizhetik meg a fertőzőképességüket.

Vizsgálataink során az alábbi konkrét kérdéseket és hipotéziseket fogalmaztuk meg:

1. Kimutatható-e különbség a különböző ideig tárolt izolátumok növekedési üteme között?

A nullhipotézisünk szerint a hosszabb ideig tárolt izolátumok növekedési üteme megegyezik a rövidebb ideig tárolt mintákkal. Például Delcán és mtsai. (2002) kísérletében nem csökkent a *Botrytis cinerea* növekedési üteme 4 év tárolás után.

2. Kimutatható-e különbség a különböző hőmérsékleten tárolt izolátumok növekedési üteme között?

Azt várjuk, hogy a különböző hőmérsékleten tárolt izolátumok növekedési üteme különböző lesz, mert az összes vizsgált kórokozót életfolyamatát befolyásolja a környezet hőmérséklete. Gindro és Pezet (2001) a *Botrytis cinerea* konídiumok tárolása során azt az eredményt kapták, hogy a 21 °C -on tárolt konídiumok egy hónap után elvesztették csírázóképességüket.

3. Kimutatható-e különbség a levegő oxigénjétől elzártan tárolt (fedett) és a levegő oxigénjével érintkezve tárolt (fedetlen) izolátumok növekedési üteme között?

Feltételezzük, hogy a levegőtől elzárt (ún. „fedett”) és a levegővel érintkező (ún. „fedetlen”) minták növekedése eltérő lesz. Delcán és mtsai. (2002) *Botrytis cinerea* izolátumok esetében azt tapasztalták, hogy a levegővel érintkező, tárolt spórák életképessége alacsonyabb a 20%-os glicerinben tároltakéhoz képest, azonban a glicerinben tárolt spórák növekedési üteme 14%-kal csökkent a kezdeti értékekhez képest, miközben szilikagélen vagy PDA táptalajon eltárolt spórák esetében nem volt kimutatható csökkenés.

4. Kimutatható-e különbség a különböző izolátumok növekedési üteme között (fajon belül)?

Várakozásaink szerint a különböző izolátumoknak különböző lesz a növekedési üteme. Egy adott kórokozón belül az izolátumok agresszivitása eltérő lehet, ami többek között a micélium növekedési ütemével is jellemezhető (Pariaud és mtsai., 2009). Tran és mtsai. (2020) *Monilinia laxa* és *Monilinia fructicola* izolátumok növekedését mérték. Megfigyelték, hogy az in vitro mért micéliumnövekedés jelentős variancia forrása fajon belül, az egyes izolátumok között.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A növénypatogén modellszervezetek bemutatása

3.1.1 *Botrytis cinerea*

A kórokozó taxonómiai helyzete és életmódja

A *Botrytis cinerea* Pers. rendszertanilag az *Ascomycota* törzsbe, a *Letiomyces* osztályba, a *Helotiales* rendbe és a *Sclerotiniaceae* családba tartozik (Williamson és mtsai., 2007; Internet 1). Ez a haploid, fonalas, heterotallikus gomba számos kétszikű növényfajt képes fertőzni (Tudzynski és Gronover, 2007), több mint 200 gazdanövénnyel rendelkezik világszerte (Williamson és mtsai., 2007). A kórokozó nagyfokú alkalmazkodóképességét bizonyítja a megtámadott növényi szervek sokfélesége: a kórokozó a virágokat, a kötődött és az érett gyümölcsöket, valamint a leveleket, szárat is megfertőzi (Glits és Folk, 2000). A nekrotróf életmódú növénypatogén gomba, először a gazdanövény sejtjeit pusztítja el, majd ezt követően kolonizálja az elhalt szövetet (Amselem és mtsai., 2011). A *Botrytis cinerea* sejtfalbontó enzimeket, toxinokat és más alacsony molekulatömegű vegyületeket termel (pl.: oxálsav). Egyes eredmények arra utalnak, hogy a kórokozó fertőzési stratégiaként programozott sejthalált idéz elő a gazdaszervezetben (Williamson és mtsai., 2007).

Tünetek és gazdanövénykör

A kórokozó főleg a növények felső, zöld részeit kolonizálja, de a jellegzetes szürke penészgyep (a konídiumtartók tömege) megjelenhet akár a növény más részein is, mint például gumókon és magokon (Delcán és mtsai., 2002). A fertőzés tünetei magas páratartalom mellett betakarítás előtt és után egyaránt megjelenhetnek (Elad és mtsai., 2007), a szőlőre (1. ábra, balra), a hajtatott zöldségnövényekre és a bogyósokra (pl. szamóca, málna, áfonya (1. ábra, jobbra)) különösen veszélyes a kórokozó (Williamson és mtsai., 2007). A *Botrytis cinerea* a tárolt és szállított terményeken is megjelenhet. Betakarításkor a fertőzés még gyakran nem észrevehető, azonban tárolás vagy szállítás során páradús körülmények között gyorsan kialakulnak a tünetek, akár 0 °C közelében is (Aktaruzzaman és mtsai., 2017). A termények többsége valószínűleg még szabadföldön fertőződik látensen a kórokozóval, majd a tárolás során akkor indul fejlődésnek, ha valamilyen környezeti hatás felborítja a gazdanövény és a nyugalmi állapotban lévő kórokozó egyensúlyát (Jarvis, 1977). A vágott és cserepes virágok esetén szintén jelentős károkat okozhat: a rózsza, a gerbera vagy a ciklámen különösen veszélyeztetettek. A fűtött és fűtetlen hajtatóházakban, valamint a fólia alagutakban uralkodó

magas páratartalom nagyban növeli a fertőzés kialakulásának esélyét (Williamson és mtsai., 2007).



1. ábra: *Botrytis cinerea* okozta rothadás és a jellegzetes szürke konídiumtartó gyp szőlőn (balra) és áfonyán (jobbra) (Fotó: Juhász Dániel, 2022)

A kórokozó biológiája és terjedése

A kórokozó áttelelése kétféleképpen történhet: micéliummal a talajban vagy a bomló növényi maradványokban, továbbá a kedvezőtlen időszak átvészelésére képezhet szkleróciumokat is (Staats és mtsai., 2005).

A kórokozó életciklusa több szakaszból áll. A vegetatív szakaszban micélium formájában van jelen, majd később konídiumtartók, majd ezeken ivartalan úton konídiumok jönnek létre, ezt a szakaszt a kórokozó anamorf szakaszának nevezzük (Beever és Weeds, 2007). A konídiumok a konídiumtartó végén holoblasztikus úton képződnek, szimultán módon (Hennebert, 1973). Ezek a mitotikusan létrejött spórák szél által nagy távolságra képesek eljutni (Staats és mtsai., 2005), így a kórokozó légmozgással való terjedése igen jelentős (Williamson és mtsai., 2007). A kórokozó létrehozhat szkleróciumokat is, többnyire tavasszal és ősszel, amely rendszerint micéliummal vagy konídiumtartókkal és konídiumokkal fejlődik tovább, de speciális körülmények között létrehozhat tölcser alakú apotéciumokat is (Glits és Folk, 2000). A szklerócium 9-12 hónap elteltével már csak steril apotéciumot tud létrehozni, de a csírázás módját főként a környezeti körülmények határozzák meg. A szklerócium leggyakrabban konídiumtartóval fejlődik tovább, ugyanis a micélium növekedésének optimum hőmérséklete hátráltatja a szklerócium képzést és ez fordítva is igaz (Jarvis, 1977). Az apotécium aszkospórákat tartalmaz, melyek meiózissal jönnek létre, ezt nevezzük a kórokozó teleomorf szakaszának (Beever és Weeds, 2007).

A hőmérséklet hatása *Botrytis* fajokra

A *Botrytis* fajokat gyakran a hűvös időjárás kórokozóiként tartják számon, mert hőmérsékleti optimumuk 18-23 °C között van növekedés, sporuláció, csírázás és fertőzés szempontjából egyaránt (Aktaruzzaman és mtsai., 2017). A *Botrytis cinerea* kitartóképlete, a szklerócium széles hőmérséklet tartományban, 3-27 °C-ig képes csírázni (Jarvis, 1977). Kublitskaya és Ryabtseva (1970) kísérletében a *Botrytis cinerea* néhány szkleróciuma nedves kamrában tartva 3-27 °C-on nem hozott létre konídiumtartókat, viszont 2-5 hónap után apotéciummal fejlődött tovább, melyek 3°C-on 20-30 napig, 23 °C fölött azonban csak 3 napig voltak életképesek. Nonaka és Morita (1967) 8 szklerócium típust különített el morfológiai tulajdonságuk alapján. Azonban a 80 izolátum vizsgálata során a megfigyelt szkleróciumok 80%-a típust váltott a hőmérséklet hatására. A szkleróciumokból indított tenyészeteknek különböző növekedési optimumuk volt, a tenyészetek 79%-a 20 °C-on, 6% -a 15 °C-on és 15%-a 25 °C -on növekedett a legjobban, valamint a többségük 10 °C-on sporulált a legintenzívebben. Brooks és Cooley (1917) vizsgálataik után arra a következtetésre jutottak, hogy a sporuláció táptalajon 5 és 10 °C között indul meg a leoltástól számított 10-31 napon belül. A *Botrytis cinerea* micéliumának növekedését Schneider-Orelli is vizsgálta (1912), amely során a növekedéshez szükséges optimális hőmérsékletet 20-22 °C -ban határozták meg. A micélium azonban alacsony hőmérsékleten is képes növekedni: Nutrient Gelatin táptalajon 0 °C-on is észlelhető növekedést rögzítettek, a tenyészet létrehozásától számított 35 napon belül. A micélium növekedése 25 °C fölött azonban jelentősen lelassult. Shiraishi és mtsai. (1970) valamivel magasabb, 24-28 °C közötti optimum hőmérsékletet írtak le burgonya szacharóz agar táptalajon, továbbá a növekedéshez szükséges minimum hőmérsékletet 0 °C-ban, a maximum hőmérsékletet pedig 35 °C-ban határozták meg.

A hőmérséklet hatását *B. cinerea* konídiumok csírázására már számos kutató vizsgálta. Doran (1922) maximum csírázási hőmérsékletnek 26 °C-ot, minimum hőmérsékletnek pedig 7 °C-ot jelölt meg. Azonban Schneider-Orelli (1912), majd Brooks és Cooley (1917) megállapították, hogy a konídiumok már 0 °C -on is csíráznak kukorica agaron a táptalajra helyezést követő 31 napon belül. Brown (1922) 5 °C -on jó csírázási eredményt kapott, később Haas és Wennemuth (1962) is sikeresen csíráztatott spórákat 1 és 10 °C közötti tartományban. Hennebert és Gilles 1958-ban a spórák csírázását vizsgálva azt az eredmény kapták, hogy a spórák 5 óra alatt csíráznak ki és az ehhez tartozó optimum hőmérséklet 20 °C, majd 18 óra elteltével a növekedés függővé vált a külső tápanyagoktól, ekkor már 30 °C volt a csírázáshoz tartozó optimum hőmérséklet.

A kórokozó morfológiai azonosítása

A *Botrytis* nemzetség tagjai könnyen felismerhetők jellegzetes konídiumtartóikról, melyek kezdetben színtelenek, később szürkék, majd barnásak lesznek. A konídiumtartók végén egysejtű, ovális alakú konídiumok fűződnek le (Williamson és mtsai., 2007).

Az izolátumok in vitro, táptalajon történő tenyésztése során nagyfokú morfológiai változatosságot mutatnak: alapvetően micélium képző vagy szklerócium képző típusra különíthetők (Mirzaei és mtsai., 2009), Emiatt már számos kutató hivatkozott a *Botrytis cinerea* kórokozóra fajkomplexxént, amely morfológiailag azonos formában jelenik meg a gazdanövényeken, azonban in vitro körülmények között jelentős és állandó különbségeket mutat és számos típust foglal magába (Miller, 1982; Giraud és mtsai., 1999; Albertini és mtsai. (2002). Paul (1929) három izolátum típust írt le, nagy mennyiségű szklerócium képző (2. ábra balra), légmicélium fejlesztő (2. ábra középen) és intenzíven sporuláló (2. ábra jobbra).



2. ábra: Eltérő *Botrytis cinerea* tenyészetek: szklerócium képző (balra), micéliumot fejlesztő (középen), intenzíven sporuláló (jobbra) (Fotó: Juhász Dániel, 2022)

A kórokozó micéliuma PDA táptalajon kezdetben színtelen, majd fehér-piszkosfehér, végül a spórák megjelenésekor szürkés-barna színű lesz, bőségesen képez változatos formájú szkleróciumokat. A konídiumok egysejtűek, gömbölyű, ellipszoid vagy tojásdad alakúak, színtelenek vagy halványbarnák, hosszúságuk átlagosan 10 μm , átlagos szélességük 5 μm . Az izolátumok 7 nap elteltével elérik a 8 cm-es átmérőt MEA (malt extract agar, maláta kivonat agar) és PDA (PDA (potato dextrose agar, burgonya kivonat agar) táptalajon 25°C-on tárolva (Aktaruzzaman és mtsai., 2017; Kwon és mtsai., 2011; Park és mtsai., 2011).

Tanović és mtsai. (2009) PDA és MEA táptalajon vizsgált morfológiai bélyegek alapján két nagy csoportra osztották a *B. cinerea* izolátumokat: micélium képző és szklerócium képző

izolátumokra. Kísérletükben azt figyelték meg, hogy PDA táptalajon több szklerócium képző típus fejlődik, viszont az egyes Petri-csészékben lévő szkleróciumok száma MEA táptalajon magasabb. A sporuláció MEA táptalajon sokkal gyakoribb (az izolátumok 36,7%-a képzett szaporító képlete), ezzel szemben PDA táptalajon csak az izolátumok 6,4%-a képzett konídiumokat. A növekedés üteme PDA táptalajon 7,3 és 26,7 mm között mozgott.

3.1.2 *Monilinia* spp.

A kórokozó taxonómiai helyzete és életmódja

Az almatermésű és csonthéjas gyümölcsök barna rothadását több *Monilinia* faj okozza: a *Monilinia fructigena* (Pers.) Honey., a *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland.) Honey. és a *Monilinia fructicola* (G.Winter) Honey., melyek világszerte elterjedtek és évente jelentős termés kiesést idézhetnek elő (Batra, 1991). A *Monilinia polystroma* ugyan kisebb jelentőségű, de hazánkban előfordul almatermésű és csonthéjas gyümölcsök rothadását okozva, kártétele, tünetei a *Monilinia fructigena* kórokozóhoz hasonlítanak (Petróczy és Palkovics, 2009). Rendszertanilag az *Ascomycota* törzsbe, a *Letiomycetes* osztályba, a *Helotiales* rendbe és a *Sclerotiniaceae* családba tartoznak (Internet 2; Internet 3).

A *Monilinia* fajok nektrotróf életmódúak (Batra, 1991). A *Monilinia fructigena* elsősorban termésrothadást okoz almatermésűeken és ritkán csonthéjasokon, de ez a kórokozó felelős a mogyoró termésbarnulásáért és terméshullásáért is. A *Monilinia fructicola* és a *Monilinia laxa* képes virágot fertőzni, ezzel a virágok elszáradását okozzák, továbbá a *M. fructicola* képes megtámadni az egészséges gyümölcsöt is. A *Monilinia laxa* és *Monilinia fructigena* csak a sérült gyümölcsöket képes fertőzni (Rungjindamai és mtsai., 2014).

Tünetek és gazdanövénykór

A *Monilinia* fajok virág- és hajtáselhalást, a fás részekben rákos sebeket, valamint termésrothadást idéznek elő, ezzel a gyümölcsökben súlyos termés kiesést, a dísznövényeken pedig esztétikai kárt okoznak (Batra, 1991).

Hosszantartó nedves és mérsékelten meleg időjárás esetén a veszteség súlyos lehet. Az elhalt virágok lehullanak, vagy a fán maradnak és konídiumokat képezve további fertőzési forrás jelenthetnek. A virágkocsányon át a kórokozó gyakran továbbterjed, a vesszők elhalását okozva (Batra, 1991). Levélfertőzés ritka, inkább a vesszőelhalás következményeként alakul ki, viszont a kórokozó spórái meleg és nedves időjárás esetén a leveleket is megfertőzhetik. Az ágrákosodás általában a fertőzött vesszőkből alakul ki, mikor a kórokozó micéliummal

továbbterjed a vastagabb fás részek felé is, amely nyomán az érintett területen gyakran jelenik meg váladékozás (Byrde és Willetts, 1977).

A kórokozók leg súlyosabb károkat előidéző életszakasza a gyümölcsök fertőzése. A barna rothadás még a szüret után, a tárolás vagy a szállítás során is kialakulhat (Wormald, 1954; Byrde és Willetts, 1977). A gyümölcsök érettsége, valamint a sebzés kora nagymértékben befolyásolja a fertőzés bekövetkezését. A fiatal gyümölcsök megsebezve ellenállóbbak, mint az idősebbek, ezzel szemben az idősebb sebzés ellenállóbb, a fiatal pedig fogékonyabb a kórokozóra (Wormald, 1954). A fertőzést követően kezdetben apró, barna, rothadó folt jelenik meg a gyümölcs felszínén, melynek átmérője kör alakban növekszik. Ezt követően a sárgás exogén sztrómák koncentrikus körökben jelennek meg (3. ábra) a fertőzési pont körül (Batra, 1991). Nedves körülmények között az érett gyümölcsöt teljesen beboríthatják a kórokozó képletei, míg száraz körülmények között és/vagy éretlen gyümölcsön nem képződnek szaporítóképletek, hanem a termés elveszíti víztartalmát és ráncosra aszalódik, úgynevezett „gyümölcsmúmia” alakul ki (Glits és Folk, 2000). A *Monilinia fructigena* további tünete az almák megfeketedése, mely leginkább tárolás során fénytől elzárt körülmények között. Ilyenkor a kezdeti barnulás idővel koromfeketére színeződik, a gyümölcs felszínén nem jelenik meg fruktifikáció, valamint a termés alakja és felszíne sem változik meg jelentősen (Byrde és Willetts, 1977).



3. ábra: A *Monilinia fructigena* exogén sztrómái almán (balra) és a *Monilinia laxa* képletei fertőzött szilván (jobbra) (Fotó: Juhász Dániel, 2022)

Gazdanövénykörükhöz főként a *Rosaceae* család tagjai tartoznak, de képesek megbetegíteni a mogyorót (*Corylus avellana*), egyes esetekben akár a szőlőt (*Vitis vinifera*) is (Petróczy és mtsai., 2011).

A kórokozó biológiája és terjedése

A *Monilinia* fajok jellemzően a fertőzött gyümölcsökből kialakuló múmiákban, valamint a fás részek rákos sebeiben vészeli át a telet és a kedvezőtlen időszakot (Batra, 1991). A hazánkban előforduló fajok ezekről a részekről, ivartalan úton képződő konídiumokkal indítják a tavaszi fertőzést (Glits és Folk, 2000). A *Monilinia fructigena* konídiumai leginkább a vegetáció végén képződnek. Ezzel szemben a *Monilinia laxa* fő kártétele a tavaszi virág, hajtáselhalás és a fás részek rákosodása, de termésrothadással jelentős károkat okoz a csonthéjas gyümölcsökön, almatermésűeken azonban nagyon ritkán fordul elő (Wormald, 1954; Batra, 1991). Ivaros szaporodásuk elméletileg lehetséges tölcsér alakú, nyeles apotéciumokkal (bennük askospórákkal), amik a gyümölcsmúmiák felületén alakulhatnak ki (Byrde és Willetts 1977), azonban előfordulásukat egyetlen hazai szakirodalom sem támasztja alá. A múmiává aszalódott gyümölcsök a fán maradnak vagy lehullanak, a kórokozó ezekben a képződményekben vészeli át a telet, majd tavasszal konídiumtartókat és konídiumokat fejleszt. A kórokozó a fertőzött fás részekben szintén áttelelhet, majd tavasszal ezeken a részekben is konídiumok fejlesztésével fertőz (Batra, 1991).

A hőmérséklet hatása *Monilinia* fajokra

A *Monilinia fructigena* almán és körtén minden évben gazdasági veszteséget okoz a gyümölcsösben és tárolás során (Robinson és Xu, 2000). A szerzők szerint a konídiumok csak közel 100%-os páratartalom mellett csíráznak és a hőmérséklet növelésével növekszik a csírázási arány, amely 23-25 °C-on éri el a maximumot, e fölött csökken a csírázási erély és gyakoriság. Xu és mtsai. (2001) vizsgálata során az életképes konídiumok 70%-a gyorsan kicsírázott 2 órán belül 20-25 °C-on. Fertőzés után a sporulációt sem a hőmérséklet (10-20 °C), sem a relatív páratartalom (45-98%) nem befolyásolta. Sporuláció nem alakult ki sem 5 °C alatt, sem 25 °C felett. A levált konídiumok a hőmérséklet és a relatív páratartalom függvényében akár 20 napig is életképesek maradtak, azonban a konídiumok életképességének szempontjából a hőmérsékelt fontosabb paraméternek bizonyult a relatív páratartalomnál. Karova (1974) szerint a konídiumok 8–10 órán át képesek elviselni a -20 °C-ot, anélkül, hogy fertőzőképességüket elveszítenék. A nedves időszakok időtartamának növelése csökkenti a barnarothadás előfordulását az idősebb sebeken (Robinson és Xu, 2000).

A kórokozó morfológiai azonosítása

Az exogén sztrómák megjelenése és jellemzői a fertőzött részekben fajspecifikusak: a *Monilinia fructigena* esetében eleinte fehérek, majd okkersárgára színeződnek, méretük 1-2

mm között mozog. A *Monilinia laxa* exogén sztrómái kisebbek, maximum 1 mm-esek és szürkésbarna színűek (Batra, 1991, Petróczy és mtsai., 2011). Az elágazó láncokban képződő makrokonídiumok az exogén sztrómákon jelennek meg. A makrokonídiumok holoblasztikus úton jönnek létre, ellipszoid alakúak és hialinok, képződésükhöz fény szükséges (Wormald, 1954; Batra, 1991). Tömlősgombákra jellemzően a *Monilinia* fajok képeznek mikrokonídiumokat is, ezek enyhén körte alakúak, funkciójuk valószínűleg tápanyag raktározás, csírázásra nem képesek így nem vesznek részt a fertőzésben (Byrde és Willetts, 1977).

PDA, Leonian-maláta agar és Mathur-Barnett-Lilly agar táptalajokon a *Monilinia* fajok könnyen tenyésztethetők és megkülönböztethetők az általános tenyészbélyegek alapján (Petróczy és mtsai., 2004). Muñoz és mtsai. (2008) kutatása alapján egyes esetekben a *Monilinia laxa* és *Monilinia fructigena* tenyészbélyegek nagyon hasonlíthatnak, így nehezen azonosíthatók.

A *Monilinia fructigena* számára a burgonya-dextróz agar bizonyult a legjobbnak, a tenyészet színe fehéres vagy sárgásbarna, a tenyészetek széle inkább szabályos vagy ép, ritkán sporulál, viszont gyakran képez légmicéliumot, a növekedés intenzitása 0-12 mm/nap (4. ábra) (Byrde és Willetts 1977; Horváthné, 2009). Muñoz és mtsai. (2008) vizsgálatai alapján a *Monilinia fructigena* izolátumok 23 °C-on a leoltást követő negyedik napon átlagosan 41-46 mm átmérőjűek voltak, míg a leoltástól számított hetedik napon ez a szám 68-78 mm között mozgott.



4. ábra: A *Monilinia fructigena* tenyészbélyegek PDA táptalajon fonéki oldal, jobbra a színi oldal (Fotó: Juhász Dániel, 2022)

A *Monilinia laxa* koncentrikus zónákban, gyakran karélyosan növekszik, a telepek széle csipkézett vagy szabálytalan (Batra, 1991). A tenyészet színe világosszürke, esetleg barnás színű, gyakran rozettált mintázottság látható benne és szintén jó növekedést mutat PDA táptalajon (5. ábra). Nagyon ritkán képződnek konídiumok a tenyészetben (Byrde és Willetts

1977). Egyes megfigyelések szerint a *Monilinia laxa* izolátumok fajon belül több morfológiai csoportra oszthatók a PDA táptalajon képzett tenyészbélyegek alapján (Tran és mtsai., 2020). A *Monilinia laxa* izolátumok 23 °C-on a leoltást követő negyedik napon átlagosan 17-59 mm-esek voltak, a leoltást követő hetedik napon pedig 47-78 mm átmérőjűek voltak átlagosan, következésképpen a *Monilinia laxa* izolátumok növekedése PDA táptalajon valamivel gyengébb, mint a *Monilinia fructigena* izolátumoké (Muñoz és mtsai., 2008).



5. ábra: balra *Monilinia laxa* PDA táptalajon fonáki oldal, jobbra a színi oldal (Fotó: Juhász Dániel, 2022)

3.2 Kórokozók fenntartása, tárolási módszerek

Egy kórokozók izolátumainak fenntartása ill. megőrzése alapvető eleme az in vitro vizsgálatoknak (Karen és mtsai., 2004). A gombák hosszútávú megőrzésére számos módszer áll rendelkezésre: liofilezés, kriokonzerválás, valamint ásványi olajban, steril táptalajon, szilikagélen történő tárolás. A szerzők szerint ugyan a felsorolt módszerek mindegyike alkalmas a kórokozók hosszútávú fenntartására, azonban valamennyi eljárásnak van hátránya is. A tárolási módszer kiválasztása természetesen az adott fajtól, a vizsgálat céljától is függ. A tárolhatóság maximális időtartama tárolási módonként változik, de általában 10 év vagy kevesebb (Karen és mtsai., 2004).

A liofilezés és a kriokonzerválás minimális változással, jól megőrzi az adott gombafajt viszont drága módszer és nem ad lehetőséget a patogének újbóli tárolására (Delcán és mtsai., 2002). Karen és mtsai. (2004) szerint a liofilezés csak kisméretű, 10 µm-nél kisebb spórával rendelkező fajknál alkalmazható eredményesen, mert a nagyobb méretű spórák károsodhatnak a fagyasztás során. Kriokonzerválás során a konídiumokhoz fagyásgátló készítményt adnak, mely megakadályozza a szövetek károsodását. Azonban bizonyos esetekben a krioprotektáns hozzáadása, káros hatásokhoz vezetett. Holden és Smith (1992) kísérletében a krioprotektáns

szerek hozzáadása, mint például a glicerín, a dimetil-szulfoxid és a trehalóz csökkentette a *Puccinia abrupta* var. *parthenicola* spóráinak életképességét és virulenciáját is.

Delcán és mtsai. (2002) szerint az ásványi olaj használata gombák megőrzésére nehéz és a felülfertőződés is gyakori, továbbá az olajban és szilikagélben történő tárolás során mutációk léphetnek fel, amely a kórokozó morfológiájában és virulenciájában egyaránt megnyilvánulhat. Ezenkívül az olaj korlátozza a gomba számára felvehető oxigén mennyiségét, ezért az anyagcsere folyamata lelassul, azonban továbbra is növésben marad, ami fokozza a mutációk megjelenését (Braverman és Croiser, 1966; Karen és mtsai., 2004). Ezzel szemben Johnson és Martin (1992) az agar táptalajon tenyésztett gombák olajjal való fedését, olcsó és könnyen kezelhető módszerként említi, mely lehetővé teszi a kórokozók megőrzését szobahőmérsékleten hosszú éveken keresztül, ráadásul az olaj védelmet nyújt az atkakártétel ellen is. Smith és Onions (1983) kísérletében 58 olaj alatt tárolt gombafajból 47 bizonyult életképesnek 32 évnyi tárolás után.

A gomba kultúrák megőrzésére további módszer a folyamatos csíráztatás, szárítás és fagyasztás. A folyamatos csíráztatás során az adott fajt szünet nélkül agar táptalajon neveljük, amely módszert leggyakrabban 5-20 °C közötti hőmérsékleten alkalmazzák és rövidtávú fenntartásra a legalkalmasabb. Ezenfelül a módszer népszerűségét növeli, hogy egyszerű és olcsó, valamint nem igényel speciális felszerelést (Karen és mtsai., 2004).

A szárítás, mint tárolási módszer olyan gombafajoknál hasznos, amelyek spórát vagy egyéb kitartó képletet képeznek. Közegként általában szilikagél, üveggyöngyöket és talajt használnak. A leghosszabb idő melyen keresztül szárítással életképesek maradtak *Plectomycetes*, *Hyphomycetes* és *Zygomycetes* osztályba tartozó kórokozók 11 év volt, közegként szilikagél szolgált. A hosszútávú fenntartás mellett további előnye, hogy az előző módhoz hasonlóan szintén olcsó és egyszerű a kivitelezése. Összehasonlítva az olaj alatt tárolással, a szilikagélben tárolt kórokozók jobban csíráztak a tárolás után, azonban a túlélő gombák köre szűkebb volt. Bár a fagyasztva szárítás és folyékony nitrogénnel való tárolás jobbnak bizonyult, a szilikagélben való tárolás egy jó alternatíva a kisebb laboratóriumok számára (Karen és mtsai., 2004).

A fagyasztás - beleértve a mélyhűtést - sokoldalú és széleskörben alkalmazható tárolási módszer. A legtöbb gomba folyékony nitrogénben vagy közönséges fagyasztóban megőrizhető fagyásvédő szerrel vagy néhány esetben anélkül is. Fagyasztva szárítással vagy liofilizációval a kultúrát előbb fagyasztják majd vákuum alatt szárítják. A fagyasztva szárítás és -135 °C alá hűtés kiváló módja az állandó megőrzésnek, azonban speciális és drága felszereléseket igényel (Smith és Onions, 1983; Karen és mtsai., 2004). Borman és mtsai. (2006) Castellani módszerét

követve 45 gomba faj spóraszuszpenzióját tároltak steril vízben, szobahőmérsékleten, 2 hónaptól 21 évig terjedő időintervallumban. A vizsgálat eredményeként elmondható, hogy a kórokozó életképessége nem függ nagymértékben a tárolási időszak hosszától, de bizonyos fajok elvesztették tenyészetbeli jellemzőiket és steril micéliumot produkáltak. Összességében a Castellani módszer továbbra is egyszerű és olcsó a legtöbb gombafaj megőrzésére, azonban ki kell egészíteni egy másféle tárolási módszerrel is, annak érdekében, hogy a kórokozó morfológiailag stabil és életképes maradjon hosszú tárolás után is.

A felülfertőződés sajnos egy általános probléma a törzsgyűjteményekben. Számos kutató beszámolt már atka és egyéb szervezetek károsításáról a tenyészetekben (Holden és Smith, 1992; Karen és mtsai., 2004). Delcán és mtsai. (2002) kísérletében PDA táptalajon szintén gyakori probléma volt a befertőződés. Egy kórokozó izolátumának morfológiája és fiziológiája azonban idővel önmagában is megváltozhat. Különösen igaz ez a sporuláció képességére, de akár a gazdanövényt fertőző képességét (patogenitását) is elveszítheti a sorozatos átoltások során (Karen és mtsai., 2004).

3.2.1 *Botrytis cinerea*

Delcán és mtsai. (2002) ötféleképpen tároltak *Botrytis cinerea* izolátumot. A kísérlethez szükséges kórokozót padlizsán-agaron izolálták, majd 20-25 °C -os hőmérsékleten, 16 órás fotoperiódus mellett nevelték a sporuláció eléréséig. Ezt követően konídiumszuszpenziót készítettek, melyet szilikagélben 4 °C -on, homokban 4 °C -on és burgonya dextróz agaron 4 °C -on kémcsövekben tároltak. A maradék két esetben pedig steril lándzsátűvel leemelt spórákat használtak, melyeket -20 °C -on tároltak mikrocentrifuga csövekben, amelyek közül az egyiket szárazon hagyták, a másikat pedig 20%-os glicerinnel töltötték fel. Az izolátumok életképességét és jellemzőit 1, 2 és 4 év tárolás után vizsgálták. Négy év tárolás után azt figyelték meg, hogy a kórokozó lineáris növekedése általában hasonló vagy meghaladja a kezdetben mért értékeket. Két módszernél figyeltek meg csak csökkent növekedést: a homokban tároltak (9%-os csökkenés) és a glicerinben tároltak (14%-os csökkenés) esetén. Ugyanitt megfigyelték, hogy a sporuláció mértéke és a szkleróciumok mérete tárolási módtól függetlenül csökkent 4 év tárolás után, a szárazon tárolt spórák életképessége alacsony, burgonya dextróz agaron pedig gyakori a felülfertőződés. Legjobbnak a homokban 4 °C -on és glicerinben -20 °C -on való tárolás bizonyult.

Gindro és Pezet (2001) *Botrytis cinerea* konídiumok tárolását vizsgálták előkezelés nélkül, különböző hőmérsékleteken, -80 °C, -20 °C, 4 °C és 21 °C -on. A kísérletet három éven keresztül végezték, eredményül azt kapták, hogy a 21 °C -on tárolt konídiumok már egy hónap

után elvesztették életképességüket, azonban a 30 hónapig, -80 °C, -20 °C és 4°C-on tárolt konídiumok sorrendben 79%, 8% és 0,2%-a sikeresen csírázott. A -80 °C-on tárolt konídiumok 99%-a csírázóképes volt az első hat hónapban, ez a szám megegyezik a friss konídiumok csírázási százalékával. Elektronmikroszkóppal megvizsgálva, a -80 °C-on tárolt konídiumok citoplazmájának visszahúzódó zónájában egy új falréteg kialakulását mutatták ki, összehasonlítva a friss konídiumokkal, a citoplazma integritása emellett megmaradt.

3.2.2 *Monilinia spp.*

Sanderson és Jeffers (1992) *Monilinia oycocci* tárolására kétféle fagyasztót („frost freezer”, „deep freezer” típusú) és két különböző szárítószer (CaCl₂, CaSO₄) tesztelték. A kísérletet 90 x 70 mm-es üveg edényekben végezték, melyek vermikulitot tartalmaztak. 10-15 darab szklerócium behelyezése után a vermikulitot ionmentes vízzel nedvesítették és az edényeket parafilmmel zárták le, majd 16 °C -on 12 órás fotoperióduson nevelték őket az apotéciumok megjelenéséig. Ezt követően az aszkospórákat naponta háromszor-négyszer gyűjtötték, majd a deszikkáló szert tartalmazó Petri-csészéket parafilmmel zárták le. A deszikkálás nélküli edényeket nem zárták le, így azokra hatással volt a környezet páratartalma. Az így elkészített edényeket az alábbi négy különböző hőmérsékletre helyezték: szobahőmérséklet, hűtőszekrény (4-6 °C), frost freezer és deep freezer típusú fagyasztó (-20 °C). Az aszkospórák életképességét két féle módszerrel tesztelték. Az első módszer szerint aszkospóra szuszpenziót készítettek és szobahőmérsékleten, PDA táptalajon nevelték 24-48 órán át, majd mikroszkóp alatt kicsírázott aszkospórákat kerestek. A másik módszer során az aszkospóra szuszpenziót tárgylemezre cseppentették, majd egy csepp fluorescein diacetat (FDA)-ot adtak hozzá, ezután 10 percig inkubálták. A fluoreszkálás eléréséhez egy speciális lámpát használtak, majd szintén mikroszkóp alatt számolták a világító spórákat. Eredményeik azt mutatták, hogy a „deep freezer” típusú fagyasztóban sokkal több (27,6%) aszkospóra maradt életben, mint a „frost-freezer” típusúban (10,9%). A frost freezer típusú fagyasztót használva 6 hónap után egyetlen aszkospóra sem maradt életben. Feltételezések szerint azért, mert ez a típusú fagyasztó folyamatosan változtatja a belső hőmérsékletet a jég felhalmozódásának elkerülése érdekében. Ezzel szemben a deep freezer típusú fagyasztó viszonylag állandó hőmérsékletet biztosít. A két alkalmazott szárítószer között viszont nem volt szignifikáns különbség, továbbá egyik fagyasztóban sem maradtak életben olyan aszkospórák melyekhez nem használtak szárítószer.

A kórokozók tárolás utáni életképessége az in vitro növényvédőszer hatékonyság tesztelésének szempontjából is kiemelten fontos. Zhu és mtsai. (2011) DMI fungicid rezisztens

Monilinia fructicola micéliumot és konídiumokat tároltak 36 héten át, 4 °C, -20 °C és -80 °C – on. A micéliumot háromféle módon tárolták, PDA ferde agaron szerves olajjal fedve, PDA táptalajon 10%-os glicerinnel fedve és szárított szűrőpapíron, a konídiumokat pedig szilikagélen tárolták. Megfigyeléseik szerint a tárolási módtól függetlenül csökken az izolátumok propikonazol ellenállósága, a rezisztencia azonban részben újra növekedni kezdett miután két hétig őszibarackon nevelték a kórokozót, tehát a kórokozók hosszútávú fenntartása hatással lehet a patogenitásra és virulenciára.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Helyszín és eszközök

A kísérletet a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük 2022-2023 között. Az izolálást és átoltást Thermo scientific lamináris boxban végeztük, melyben a munkavégzést megelőzően germicid UV fény, majd a munkavégzés alatt a vertikális légáram biztosította a steril körülményeket. A kísérletben használt lándzsátűket és dugófúrókat 70%-os alkohollal, majd lelángolással sterilizáltuk. A nedves kamrákba steril üveggyöngyöket helyeztünk a nedves kamra aljába, míg a magas páratartalmat desztillált vízzel biztosítottuk. A kórokozók tenyésztéséhez burgonya dextróz agar (Potato Dextrose Agar, PDA) táptalajt használtunk, melyet előzetesen kuktában 30 percen keresztül, magas nyomáson sterilizáltunk, ezt követően a tenyészetek létrehozásánál 85×13 mm-es, a kísérletben pedig 55×14 mm-es Petri-csészékbe öntöttünk. A leoltást, átoltást követően a Petri-csészéket parafilm szalaggal zártuk le.

A korongok kivágásához 5 mm-es dugófúrót használtunk, majd a korongokat steril 1,5 ml-es, műanyag mikrocentrifuga csövekbe helyeztük. A fedett korongok esetében a mikrocentrifuga csöveket 87%-os steril glicerinnel töltöttük meg. A csöveket papír tasakokba rendszereztük, majd azokat műanyag tasakokba helyeztük. A 22 °C -os hőmérsékletet egy PHCBI fitotron biztosította, a 10 és -20 °C -ot egy Gorenje hűtőszekrény, a -70 °C -ot pedig egy PHCBI típusú fagyasztó.

4.2 Kórokozók izolálása

A kísérlethez a *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa* és a *Botrytis cinerea* fitopatogén gombákat izoláltunk, melyeket 2022. tavaszán és őszén gyűjtöttünk az ország különböző részeiről ill. kereskedelmi forgalomból (1. táblázat). A kórokozók azonosítását klasszikus mikológiai módszerrel: a tünetek, a morfológiai és a tenyészbélyegek alapján végeztük. Gyűjtés során célom az volt, hogy az izolátumok különböző helyszínekről és különböző gazdanövényekről származzanak, hogy tesztelhető legyen az izolátumok közötti különbség.

1. táblázat: Az izolátumok elnevezés és jellemző adataik

Izolátum neve	Kórokozó	Gazdanövény	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje
BC-1	<i>Botrytis cinerea</i>	Szedér (<i>Rubus caesius</i>)	Budapest	2022. május
BC-2	<i>Botrytis cinerea</i>	Áfonya (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Budapest	2022. május
BC-3	<i>Botrytis cinerea</i>	Szőlő (<i>Vitis vinifera</i> 'Regal')	Budapest	2022. május
BC-4	<i>Botrytis cinerea</i>	Szőlő (<i>Vitis vinifera</i> 'Pölöskei muskotály')	Szekszárd	2022. május
MON-1	<i>Monilina fructigena</i>	Vadkörte (<i>Pyrus pyraeaster</i>)	Budapest	2022. szeptember
MON-2	<i>Monilina fructigena</i>	Körte (<i>Pyrus communis</i>)	Kishartyán	2022. szeptember
MON-3	<i>Monilinia laxa</i>	Díszcsereesznye (<i>Prunus serrulata</i>)	Budapest	2022. május
MON-4	<i>Monilinia laxa</i>	Szilva (<i>Prunus domestica</i>)	Kishartyán	2022. szeptember

A fertőzött növényi részeken megjelenő konídiumokat steril lándzsátű segítségével oltottuk le táptalajra. Amelyeken nem találtunk szaporítóképleteket, 1-2 napra nedves kamrába helyeztük, és szobahőmérsékleten, természetes megvilágítás mellett inkubáltuk a szaporítóképletek megjelenéséig. A fertőzött növényi részek vizsgálatához és a fruktifikáció

ellenőrzéséhez sztereómikroszkópot használtunk. A leoltást három pontra végeztük, majd parafilmezés és feliratozás után a Petri-csészéket fitotronban, 24 °C-on tartottuk, 12 órás megvilágítás mellett. 5-7 nap elteltével tiszta tenyészeteket hoztunk létre (6. ábra).



6. ábra: Tiszta tenyészetek létrehozása (Fotó: Kocsis Ivett, 2022)

4.3 A vizsgálat menete

A vizsgálat kezdetét megelőző héten kiválasztottunk 4 izolátumot mindkét kórokozó nemzetségből, melyeket alkalmasnak ítéltünk a kísérlethez. Ismétlés számnak a 3-at választottuk, mivel ez már, a korábbi tapasztalataink alapján, kellő biztonságot ad a kiértékelés során és a korongok számát tekintve is kezelhető mennyiség. A kísérlet előtt egy héttel minden tenyészetből 4 darab tiszta tenyészetet hoztunk létre a megfelelő számú korong eléréséhez.

A kísérletet 2022. 10. 12-én indítottuk. A kísérleti elrendezést a 2. táblázat mutatja be. Négy különböző hőmérsékletet választottunk: 22 °C, 10 °C, -20 °C és -70 °C. A korongok életképességét 3 hét (21 nap) 3 hónap (103 nap) és 6 hónap (159 nap) elteltével ellenőriztük. A különböző hőmérsékleten tárolt korongok felét 87%-os steril glicerinnel fedtük le: 3 darab fedetlen (glicerin nélkül) és 3 darab glicerinnel fedett került külön mikrocentrifuga csövekbe, így minden hőmérsékletre, időtartamra 6 darab korong jutott (7. ábra). A korongokat 5 mm-es dugófúróval vágtuk ki és mikrocentrifuga csövekben tároltuk, a glicerinnel fedett korongok esetében a csövekbe 1,5 ml steril glicerint töltöttünk. A kísérlettel párhuzamosan 24 °C-on elindítottunk egy tárolás nélküli kontroll sorozatot is, mely összehasonlítási alapként szolgált, ami alapján arra lehetett következtetni, hogy tárolás nélkül az adott kórokozó milyen növekedési mintázatot mutat. Ezzel a kiegészítő csoporttal megbizonyosodhattunk a tesztelt izolátumok alap növekedési intenzitásáról, így bármilyen ettől eltérő növekedésbeli mintázat a tárolásból fakadó kezeléseknek köszönhető.

2. táblázat: Kísérleti elrendezés kórokozónként, a számok a kezelési csoportok ismétléseinek számát jelölik

	Tárolási hőmérséklet							
	22 °C		10 °C		-20 °C		-70 °C	
	Glicerinnel történő fedés							
Tárolási idő	Fedett	Fedetlen	Fedett	Fedetlen	Fedett	Fedetlen	Fedett	Fedetlen
3 hét	3	3	3	3	3	3	3	3
3 hónap	3	3	3	3	3	3	3	3
6 hónap	3	3	3	3	3	3	3	3

Az egyes mintákat egyedi jelöléssel ellátva, egymástól függetlenül - mikrocentrifuga csövekben - tároltuk. A mikrocentrifuga csöveket az alábbi módon neveztük el, a szederről származó *B. cinerea* izolátummal bemutatva: BC_1_+20_3w_f1. A BC_1 a szederről származó izolátum elnevezése, +20 a tárolási hőmérsékletet mutatja, a 3w-azt azt jelenti, hogy 3 hétig tároltuk az adott mikrocentrifuga csövet, az f1 pedig azt jelöli, hogy glicerinnel voltak fedve a korongok.



7. ábra: A mikrocentrifuga csövekbe helyezett korongok hőmérsékletek szerint csoportba rendezve a tárolás előtt (Fotó: Juhász Dániel, 2022)

4.4 A tenyészetek növekedésének mérése

A különböző körülmények között tárolt izolátumok növekedési ütemének nyomon követésére a leoltástól kezdve két napos gyakorisággal mértem a tenyészetek átmérőit két irányban (1. melléklet; 2. melléklet). Ezt követően a mért adatok átlagának felhasználásával kiszámítottam a tenyészetek felületét (cm^2). A tenyészetek alakja szabályos körhöz hasonló mindhárom kórokozó esetében, ezért a tenyészetek felületét a kör területének képlete alapján számoltam. A statisztikai elemzés során ezzel a származtatott változóval számoltam tovább.

4.5 Statisztikai elemzés

A mérési adatok elemzéséhez az R statisztikai programot használtuk. A statisztikai elemzés során alkalmazott fontosabb programcsomagok: 'lme4', 'car'.

A tenyészetek életképességének ellenőrzése

Általános kevert hatású modellel (LMER) kórokozónként külön teszteltük a tenyészetek életképességét és növekedési intenzitását különböző tárolási kezelések hatásának figyelembevétele nélkül. Előzetesen azt feltételeztük, hogy a tárolási kezeléseknél alávetett izolátumok egészségesek és életképesek, így bármilyen változás a tenyészetek életképességében a kezeléseknél köszönhető. Az általános kevert hatású modellben a tenyészetnövekedés (cm^2) függő változóként, a leoltástól eltelt napok száma (diszkrét), valamint az izolátum azonosítója (faktor) pedig magyarázóváltozóként szerepelt. Az egyedileg jelölt tenyészetek méret változását ismételt mintavétellel mértük, így a mérési adatok összetartozását random faktor (tenyészetek egyedi azonosítója) segítségével vettük figyelembe a modellben.

A tárolási kezelések hatásának vizsgálata

A tenyészetek a mérés első felében vagy teljesen benőtték a Petri-csészét (55 mm, 100%) vagy az addigi területük a mérési időszak fennmaradó részében sem változott, így a mérési adatok (tenyészet területe) bimodális eloszlása miatt azok binarizálására volt szükség: „0” értéket kapott az a tenyészet, amely a mérés aktuális időpontjában még nem nötte be a teljes táptalajt, míg „1” értéket akkor, amikor a teljes táptalajt kolonizálta.

A tárolási hatások tenyészetnövekedésre gyakorolt hatásának teszteléséhez általánosított kevert hatású modellt használtunk, amelyben bináris eloszlásra korrigáltunk (GLMM-b). A modell segítségével teszteltük a tárolási idő, a tárolási hőmérséklet és a tárolás során alkalmazott fedési módszer hatását a kórokozók életképességére nézve. A modellben a

tenyészetek területe függő változóként, míg a tárolási hőmérséklet (diszkrét), a tárolási idő (diszkrét) és a fedés (faktor) magyarázó változóként szerepelt. A modellben teszteltük a tárolási idő×tárolási hőmérséklet, tárolási idő×fedés, valamint a tárolási hőmérséklet×fedés interakcióinak a hatását is. Az egyedileg jelölt tenyészetek méret változását ismételt mintavétellel mértük, így a mérési adatok összetartozását random faktorok (hierarchikus nested random faktor: tenyészetek egyedi azonosítója / izolátum egyedi azonosítója) segítségével vettük figyelembe a modellben a mintavételi pontok statisztikai függetlenségének megőrzése érdekében.

5. EREDMÉNYEK

5.1 *Botrytis cinerea*

A tenyészetek életképességének ellenőrzése

Az LMER modellben tesztelt tenyészetek életképességére a leoltástól eltelt napok száma változó szignifikáns hatást gyakorolt. Az izolátumok tárolási kezelés nélkül életképesek, így a tenyészetek életképességében bekövetkező bármilyen változás a kezeléseknak köszönhető (3. táblázat). Az izolátum hatása nem gyakorolt szignifikáns hatást a tenyészetek életképességére, tehát a különböző gazdanövényről származó izolátumok életképessége között nincs különbség.

3. táblázat: A leoltástól eltelt napok számának, valamint az izolátum hatása a tárolási kezelésben nem részesült *Botrytis cinerea* tenyészetek életképességére.

Tesztelt változó	Chi ²	Df	p-érték
Napok száma	35,281	1	p<0,001
Izolátum	0,647	3	0,886

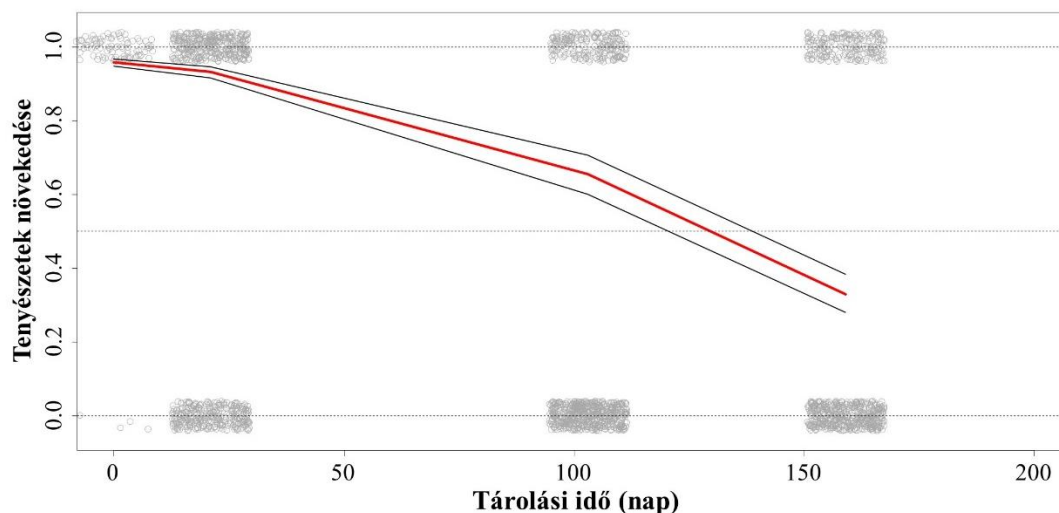
Tárolási kezelések hatása

A GLMM modellben tesztelt tárolási idő, tárolási hőmérséklet, fedés típus, valamint a tárolási hőmérséklet és a tárolási idő interakciója egyaránt szignifikáns volt, tehát ezek a változók kimutathatóan befolyásolták, hogy a *Botrytis cinerea* kórokozó tenyészetek teljes mértékben kolonizálták-e a Petri-csészéket (4. táblázat).

4. táblázat: A tárolási kezelések hatása a *Botrytis cinerea* kórokozó tenyészetek növekedésére

Tesztelt változó	Chi ²	Df	p-érték
Tárolási idő	27,317	1	p<0,001
Tárolási hőmérséklet	15,499	1	p<0,001
Fedés típusa	111,273	1	p<0,001
Izolátum	3,791	3	0,285
Tárolási idő x Tárolási hőmérséklet	8,675	1	0,003
Tárolási idő x Fedés típusa	2,164	1	0,141
Tárolási hőmérséklet x Fedés típusa	2,364	1	0,124

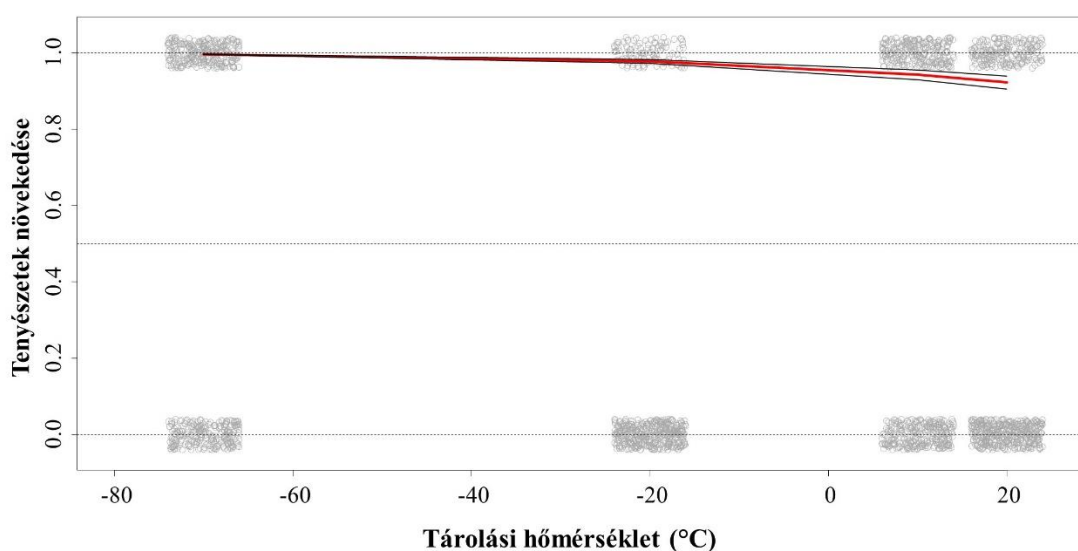
A **tárolási idő** esetében a szignifikáns hatás azt jelenti, hogy a tenyészetek területének növekedése a különböző tárolási időtartamok (21 nap, 103 nap, 159 nap) függvényében változott (4. táblázat, 8. ábra). A tárolási idő növelésével csökkent a táptalajt benövő tenyészetek aránya 21 nap tárolás után a tenyészetek jelentős része képes volt teljesen benőni a táptalajt, majd a tárolási idő növelésével a növekedés mértéke meredeken csökkent, 103, illetve 159 nap tárolás után a tenyészetek többsége nem volt képes kolonizálni a teljes Petri-csészét a mérés ideje alatt (8. ábra).



8. ábra: A tárolási idő hatása a *Botrytis cinerea* tenyészetek méretére

Ábramagyarázat: Tenyészetek mérete: „0” a vizsgálat ideje alatt a tenyészet nem kolonizálta a táptalaj teljes felületét; „1” a vizsgálat ideje alatt a tenyészet kolonizálta a táptalaj teljes felületét.

A **tárolási hőmérséklet** szignifikáns hatást gyakorolt a gombászatok növekedésre, tehát a gombászatok növekedését a tárolási hőmérséklet (-70 °C, -20 °C, 10 °C, 20 °C) is befolyásolta (4. táblázat). A tárolási hőmérséklet csökkentésével nőtt azon gombászatok aránya, amelyek képesek voltak a teljes Petri-csésze kolonizálására. A -70 és -20 °C-on történő tárolások között nem volt kimutatható különbség, míg a nem fagyasztott izolátumok (10 °C, 20 °C) tárolhatóság kimutathatóan, erősödő ütemben csökkent a hőmérséklet növelésével. Vizsgálatunk további érdekes eredménye, hogy a gombászatok életképességében nem mutatkozott számottevő különbség 20, illetve 10 °C-on történő tárolás után (9. ábra).

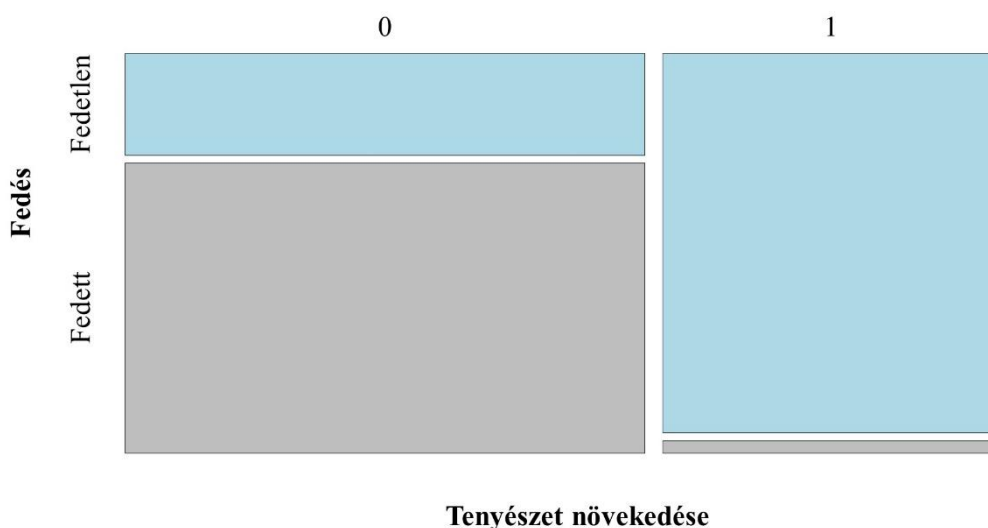


9. ábra: A tárolási hőmérséklet hatása a *Botrytis cinerea* gombászatok növekedésére.

Ábramagyarázat: Gombászatok növekedése: „0” a vizsgálat ideje alatt a gombászat nem kolonizálta a táptalaj teljes felületét; „1” a vizsgálat ideje alatt a gombászat kolonizálta a táptalaj teljes felületét.

A **fedés** kezelés esetében a szignifikáns hatás azt jelenti, hogy a tenyészetek területének növekedése attól függően változott, hogy a kísérlet során a kórokozót glicerinnel fedve vagy anélkül tároltuk (4. táblázat). A mérés időtartama alatt a glicerinnel fedett, oxigéntől elzárt korongok életképessége jelentősen lecsökkent. A fedetlen korongok döntő többségéből a kórokozó képes volt teljes egészében kolonizálni a Petri-csészét a mérés időtartama alatt, addig a glicerinnel fedett korongokból sokkal nagyobb arányban fejlődtek olyan tenyészetek, amelyek nem voltak képesek a teljes Petri-csésze kolonizálására (10. ábra).

A **tárolási hőmérséklet és a tárolás időtartamának interakciója** is szignifikáns hatást gyakorolt a *Botrytis cinerea* tenyészetek életképességére, amely azt jelzi, hogy a tárolási idő az egyes tárolási hőmérsékleteken eltérő mértékű növekedési értéket eredményezett (4. táblázat).



10. ábra: A tárolási hőmérséklet hatása a *Botrytis cinerea* tenyészetek növekedésére.

Ábramagyarázat: Tenyészetek növekedése: 0: tenyészet nem vagy csak részlegesen kolonizálta a táptalaj felületét a mérés aktuális időpontjában; 1: tenyészet kolonizálta a táptalaj teljes felületét a mérés aktuális időpontjában.

Izolátumok közötti különbség

A vizsgálat során a *Botrytis cinerea* kórokozó izolátumainak nem volt szignifikáns hatása a tenyészetek életképességére (4. táblázat), tehát az izolátumok között nem tapasztaltunk különbségeket a különböző módon tárolt tenyészetek életképességében.

5.2 *Monilinia fructigena*

A tenyészetek életképességének ellenőrzése

Az LMER modellben tesztelt tenyészetek életképességére a leoltástól eltelt napok száma változó szignifikáns hatást gyakorolt. Az izolátumok tárolási kezelés nélkül életképesek, így a tenyészetek életképességében bekövetkező bármilyen változás a kezeléseknak köszönhető (5. táblázat). Az izolátum változó nem gyakorolt szignifikáns hatást a tenyészetek életképességére, tehát a különböző eredetű izolátumok életképessége között nincs különbség.

5. táblázat: A leoltástól eltelt napok számának, valamint az izolátum hatása a tárolási kezelésben nem részesült *Monilinia fructigena* tenyészetek életképességére.

Tesztelt változó	Chi ²	Df	p-érték
Napok száma	59,975	1	p<0,001
Izolátum	2,001	1	0,157

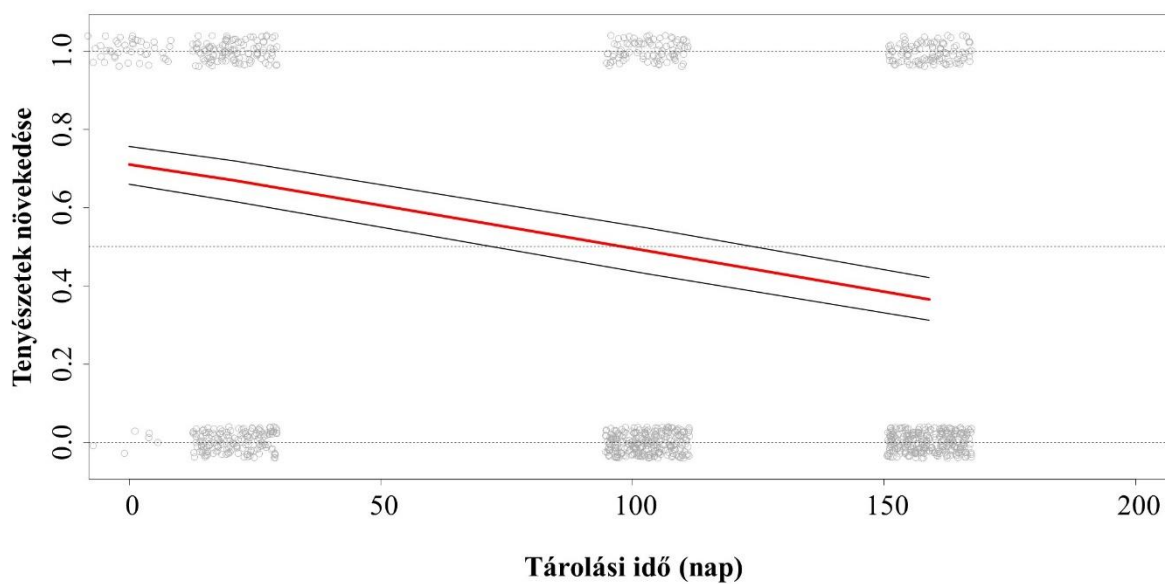
Tárolási kezelések hatása

A GLMM modellben tesztelt tárolási idő, fedés típusa változók egyaránt szignifikánsak voltak, tehát a tárolási idő és a fedés típusa kimutathatóan befolyásolták, hogy a *Monilinia fructigena* kórokozó tenyészetek teljes mértékben kolonizálták-e a Petri-csészét (6. táblázat).

6. táblázat: A tárolási kezelések hatása a *Monilinia fructigena* kórokozó tenyészetek növekedésére

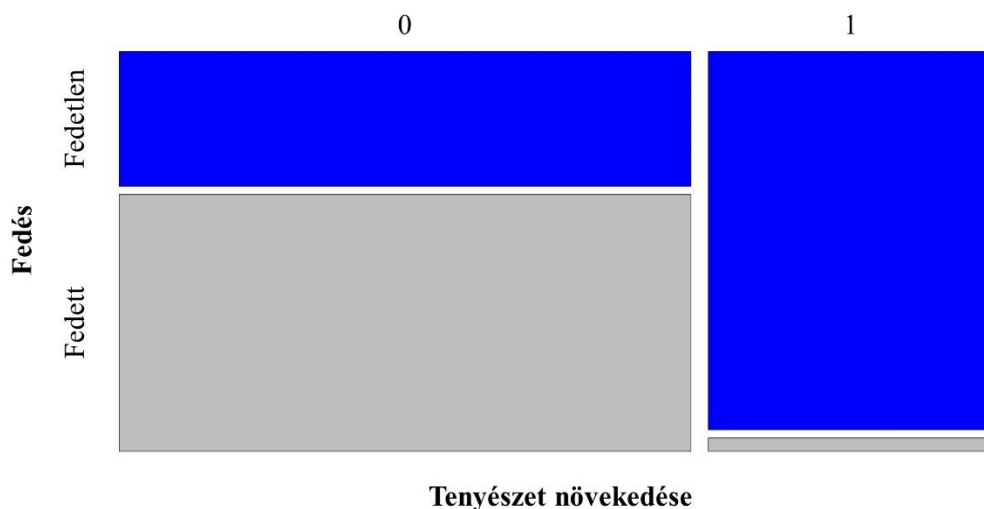
Tesztelt változó	Chi ²	Df	p-érték
Tárolási idő	4,939	1	0,026
Tárolási hőmérséklet	2,188	1	0,139
Fedés típusa	58,382	1	p<0,001
Izolátum	0,917	1	0,338
Tárolási idő x Tárolási hőmérséklet	0,117	1	0,732
Tárolási idő x Fedés típusa	0,505	1	0,477
Tárolási hőmérséklet x Fedés típusa	1,037	1	0,308

A **tárolási idő** esetében a szignifikáns hatás azt jelenti, hogy a tenyészetek területének növekedése a különböző tárolási időtartamok (21 nap, 103 nap, 159 nap) függvényében változott (6. táblázat). Vizsgálatunk eredménye alapján elmondható, hogy a *Monilinia fructigena* kórokozó életképességét negatívan befolyásolja a tárolási idő, ugyanis a tárolás időtartamának növelésével jelentősen növekedett azoknak a tenyészetnek az aránya, amelyek nem voltak képesek a teljes Petri-csésze kolonizálására (11. ábra).



11. ábra: A tárolási idő hatása a *Monilinia fructigena* tenyészetek növekedésére

A **fedés** kezelés esetében a szignifikáns hatás azt jelenti, hogy a tenyészetek területének növekedése attól függően változott, hogy a kísérlet során a kórokozót glicerinnel fedve vagy anélkül tároltuk (6. táblázat). A mérés időtartama alatt a glicerinnel fedett korongokból indított kórokozó életképessége jelentősen csökkent. A fedetlen korongok döntő többségéből olyan tenyészet fejlődött, amely képes volt teljes egészében kolonizálni a Petri-csészét a mérés időtartama alatt. Ezzel szemben a fedett korongokból sokkal nagyobb arányban fejlődtek olyan tenyészetek, amelyek nem voltak képesek a teljes Petri-csésze kolonizálására (12. ábra).



12. ábra: A tárolási hőmérséklet hatása a *Monilinia fructigena*. tenyészetek növekedésére.

Ábramagyarázat: Tenyészetek növekedése: 0: tenyészet nem vagy csak részlegesen kolonizálta a táptalaj felületét a mérés aktuális időpontjában; 1: tenyészet kolonizálta a táptalaj teljes felületét a mérés aktuális időpontjában.

Izolátumok közötti különbség

A vizsgálat során a *Monilinia fructigena* kórokozó izolátumainak nem volt szignifikáns hatása a tenyészetek életképességére (6. táblázat), tehát az izolátumok között nem tapasztaltunk különbségeket a különböző módon tárolt tenyészetek életképességében.

5.3 *Monilinia laxa*

A tenyészetek életképességének ellenőrzése

Az LMER modellben tesztelt tenyészetek életképességére a leoltástól eltelt napok száma változó szignifikáns hatást gyakorolt. Az izolátumok tárolási kezelés nélkül életképesek, így a tenyészetek életképességében bekövetkező bármilyen változás a kezeléseknak köszönhető (7. táblázat). Az izolátum változó nem gyakorolt szignifikáns hatást a tenyészetek életképességére, tehát a különböző eredetű izolátumok életképessége között nincs különbség.

7. táblázat: A leoltástól eltelt napok számának, valamint az izolátum hatása a tárolási kezelésben nem részesült *Monilinia laxa* tenyészetek életképességére.

Tesztelt változó	Chi ²	Df	p-érték
Napok száma	58,380	1	p<0,001
Izolátum	3,042	1	0,081

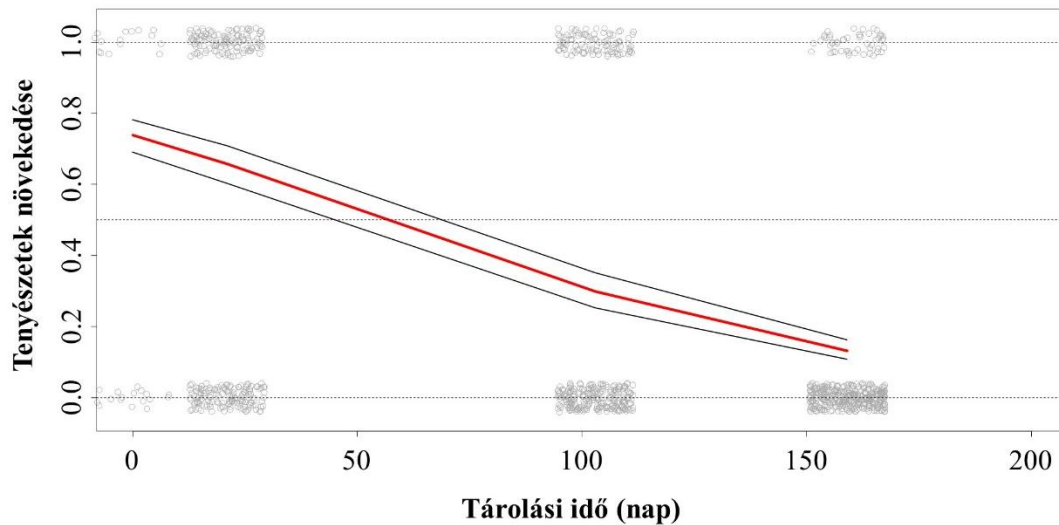
Tárolási kezelések hatása

A GLMM modellben tesztelt tárolási idő, tárolási hőmérséklet, valamint a tárolási hőmérséklet és a tárolási idő interakciója egyaránt szignifikáns volt, tehát ezen változók kimutathatóan befolyásolták, hogy a *Monilinia laxa* kórokozó tenyészetek teljes mértékben benőtték-e a Petri-csészét (8. táblázat).

8. táblázat: A tárolási kezelések hatása a *Monilinia laxa* kórokozó tenyészetek növekedésére

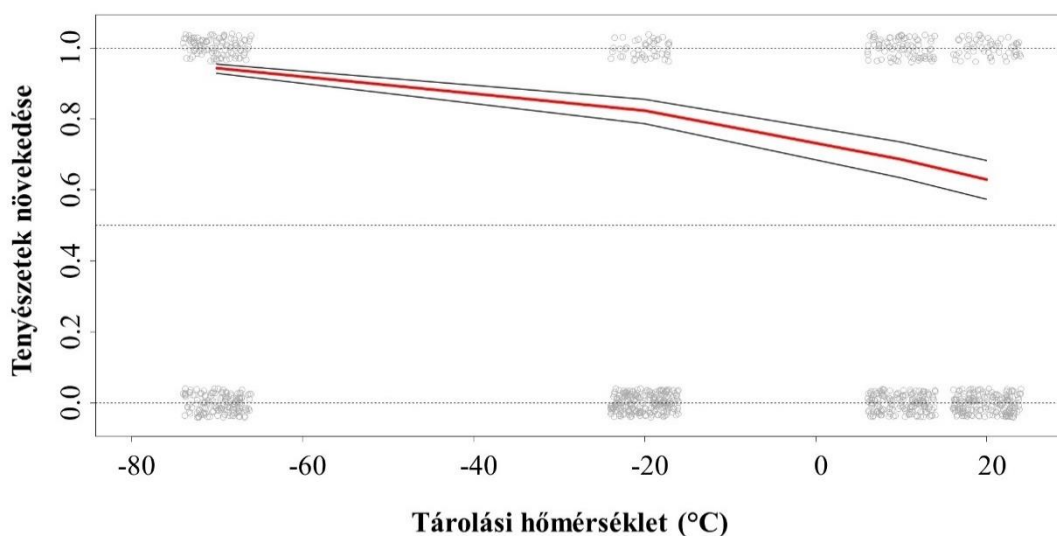
Tesztelt változó	Chi ²	Df	p-érték
Tárolási idő	20,829	1	p<0,001
Tárolási hőmérséklet	14,164	1	p<0,001
Fedés típusa	0,000	1	0,999
Izolátum	2,669	1	0,102
Tárolási idő x Tárolási hőmérséklet	5,534	1	0,019
Tárolási idő x Fedés típusa	0,000	1	1,000
Tárolási hőmérséklet x Fedés típusa	0,000	1	1,000

A **tárolási idő** esetében a szignifikáns hatás azt jelenti, hogy a tenyészetek területének növekedése a különböző tárolási időtartamok (21 nap, 103 nap, 159 nap) függvényében változott (8. táblázat). Vizsgálatunk eredménye alapján elmondható, hogy a *Monilinia laxa* kórokozó életképességét negatívan befolyásolja a tárolási idő, ugyanis a tárolás időtartamának növelésével jelentősen csökkent azoknak a tenyészetnek az aránya, amelyek képesek voltak a teljes Petri-csésze kolonizálására. A tenyészetek életképessége már 21 nap tárolás után is jelentősen romlott (13. ábra).



13. ábra: A tárolási idő hatása a *Monilinia laxa* tenyészetek növekedésére

A **tárolási hőmérséklet** szignifikáns hatást gyakorolt a tenyészetek növekedésre, tehát a *Monilinia laxa* tenyészetek növekedését a tárolási hőmérséklet (20 °C, 10 °C, -20 °C, -70 °C) befolyásolta (8. táblázat). A tárolási hőmérséklet csökkentésével nőtt azon tenyészetek aránya, amelyek képesek voltak a teljes Petri-csésze kolonizálására (14. ábra). A mérés ideje alatt a hosszútávú fenntartásra legalkalmasabbnak a -70 °C-on történő tárolás bizonyult, a tenyészetek döntő többsége képes volt a teljes táptalaj kolonizálására a hőmérsékleti kezelés után (14. ábra).



14. ábra: A tárolási hőmérséklet hatása a *Monilinia laxa* tenyészetek növekedésére

A **tárolási hőmérséklet és a tárolás időtartamának interakciója** is szignifikáns hatást gyakorolt a *Monilinia laxa* tenyészetek életképességére, vagyis a tenyészetek életképességét a hosszútávú fenntartás során a tárolási idő és a tárolási hőmérséklet együttesen határozták meg (8. táblázat).

Izolátumok közötti különbség

A vizsgálat során a *Monilinia laxa* kórokozó izolátumainak nem volt szignifikáns hatása a tenyészetek életképességére (8. táblázat), tehát az izolátumok között nem tapasztaltunk különbségeket a különböző módon tárolt tenyészetek életképességében.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a különböző tárolási kezelések kimutathatóan befolyásolják a *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* és *Monilinia fructigena* kórokozók életképességét a hosszútávú, in vitro laboratóriumi fenntartás során.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált összes kórokozó életképességét negatívan befolyásolta a tárolási idő, tehát a megnövelt tárolási idő jelentősen csökkentette a kórokozók életképességét. Ez a hatás kórokozó-specifikusan jelentkezett, ugyanis a *Botrytis cinerea* kórokozó esetében a tárolási idő negatív hatása mindössze a 3 és 6 hónapon át tartó tárolás után jelentkezett, addig a *Monilinia fructigena* és a *Monilinia laxa* esetében a teljes Petri-csészét kolonizáló tenyészetek arányának drasztikus csökkenését már 3 hét tárolás után megfigyeltük. Mindezekkel szemben számos szakirodalmi eredmény az eredményeinkkel ellentétes hatásról számoltak be, azonban ezek a vizsgálatok csak egy-egy tényezőt vettek figyelembe a kórokozók tárolhatósága szempontjából, ami nem feltétlenül ad hiteles képet a kérdéssel kapcsolatban. Például Borman és mtsai. (2006) vizsgálataik során megállapították, hogy a kórokozó életképessége nem függ nagymértékben a tárolási időszak hosszától. Hasonló eredményekről számolt be egy másik vizsgálat is. Delcán és mtsai. (2002) kísérletében 4 év tárolás után a kórokozó lineáris növekedése általában hasonló volt, vagy a növekedési érték meghaladta a kezdetben mért értékeket. Saját kísérletünk során egy sokkal komplexebb megközelítést alkalmaztunk. A vizsgálatunkhoz hasonlóan, Gindro és Pezet (2001) is arról számolt be, hogy a *Botrytis cinerea* 21 °C -on tárolt konídiumai már egy hónap után elvesztették életképességüket, azonban a 30 hónapig, -80 °C, -20 °C és 4 °C-on tárolt konídiumok sorrendben 79%, 8% és 0,2%-a sikeresen csírázott. Jól látható ebből a vizsgálatból, hogy a tárolási idő és a hőmérséklet hatásának együttes figyelembe vétele kritikus szempont a hosszútávú tárolási körülmények meghatározásakor, hiszen ezek interakciója határozta meg a *Botrytis cinerea* kórokozó fenntartását.

A hőmérséklet számos biológiai folyamatot jelentősen befolyásol, így ennek alapján feltételeztük, hogy a kórokozók eltarthatóságára a tárolási hőmérséklet is jelentős hatást fog gyakorolni. Eredményeink alapján a tárolási hőmérséklet csökkentésével nőtt azon tenyészetek aránya, amelyek képesek voltak a teljes Petri-csésze kolonizálására, amely mintázat összhangban van a szakirodalomban található korábbi tudományos eredményekkel (Gindro és Pezet, 2001; Delcán és mtsai., 2002). Delcán és mtsai. (2002) kutatása során igazolták a tárolási hőmérséklet életképességet befolyásoló hatását a különböző kórokozók tenyészeire nézve. Legjobbnak a homokban 4 °C -on és glicerinben -20 °C -on való tárolást találták, azonban

vizsgálataink során a fedés típusa és a tárolási hőmérséklet interakciója nem bizonyult szignifikáns hatásúnak. A kutatásunkban a *Botrytis* esetében -70 és -20 °C-on történő tárolások között nem volt kimutatható különbség, míg a nem fagyasztott izolátumok (10 °C, 20 °C) tárolhatósága nagymértékben csökkent a hőmérséklet növelésével. A *Monilinia laxa* növekedésére szintén negatívan hatott a tárolási hőmérséklet növelése. Így hosszútávon a legjobb növekedést -70 °C-os tárolás mellett értünk el. Ennek vélhetően az lehetett az oka, hogy a fagypont fölötti hőmérsékleteken tárolt izolátumok valószínűleg folytatták a növekedést és az anyagcsere folyamatok is csak lassultak, így idővel elfogytak a forrásaik (táptalaj, oxigén) és életképességük ezáltal jelentősen lecsökkent.

Megállapítottuk, hogy a vizsgált kórokozók hosszútávú eltarthatóságát a levegőtől való elzárás is kimutathatóan befolyásolja. A *Botrytis cinerea* és *Monilinia fructigena* izolátumok esetében vizsgálataink során hasonló mintázatot írtunk le. A glicerinnel fedett korongok döntő többsége egyáltalán nem indult növekedésnek a mérések alatt. Ennek hátterében valószínűleg az oxigén hiánya állhat, amely a tárolás során csökkenthette a tenyészetek életképességét. Delcán és mtsai. (2002) glicerinben tárolt izolátumok esetében 14%-os növekedésbeli csökkenést tapasztaltak a kezdeti értékekhez képest. Ezzel összhangban a *Botrytis cinerea* és *Monilinia fructigena* izolátumok esetében vizsgálataink során hasonló mintázatot írtunk le. A glicerinnel fedett korongok döntő többsége egyáltalán nem indult növekedésnek a mérések alatt. Ennek hátterében valószínűleg az oxigén hiánya állhat, amely a tárolás során csökkenthette a tenyészetek életképességét.

Korábban feltételeztük, hogy a fajon belül az egyes izolátumok jelentős eltérést mutathatnak egymáshoz képest. A feltételezést számos szakirodalmi forrás erősíti. Például egy vizsgálatban különböző *Botrytis cinerea* izolátumok növekedési üteme PDA táptalajon 7,3 és 26,7 mm között alakult (Tanović és mtsai., 2009). Jelen vizsgálatunk során a különböző *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* és *Monilinia fructigena* izolátumok növekedési üteme között nem tapasztaltunk különbséget, tehát a különböző gazdanövényekről származó izolátumok tárolhatók azonos módon, a tárolás utáni életképességüket sem befolyásolta azt, hogy milyen gazdanövényről származtak.

Vizsgálataink hozzájárulnak a vizsgált *Botrytis* és *Monilinia* fajok laboratóriumi fenntartásához. A vizsgálat célja és időtartama alapján kiválasztható, hogy milyen körülmények között a legcélszerűbb tárolni az adott faj izolátumait.

A *Botrytis cinerea* életképes marad -20, vagy akár -70°C-on is. Williamson és mtsai. (2007) is azt valószínűsítették, hogy a hűtött áru kereskedelmének növekedése hozzájárult a kórokozó jelentőségének növekedéséhez. De a *Botrytis cinerea* csak egyetlen kiragadott példa

a hűtött áruk és élelmiszerek felszínén jelenlévő kórokozókra. Vizsgálatunk felhívja a figyelmet egy talán kevésbé hangsúlyozott problémára, hogy a fagyasztva tárolt élelmiszereinkkel vagy élelmiszeripari nyersanyagokkal növénypatogén kórokozók juthatnak el észrevétlenül a világ bármely pontjára, úgy hogy mindeközben megőrizhetik életképességüket és fertőzőképességüket. Nehéz megbecsülni, hogy a jelenségnek az inváziós fajok terjedése szempontjából milyen növényegészségügyi, és a mikotoxinokat termelő fajok kapcsán milyen humánegészségügyi kockázatai lehetnek.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Botrytis* és a *Monilinia* fajok világviszonylatban a legjelentősebb széles gazdanövénykörrel rendelkező növénypatogén gombák közé tartoznak. Szabadföldön és a termények tárolása során is minden évben komoly veszteséget okozhatnak világszerte. A kórokozók virulenciájának jellemzéséhez, a fungicidek hatékonyságának teszteléséhez vagy akár növényvédőszer-rezisztencia vizsgálatokhoz gyakran hosszadalmas laboratóriumi vizsgálatok szükségesek, amely során elengedhetetlen, hogy az izolátumok életképesek maradjanak és hosszútávon megőrizzék eredeti növekedési képességüket, morfológiai jellemzőiket. Azonban a fenntartási módszerek többsége azok magas költségigénye miatt csak korlátozottan elérhető a kisebb laboratóriumok számára, ezért indokolt az alacsony költségű módszer vizsgálata, amelyek jó alternatívaként szolgálhatnak.

Az utóbbi évtizedekben már számos kutatás irányult a növényi kórokozók in vitro fenntartására, ennek ellenére kevés szakirodalom szól a *Botrytis cinerea* és *Monilinia* spp. táptalajon történő tárolásról, fagyasztásról. Munkánk során 4 *Botrytis*, 2 *Monilinia fructigena* és 2 *Monilinia laxa* izolátumot vizsgáltunk. A kutatás elsődleges célja volt, hogy feltárjuk az alkalmazott tárolási körülmények közül azokat a legfontosabb tényezőket, amelyek befolyásolják ezen növénypatogén izolátumok hosszútávú megőrzését.

A kutatás során az alábbi vizsgálati kérdéseket fogalmaztuk meg: (1) Kimutatható-e különbség a különböző ideig tárolt izolátumok növekedési üteme között? (2) Kimutatható-e különbség a különböző hőmérsékleten tárolt izolátumok növekedési üteme között? (3) Kimutatható-e különbség a különböző fedési módszerrel tárolt izolátumok növekedési üteme között? (4) Kimutatható-e különbség a különböző izolátumok növekedési üteme között (fajon belül)? A kísérlet beállításához PDA táptalajon sporuláló tenyészetekből kivágott korongokat tároltunk különböző hőmérsékleteken fedés nélkül, illetve glicerinnel fedve. Az izolátumok virulenciáját 3 hét (21 nap) 3 hónap (103 nap) és 6 hónap (159 nap) elteltével PDA táptalajon, szobahőmérsékleten, természetes fotoperiódus mellett vizsgáltuk. A különböző tárolási módszerek összehasonlítása és értékelése a tenyészetek növekedési ütemének vizsgálatán alapult.

Kutatásunk eredményeként a *Botrytis* esetében az összes tárolási tényező (idő, hőmérséklet, fedés típusa, valamint a tárolási hőmérséklet és a tárolási idő interakciója) egyaránt hatással voltak a kórokozó növekedésére. A *Monilinia fructigena* esetében a tárolási idő és a fedés, míg a *Monilinia laxa* növekedésére az idő és a hőmérséklet gyakorolt kimutatható hatást.

A tárolási időtartam növelése és a tárolási hőmérséklet növelése egyaránt rontotta mindhárom kórokozó növekedési képességét, hiszen a hőmérséklet növekedésével az anyagcsere folyamatok is élénkültek, és az idő előrehaladtával a kórokozók felélték a rendelkezésükre álló forrásokat (tápanyag, oxigén). A légmentesen tárolt korongokból sokkal kisebb arányban fejlődnek életképes tenyészetek. A fajok különböző izolátumainak tárolás utáni növekedési üteme között nem találtunk különbséget, tehát a különböző gazdanövényről származó *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* és *Monilinia laxa* izolátumok azonos körülmények között tárolhatók.

A vizsgálat során feltártuk a különböző tárolási körülmények egymáshoz viszonyított hatásait, melyek segítséget nyújtanak a tesztelt kórokozók hosszútávú laboratóriumi fenntartásához. Eredményeink felhívják továbbá a figyelmet növénypatogén kórokozók fagyasztva tárolt élelmiszerekkel vagy nyersanyagokkal történő terjedésére.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aktaruzzaman, Md., Afroz, T., Lee, Y.-G. és Kim, B.-S. 2017. *Botrytis cinerea* is the causal agent of post-harvest grey mould rot on green bean (*Phaseolus vulgaris*) in Korea. In: Australasian Plant Disease Notes. 12 évf. 1 sz. p. 32.
2. Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E. és Leroux, P. 2002. Eburicol 14a-demethylase gene (cyp51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. In: Mycological Research. 106 évf. 10 sz. p. 1171–1178.
3. Amselem, J., Cuomo, C.A., van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A., Coutinho, P.M., de Vries, R.P., Dyer, P.S., Fillinger, S. és Dickman, M. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. In: PLoS Genetics. 7 évf. 8 sz. p. 3.
4. Batra, L.R. 1991. World species of *Monilinia* (Fungi): Their ecology, biosystematics and control. In: Mycologia Memoir. 16 évf. p. 135.
5. Beever, R.E. és Weeds, P.L. 2007. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. *Botrytis*: Biology, pathology and control. In: Springer. p. 29–52.
6. Borman, A.M., Szekely, A., Colin, K.C. és Elizabeth, M.J. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. In: Mycopathologia. 161 évf. 6 sz. p. 361–368.
7. Braverman, S.W. és Croiser, W.F. 1966. Longevity and pathogenicity of several *Helminthosporium* species stored under mineral oil. In: Plant Disease Reporter. p. 321–323.
8. Brooks, C., és Cooley, J. S. 1917. Temperature relations of apple-rot fungi. In: Journal of Agricultural Research. p. 139–164.
9. Brown, W. 1922. On the germination and growth of fungi at various temperatures and in various concentrations of oxygen and carbon dioxide. In: Annals of Botany. 36 évf. 142 sz. p. 257–283.
10. Byrde, R.J.W. és Willetts, H.J. 1977. The brown rot fungi of fruit: Their biology and control. Pergamon Press. p. 156–377.
11. Delcán, J., Moyano, C., Raposo, R. és Melgarejo, P. 2002. Storage of *Botrytis cinerea* using different methods. In: Journal of Plant Pathology. 84 évf. 1 sz. p. 3–9.
12. Doran, W. L. 1922. Effect of external and internal factors in the germination of fungous spores. In: Bulletin of the Torrey Botanical Club. 49 évf. 11 sz. p. 313–336.

13. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. és Delen, N. 2007. *Botrytis spp.* and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. *Botrytis: biology, pathology and control*. In: Springer. p. 1–8.
14. Gindro, K. és Pezet, R. 2001. Effects of long-term storage at different temperatures on conidia of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. In: *Microbiology Letters*. 204 évf. 1 sz. p. 101–104.
15. Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K. és Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. In: *Phytopathology*. 89 évf. 10 sz. p. 967–973.
16. Glits M. és Folk G. 2000. Kertészeti növénykórtan. Budapest. Mezőgazda Kiadó. p. 257–259 és p. 270–272.
17. Haas, P.G. de, és Wennemuth, G. 1962. Kühlagerung von Baumschulgehölzen. III. *Botrytis*-und *Fusarium*befall an Gehölzen im Kühllager. In: *Gartenbauwissenschaft*. p. 231–242.
18. Hennebert, G. L. 1973. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. In: *Persoonia*. 7 évf. 2 sz. p. 183–204.
19. Hennebert, G.L., és Gilles, G. L. 1958. Epidémiologie de *Botrytis cinerea* Pers. sur les fraisières. *Meded. Landbouwhogeschool. Opzoekingsstn. Staat Gent*. p. 864–888.
20. Holden, A.N.G. és Smith, D. 1992. Effects of cryopreservation methods in liquid nitrogen on viability of *Puccinia abrupta* var. *partheniicola* urediniospores. In: *Mycological Research*. 96 évf. 6 sz. p. 473–476.
21. Horváthné P.M. 2009. A *Monilinia fructicola* és a *Monilia polystroma* megjelenése Magyarországon és a védekezés újabb lehetősége. *Budapesti Corvinus Egyetem*. p. 19–23.
22. Jarvis, W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species-taxonomy physiology and pathogenicity. In: *Monograph*. 15 évf. p. 20–31.
23. Johnson, G.C. és Martin, A.K. 1992. Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 38 évf. 8 sz. p. 861–864.
24. Karen, K.N., Stephen, W.P., és Shung-chang, J. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. In: *Elsevier Academic Press*. p. 37–47.
25. Karova, V. 1974. Proucsvanija vörhu *Monilinia laxa* Ehr. i *Bioetologia*. *Gradin. Loz. Nauka Szofija*. p. 27–33.
26. Kublitskaya, M.A. és Ryabtseva, N.A. 1970. Biology of the winter state of *Botrytis cinerea*. *Mikologiya*. In: *Fitopatologiya*. 4 évf. 4 sz. p. 291–293.
27. Kwon, J.H., Cheon, M.G., Choi, O. és Kim, J. 2011. First Report of *Botrytis cinerea* as a Postharvest Pathogen of Blueberry in Korea. In: *Mycobiology*. 39 évf. 1 sz. p. 52–53.

28. Miller, M. W. 1982. The morphology, ecology and fungicidal tolerance of *Botrytis cinerea* Isolates. Department of Biology. Liverpool John Moores University. p. 6–9.
29. Mirzaei, S., Goltapeh, E.M., Bakhsh, M.S., Safaie, N. és Chaichi, M. 2009. Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. In: Journal of Phytopathology. 157 évf. 7-8 sz. p. 474–482.
30. Muñoz, Z., Moret, A. és Bech, J. 2008. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Monilinia spp.* y pruebas de patogenicidad sobre manzana. In: Agrobiencia. 42 sz. 1 sz. p. 119–128.
31. Nonaka, F. és Morita, A. 1967. *Botrytis cinerea* Persoon. I. On the cultural properties. Agricultural Bulletin. Saga University. p. 93–107.
32. Park, K.H., Ryu, K.Y., Yun, H.J., Yun, J.C., Kim, B.S., Jeong, K.S., Kwon, Y.S. és Cha, B. 2011. Gray mold on carrot caused by *Botrytis cinerea* in Korea. In: The Korean Society of Plant Pathology. 17 évf. 3 sz. p. 364–368.
33. Paul, W.R.C. 1929. A comparative morphological and physiological study of a number of strains of *Botrytis cinerea* Pers. with special reference to their virulence. In: Transactions of the British Mycological Society. 14 évf. 1-2 sz. p. 118–134.
34. Petrőczy M., Glits M. és Palkovics L. 2004. *Monilia* fajok dísznövényeken. 9. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum. 2004. október 20-21. Debrecen. p. 182–188.
35. Petrőczy M. és Palkovics L. 2009. First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. In: European Journal of Plant Pathology. 125 évf. p. 343–347.
36. Petrőczy M., Szigethy A. és Palkovics L. 2011. *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics, and molecular analysis. In: Springer. 26 évf. 1 sz. p. 153–164.
37. Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. és Lannou, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. In: Plant Pathology. 58 évf. 3 sz. p. 409–424.
38. Robinson, J.D. és Xu, X.-M. 2000. Epidemiology of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple: infection of fruits by conidia. In: British Society for Plant Pathology. 49 évf. 2 sz. p. 201–206.
39. Rungjindamai, N., Jeffries, P. és Xu, X.M. 2014. Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*. In: European Journal of Plant Pathology. 140 évf. 1 sz. p. 1–17.
40. Sanderson, P.G. és Jeffers, S.N. 1992. Collection, viability, and storage of ascospores of *Monilinia oxycocci*. In: Phytopathology. 82 évf. 2 sz. p. 160–163.

41. Schneider-Orelli, O. 1912. Versuche über die Wachstumsbedingungen und Verbreitung der Fäulnispilze des Lagerobstes. In: Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. 32 évf. p. 161–169.
42. Shiraishi, M., Fukutomi, M. és Akai, S. 1970. On the mycelial growth and sporulation of *Botrytis cinerea* Pers. and the conidium germination and appressorium formation as affected by the conidial age. In: Japanese Journal of Phytopathology. 36 évf. 4 sz. p. 230–233.
43. Smith, D. és Onions, A.H.S. 1983. A comparison of some preservation techniques for fungi. In: Transactions of the British Mycological Society. 81 évf. 8 sz. p. 535–540.
44. Staats, M., Peter, van Barlen, P. és van Kan, J.A.L. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. In: Molecular Biology and Evolution. 22 évf. 2 sz. p. 333–346.
45. Tanović, B., Delibašić, G., Milivojević, J. és Nikolić, M. 2009. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. In: Archives of Biological Sciences. 61 évf. 3 sz. p. 419–429.
46. Tran, T.T., Li, H., Nguyen, D.Q., Sivasithamparam K., Keppler Jones, M.G. és Wylie, S.J. 2020. Comparisons between genetic diversity, virulence and colony morphology of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolates. In: Plant Pathology. 102 évf. 3 sz. p. 743–751.
47. Tudzynski B. és Gronover C.S. 2007. Signalling in *Botrytis cinerea*. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. In: Springer. p. 85–97.
48. Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. és van Kan J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology. In: British Society for Plant Pathology. 8 évf. 5 sz. p. 561–580.
49. Wormald, H. 1954. The brown rot diseases of fruit trees. Technical Bulletin of the Ministry of Agriculture. p. 1–113.
50. Xu, X.-M., Guerin, L. és Robinson, J.D. 2001. Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilinia fructigena*. Plant Pathology. In: British Society for Plant Pathology. 50 évf. 5 sz. p. 561–568.
51. Zhu, F., Bryson, K.F. és Schnabel, G. 2011. Influence of storage approaches on instability of propiconazole resistance in *Monilinia fructicola*. In: Pest Management Science. 67 évf. 7 sz. p. 1003–1009.

Internetes források

Internet 1. <https://www.mycobank.org/>

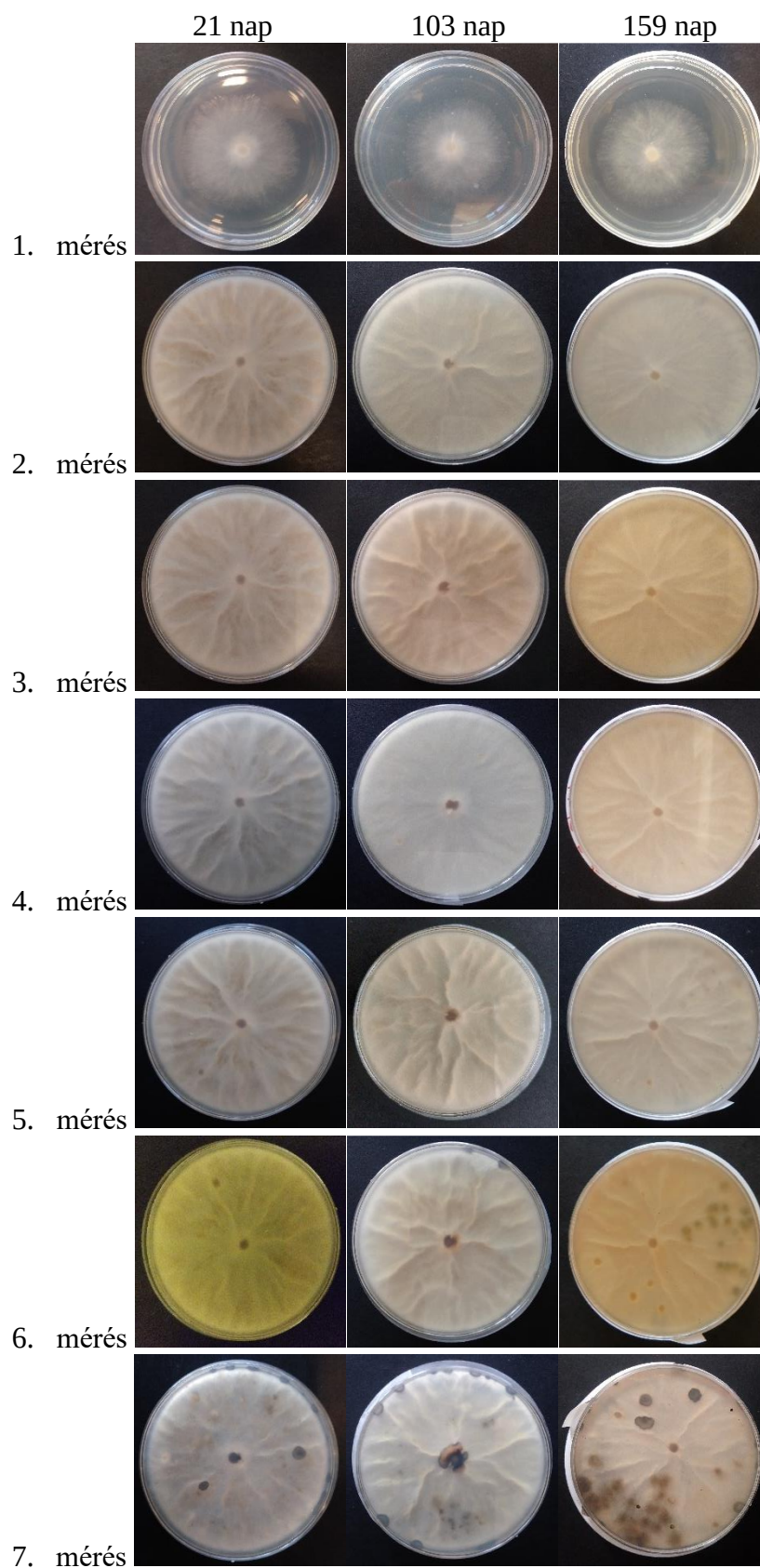
Internet 2. [Taxonomy browser \(*Monilinia fructigena*\) \(nih.gov\)](#)

Internet 3. [Taxonomy browser \(*Monilinia laxa*\) \(nih.gov\)](#)

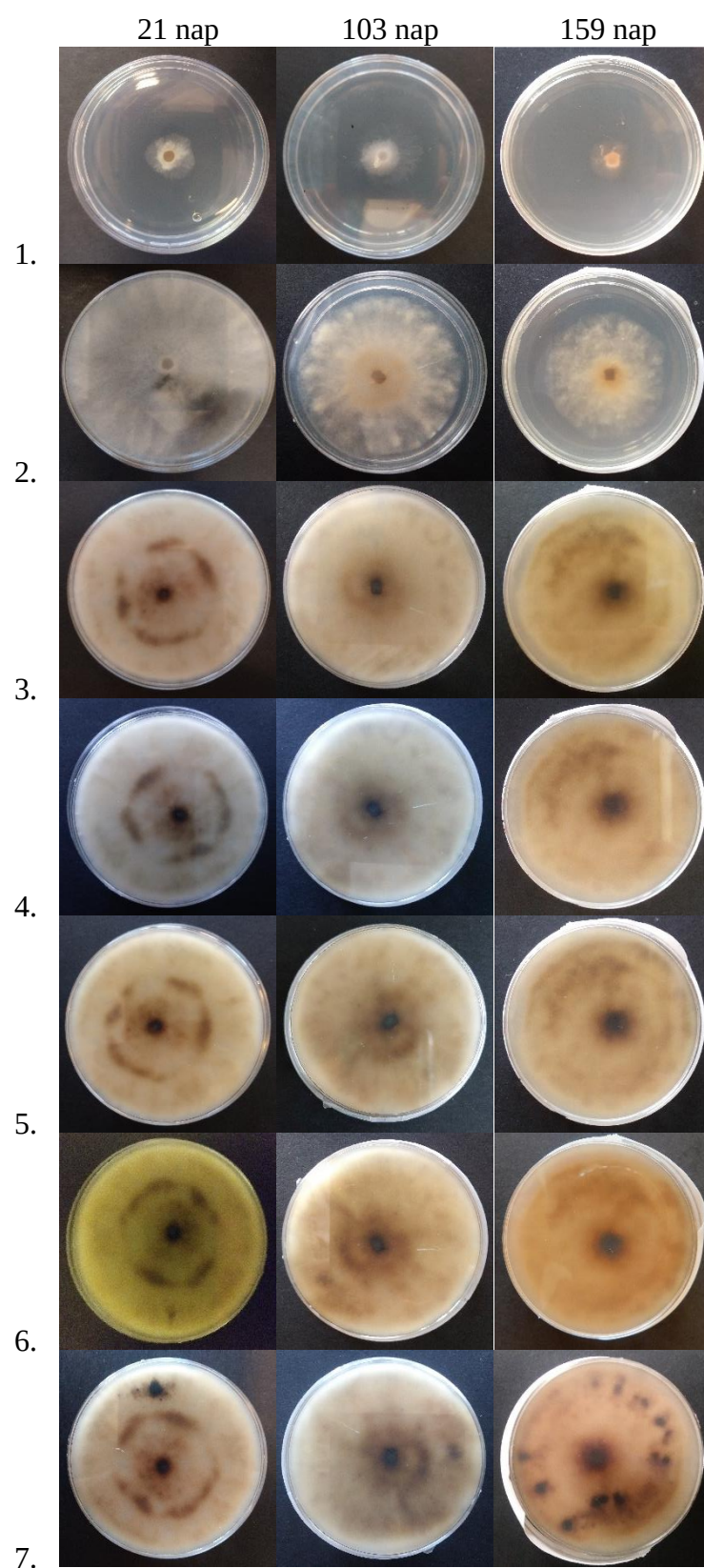
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek Kocsis Ivettnek, Dr. Petróczy Mariettának és Dr. Markó Gábornak, akik támogatása nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat. Hálával tartozom a kísérletben nyújtott segítségükért, mely a laboratóriumban gyakran éjszakákba nyúlt, a dolgozatban végzett javításokért, tanácsokért és a statisztikai elemzésben végzett munkáért.

10. MELLÉKLETEK



1. melléklet: A -70°C-on tárolt BC-1 izolátum fotói, tárolási időtartamonként oszlopokba rendezve, a sorok a mérési alkalmakat jelölik (Fotó: Juhász Dániel, 2022-2023)



2. melléklet: A -70°C-on tárolt MON-3 izolátum fotói, tárolási időtartamonként oszlopokba rendezve, a sorok a mérési alkalmakat jelölik (Fotó: Juhász Dániel, 2022-2023)