



**SZENT ISTVÁN EGYETEM  
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR  
NÖVÉNYVÉDELEMTANI TANSZÉK**

***A SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (Lib.) de Bary HAZAI ÉS EURÓPAI  
IZOLÁTUMAINAK VÁLTOZÉKONYSÁGA**

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Baloghné Zándoki Erika**

**Gödöllő**

**2007.**

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Növénytudományi Doktori Iskola  
**tudományága:** Növénytermesztési- és kertészeti tudomány  
**vezetője:** Dr. Virányi Ferenc  
egyetemi tanár, a MTA doktora  
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,  
Növényvédelemtani Tanszék  
**Témavezető:** Dr. Turóczy György  
egyetemi docens  
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Növényvédelemtani Tanszék

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI

A *Sclerotinia sclerotiorum* világszerte az egyik legelterjedtebb, polifág növénykórokozó, számos kétszikű növényt károsít.

Magyarországon a legnagyobb problémát a napraforgó- és a zöldségtermesztésben okozza. A gomba kitartóképletei, a szkleróciumok a talajban hosszú ideig életben maradnak. Mivel a fertőzés elsődleges forrásai ezek a rendkívül ellenálló képződmények, a vegyszeres védekezés gyakran megoldhatatlan. Problémát jelent továbbá, hogy a kórokozó a növényeket bármely fenofázisukban képes fertőzni. A kórokozóval szembeni rezisztencia-nemesítésben máig nem sikerült jelentős eredményeket elérni, bár egyes vad fajokkal végzett keresztezések eredményeztek kevésbé fogékony fajtákat. Napraforgóban a védekezést tovább nehezíti, hogy a szkleróciumok mérete, alakja és sűrűsége a magvakéhoz hasonló, sőt a kaszathéj alatt is képződhet szklerócium, így azokat a magok közül kiválasztani szinte lehetetlen.

Az egyetlen hatékony védekezés a fogékony növények vetésforgójában a 4-6 éves visszatérési idő betartása: ennyi idő alatt a talajmikrobák a szkleróciumok nagy részét elpusztítják. Az utóbbi néhány évben viszont jelentősen megnőtt a napraforgó (és a szklerotíniára szintén fogékony repce) vetésterülete, sok termelő már nem tudja tartani ezt a visszatérési időt.

Az utóbbi években zárt termesztő berendezésben a *Coniothyrium minitans* hiperparazita gomba alkalmazása a *S. sclerotiorum* ellen hatékony védekezési lehetőségnek ígérkezik.

Annak ellenére, hogy a kórokozó nagyon régóta ismert, világszerte elterjedt, jelentős károkat okoz, azonosítása pedig kifejezetten könnyűnek nevezhető, a szakirodalom alapos áttanulmányozása során kiderül, hogy több kérdés tisztázatlan vele kapcsolatban. Így például nem egyértelmű, hogy az egyes törzsek agresszivitása és egyéb tulajdonságai hogyan kapcsolódnak egymáshoz (illetve van-e egyáltalán összefüggés köztük). Nem vizsgálták még hazánkban az itt jelenlevő törzsek micéliális kompatibilitását (MCG=mycelial compatibility group), továbbá hazai és külföldi törzsek kapcsolatát. Hasonló a helyzet a vegetatív kompatibilitási csoportokat (VCG=vegetative compatibility group) illetően is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- izolátum-gyűjtemény létrehozása: a Szent István Egyetem Növényvédelemtani Tanszékén már meglévő gyűjtemény bővítése további, azonos és különböző táblákról származó izolátumokkal.

- az izolátumok morfológiai jellemzése: szkleróciumképzés jellegzetességei, szkleróciumok mérete, összömege, növekedési jellegzetességek vizsgálata

- a patogenezis során fontos szerepet játszó oxálsav termelésének vizsgálata

- a törzsek agresszivitásának vizsgálata szántóföldi körülmények között, mesterségesen inokulált napraforgó növényeken. Az agresszivitás összehasonlítása a különböző növényi részekben.

- annak vizsgálata, hogy az agresszivitás milyen más, *in vitro* körülmények között mérhető tulajdonsággal függ össze

- a törzsek micéliális kompatibilitási csoportba sorolása, az egyes MCG-k összetételének vizsgálata, valamint annak megállapítása, hogy egy MCG-n belül hasonló tulajdonságokkal rendelkező törzsek fordulnak-e elő

- a törzsek vegetatív kompatibilitási csoportokba sorolása, az egy VCG-be tartozó törzsek egyéb tulajdonságainak összehasonlítása

- a törzsek genetikai polimorfizmusának vizsgálata RAPD-módszerrel, s annak vizsgálata, hogy ez a módszer alkalmas-e az MCG-k, vagy a VCG-k elkülönítésére.

## 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 3.1. Tiszta tenyészetek előállítása, a felhasznált táptalaj

A szkleróciumokat felületi fertőtlenítés után (70%-os alkohol) antibiotikummal kiegészített paradicsomos táptalajra helyeztem (150g Arany Fácán paradicsompüré, 10 g glüklóz, 20 g agar, 100 ppm kloramfenikol, 1 liter csapvíz).

### 3.2. Telepnövekedés vizsgálata

A telepek növekedését 15 és 25 °C-os termosztátban, paradicsomos táptalajon mértem, izolátumonként három ismétlésben. Sötét termosztátban tároltam őket, és a telep legnagyobb és legkisebb sugarát mértem, a leoltást követő ötödik napon. Ezek átlagát véve, kiszámoltam a

gombatelepek területét, és egytényezős varianciaanalízissel megvizsgáltam, hogy van-e szignifikáns különbség az egyes izolátumok között.

Egy hét elteltével feljegyeztem, hogy melyik izolátum milyen mintázatban képezte a szkleróciúmainak.

### **3.3. Az össz-szkleróciúmtömeg mérése**

25 g perlittel kevert paradicsomsűrítményt tartalmazó Petri-csészékbe oltottam az izolátumokat (3 ismétlés/izolátum), majd a tenyészeteket 25 °C-on, sötét termosztátban inkubáltam 14 napig.

A szkleróciúmainkat Petri-csészénként külön-külön összegyűjtöttem, majd a termosztátban 25 °C-on további 10 napig szárítottam a szkleróciúmainkat.

A szkleróciúmaink össztömegét analitikai mérlegen mértem le, majd az adatok statisztikai értékelését egytényezős variancia-analízissel végeztem.

### **3.4. Az oxálsavtermelés vizsgálata**

Az oxálsav meghatározásához felhasznált anyag *S. sclerotiorum*-mal fertőzött sárgarépa volt. Izolátumonként 3 szelet répát fertőztem meg. A répákat Petri-csészékbe tettem, steril desztillált vízzel megpermeteztem és szobahőmérsékleten tároltam. A növények pH-ját a kísérlet előtt, és az azt követő 2., 4. és 6. napon azonos időpontban felületi pH mérővel megmértem. Egy hét múlva, mikor már a répa egészen jól látszottak a fertőzés tünetei, a fertőzési ponttól számított 2-2 cm-es részt kivágtam és -70 °C-ra lefagyasztottam.

Az oxálsav tartalom meghatározásához 10 g fagyasztott mintát finomra dörzsöltem, majd 30 ml 0,1 M-os sósavval extraháltam, 30 percig rázógépen rázatva. Az elegyet 20 percig centrifugáltam (5000 rpm-en). A felülúszó leöntése után 0,1 M-os ammónium-hidroxiddal semlegesítettem, hozzáadtam 10 ml 0,1 M-os ecetsav oldatot, és mágneses keverővel jól összekevertem. Ezután hozzáadtam 10 ml kalcium-klorid oldatot (80 g CaCl<sub>2</sub> / 100 ml víz), és alapos összerázás után 30 percig pihentettem. Lecentrifugáltam (20 perc, 5000 rpm), a képződött csapadékot 10 ml 0,1 M-os ecetsavval mostam (az oxálsav ugyanis nem oldódik ecetsavban), majd exszikátorban vákuum alatt megszárazítottam és lemértem.

Az egyes izolátumok által termelt oxálsavmennyiséget egytényezős varianciaanalízissel hasonlítottam össze.

### **3.5. Az agresszivitás meghatározása**

Az agresszivitást szabadföldi kísérletben fogékony napraforgóhibrid (Zoltán) növényeken vizsgáltam virágzás idején. Mindegyik törzssel 5 – 5 növény szártövet, és 5 – 5 növény szárközepét fertőztem meg. A fertőzéshez 0,5 cm-es micélium korongokat használtam. A növényeken sebzést ejtettem, erre helyeztem a micélium korongot, melyet aztán szárközép fertőzés esetén nedves vattadarabbal és fóliával letakartam. Szártőfertőzéskor közvetlenül a talaj felett végeztem a sebzést és fertőztem a szártövet, majd földdel betakartam és megöntöztem. Öt nap elteltével értékeltem a növények fertőzöttségét. A nekrotizálódott rész hosszúságát mérve hasonlítottam össze a törzsek agresszivitását. Az adatokat egytényezős varianciaanalízissel dolgoztam fel.

A növekedési sebesség, a szkleróciumképzés, és az oxálsavtermelés adatainak ismeretében korrelációt számítottam ezen adatok illetve a szántóföldön tapasztalt agresszivitás között.

### **3.6. A micéliális kompatibilitás vizsgálata**

A micéliális kompatibilitás vizsgálatához Kohn és munkatársainak módszerét alkalmaztam: paradicsomos táptalajra egymással szemben leoltottam két törzset.

Ha a két telep egybe tudott nőni úgy, hogy határuk nem látszott, akkor a kapcsolat kompatibilis, és a két törzs azonos micéliális kompatibilitási csoportba (MCG) tartozik. Ha a két törzs között, a találkozási zónában a hifák egy része elhalt, és így határvonal képződött a törzsek között, akkor a két törzs inkompatibilis.

A leoltásokat a törzsek minden lehetséges kombinációjában elvégeztem.

Megvizsgáltam, hogy az egy MCG-be tartozó törzsek hasonlóak-e a többi tulajdonságaikban is, továbbá, hogy a vegetatív és micéliális kompatibilitási csoportok hogyan viszonyulnak egymáshoz

### **3.7. A vegetatív kompatibilitás vizsgálata**

A vegetatív kompatibilitás vizsgálatát fungicid rezisztens mutáns vonalakkal végeztem. Mindegyik törzsből három, különböző hatóanyaggal (benomil, procimidon, tebukonazol) szemben rezisztens vonalat próbáltam előállítani.

A mérgezett táptalajt antibiotikummal kiegészített paradicsomos táptalajból állítottam elő: a sterilizálás után kihűlt, de még kézmeleg és folyékony táptalajba pipettáztam és elkevertem a törzsoldatokból annyit, hogy a táptalajban a fungicid hatóanyag végkoncentrációja a táptalajban 5 ppm lett. Ezekre oltottam az izolátumokat. A növekvő, rezisztens szektorokat

kivágtam a táptalajból és továbboltottam újabb mérgezett táptalajra, melyek a fungicidet egyre nagyobb koncentrációban tartalmazták. A végső koncentráció procimidon esetében 15, tebukonazol esetében 40 ppm volt. Benomil-rezisztens vonalat nem sikerült találni.

A kompatibilitási viszonyok megállapításához normál, nem mérgezett paradicsomos táptalajra két, különböző törzsből származó, eltérő fungiciddel szemben rezisztens vonalat oltottam le egymással szemben. Amikor két telep növekedni kezdett, abból a zónából, ahol hifáik találkoztak, micéliumkorongot vágtam ki. Ezt átoltottam kétszeresen mérgezett táptalajra, amely 10 ppm procimidont és 40 ppm tebukonazolt tartalmazott. A kísérletet 1 hét múlva értékeltem. Ha a kétszeresen mérgezett táptalajon növekedést tapasztaltam, akkor a két törzs, amelyekből a rezisztens vonalak származtak, egy vegetatív kompatibilitási csoportba tartozott, és minden bizonnyal heterokarion képződött, hiszen a kétszeresen mérgezett táptalajon csak olyan micélium növekedhet, amely mindkét hatóanyaggal szembeni rezisztenciát tartalmazza. Itt pedig egyik hatóanyaggal szembeni rezisztencia az egyik-, a másikkal szembeni a másik törzsből származott. A kísérletet a törzsek minden lehetséges kombinációjában elvégeztem. Ha a táptalajon nem történt növekedés, akkor biztos, hogy nem képződött heterokarion, és a törzsek különböző VCG-be tartoznak. Az eredmények alapján meghatároztam a vegetatív kompatibilitási csoportokat, és megvizsgáltam, hogy az egy csoportba tartozó törzsek különböznek-e a már előbb vizsgált paraméterekben.

### **3.8. A törzsek RAPD mintázatának vizsgálata**

A RAPD-vizsgálathoz úgy választottam ki a törzseket, hogy a vizsgált csoport tartalmazzon azonos, illetve különböző VCG-be és MCG-be tartozó törzseket is.

A táptalajra helyezett szitaszöveten képzett micéliumot 8 nap után szikével lekapartam és  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztva tároltam, majd folyékony nitrogénben porítottam. A DNS-kivonás Fermentase – Genomic DNA Purification Kit segítségével történt, a terméken szereplő eljárás szerint. A DNS-koncentráció megállapítása spektrofotométerrel történt, a mért adatok alapján a koncentrációt végül  $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ -re állítottam be.

Kísérletemben az alábbi primerek szerepeltek:

OPK12 (TGGCCCTCAC), OPK17 (CCCAGCTGTG), OPK18 (CCTAGTCGAG), OPG8 (TCACGTCCAC), OPG9 (CTGACGTCAC), OPG11 (TGCCCGTCGT), OPG13 (CTCTCCGCCA), OPG14 (GGATGAGACC), OPG18 (GGCTCATGTG), OPG19 (GTCAGGGCAA), OPE15 (CAGAAGCGGA), OPW4 (ACGCACAACC).

Az következő primerek párosával szerepeltek 1-1 reakcióban, az alábbi párosításban: OPC01 (TTCGAGCCAG) – OPC02(GTGAGGCGT), OPC15 (GACGGATCAG) – OPC16

(CACACTCCAG), OPL02 (TGGGCGTCAA) – OPL15 (AAGAGAGGGG). (Ezt az indokolta, hogy Sun et al (2005) kísérleteiben az ezekkel végzett reakciók nagymértékű polimorfizmust mutattak.)

A PC-elegy összetétele: 1 µl, 50 ng / µl templát DNS, 2,5 µl 10X standard puffer (Fermentas), 15,5 µl PCR víz, 1,5 µl 25 mM-os MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 2 µl 2,5 mM dNTP (Fermentas), 1 µl 5 ng / µl RAPD primer (Sigma), 1,5 µl 1U / µl T.aq. polimeráz (Fermentas).

A RAPD ciklusok: 3 min 94 °C, 30 sec 94 °C, 1 min 36 °C, 2 min 72 °C, 10 min 72 °C. A termékeket lehűtöttem, majd 1%-os agaróz gélen 10 µl terméket futtattam 50 V feszültség alatt. Az elektroforézis addig tartott, amíg a festék ki nem futott a gélből. A DNS-t 1% etídium-bromiddal festettem meg 10 percig, majd UV-transzluminátor alatt fényképeztem.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Telepnövekedés vizsgálata

A 25 °C-on inkubált tenyészetek gyorsabban növekedtek, mint azok, amelyek 15 °C-on fejlődtek. Egy-egy izolátum növekedése a különböző ismétlések esetén nagyon hasonló volt, alacsony szórásértékek fordultak elő. A telepek sugarának lemérése után a telepek területét kiszámítva, az izolátumok növekedési sebessége nem volt egyforma. Egyes izolátumok esetében az ötödik napon a 25 °C-os termosztátban a telepek területe már meghaladta a 200 cm<sup>2</sup>-t, míg egy részük lassan növekedett, szemmel látható növekedés egyes törzsek esetében csak a második nap végén mutatkozott.

Mind 15, mind 25 °C-on nagy volt a variabilitás a telepek mérete között, 15 °C hőmérséklet esetén akadtak olyan izolátumok, amelyek az összes többitől szignifikánsan különböztek.

A 15 és 25 °C-on tapasztalt növekedés egymással szoros összefüggést mutatott, a két tényező közötti korrelációs együttható (r) 0,908 volt, ami igen szoros összefüggésnek tekinthető.

Mivel az optimális és szuboptimális hőmérsékleten való micéliumnövekedés nagyon szoros összefüggést mutatott, ez arra utal, hogy a jó körülmények között „életrevalóbb” gombák kedvezőtlen körülmények esetén is jobban el tudnak terjedni a micélium növekedésével. Egyes kutatók összefüggést véltek felfedezni a növekedési erély és az agresszivitás között, így munkám során én is érdekesnek tartottam megvizsgálni, hogy találok-e összefüggést a mesterséges tenyészetben mutatott növekedés és az agresszivitás között, s ha igen, milyen szoros ez a kapcsolat. Ha a nagy növekedési erély valóban fokozott agresszivitással jár együtt, az ilyen törzsek különösen veszélyesek lehetnek.



#### ***4.2. Az össz-szkleróciomtömeg mérése***

A tápközegben két hét alatt minden izolátum képzett szkleróciomot. A szkleróciomok mind a perlitréteg tetején, mind a perlitszemcsék közé ékelődve megtalálhatóak voltak. Nagy különbségek voltak a izolátumok által képzett szkleróciomok mennyiségében (ami nem elsősorban darabszámra értendő, mert egyesek sok, apró méretű szkleróciomot képeztek), s ezt a variancia analízis is igazolta. Az egyes ismétlések esetén a szórásértékek alacsonyak voltak.

A telepek növekedési sebességét és az itt kapott eredményeket összevetve látszott, hogy a lassabban növekvő törzsek a szkleróciomok össztömegében is elmaradtak a gyorsan növekvő törzsektől, a két adatsor között számított korrelációs együttható (r) értéke 0,748 volt, ami közepesen szoros összefüggést igazol.

#### ***4.3. A pH változása sárgarépa-szeleteken***

A pH mérés során a különböző törzsekkel fertőzött sárgarépa pH-ja szignifikáns mértékben csökkent a kontrollhoz képest, már a fertőzést követő második napra. A pH változás nem egyenletes ütemben zajlott, a fertőzés kezdetén egy gyors csökkenés volt megfigyelhető. A kezdeti gyors csökkenés után a következő méréskor kisebb, kiegyenlítettebb lett a változás, majd legtöbb esetben a negyedik és a hatodik nap között a változás ismét gyorsult. Ez azzal magyarázható, hogy a fertőzés elején a sejtfalbontó enzimek, és az oxálsav nagymértékben termelődnek, és a sejtfalalkotók roncsolásakor keletkező bomlástermékek, valamint magának az oxálsavnak a hatására a fertőzés kezdetén erős pH csökkenés következik be. A sejtek roncsolásakor felhalmozódó termékek visszacsatolási folyamatot indítanak be, így aztán az enzimek és az oxálsav termelődése csökken.

A különböző törzsek által fertőzött növényeken a pH-csökkenés (a fertőzés előtt mért pH és a kísérlet befejezésekor mért pH közötti különbség) sok esetben szignifikánsan különbözött egymástól, míg az ugyanazon törzsekkel végzett ismétlések esetében az eredmények nagyon közel estek egymáshoz.

#### ***4.4. Oxálsavtermelés sárgarépa szeletekben***

Mindegyik törzs esetén kinyerhető volt a bizonyos mennyiségű oxálsav a fertőzött sárgarépából.

A legtöbb oxálsavat termelő törzsek az összes többinél szignifikánsan több oxálsavat termeltek. A legkevesebb oxálsavat termelő törzs esetén is majdnem négyszer annyi oxálsavat

vontam ki a szövetből, mint a kontroll, egészséges sárgarépa esetén (amely szintén tartalmazott némi oxálsavat, ám mindössze 1,167 mg-ot). Az eredmények a három ismétlés során azonosak voltak, azaz egy-egy törzs eredményei nem mutattak nagy varianciát.

A törzsek közül 23 termelt több mint 50 mg/10 g növényi szövet oxálsavat, 16 törzs termelt 40-50 mg közötti mennyiségű oxálsavat, és a fennmaradó 12 törzs 40 mg alatt termelt.

A kontrollhoz képest a fertőzött növényekben nagy mennyiségben jelenlevő oxálsav jelentősen hozzájárult a fertőzött növényeken tapasztalt pH-csökkenéshez. Ezt a két tényező közötti erős lineáris kapcsolat is bizonyítja (korrelációs együttható: 0,904). Alátámasztja ezt az is, hogy a *S. sclerotiorum* törzsek az oxálsav-termelés maximumát a fertőzés utáni 3-5 napon belül érik el, melyet az általam észlelt pH-csökkenés üteme is jelez. Az *in vitro* körülmények között fertőzött répaszeleteken előidézett pH-csökkenés tehát eredményeim szerint megfelelő indikátora lehet az oxálsavtermelésnek.

A törzsek egy részénél a pH-csökkenés már a fertőzést követő második napon a savas poligalakturonázok optimumának megfelelő kémhatást (pH3,6 körül) hozott létre. A termelt oxálsav mennyisége egyik korábban vizsgált tulajdonsággal (növekedési erély, szkleróciummennyiség) sem mutatott összefüggést.

#### **4.5. A szártőfertőzések eredményei**

Az értékelés időpontjára szinte mindegyik törzs megfertőzte a napraforgók szártövet. A betegség tünetek a talajszintről indultak, a vizenyős, majd barnuló folt körülölelte a szártövet és terjedt felfelé, s közben a növények a szklerotíniás szártőfertőzés egyik jellemző tünetét mutatva, hervadni kezdtek. A növények nem egyszerre hervadtak, ugyanis a betegség terjedése a fertőzött növényeken törzsenként eltérő ütemben zajlott, az azonos törzssel fertőzött növények között azonban kis különbségek mutatkoztak. A kontroll növények egészségesek maradtak.

#### **4.6. A szárközépfertőzések eredményei**

A szárközépfertőzések esetén megjelenő a vizenyős, majd világosbarna foltok azonos kinézetűek a szártőfertőzésnél láthatóakkal. Kísérletem során minden törzs fertőzést idézett elő. A szárközépfertőzéskor minden törzs esetében nagyobbak voltak a foltok a gazdanövényen, mint a szártőfertőzés alkalmával. Az egyes törzsek között nagy különbségek voltak. Voltak nagyon agresszív törzsek, amelyek 10-15 cm-nél is nagyobb elhalásos foltokat okoztak az értékelés kezdetére, a kevésbé agresszív törzsek ezen idő alatt mindössze 20-40 mm-es foltokat idéztek elő.

Mind a szárközép, mind a szártőfertőzések esetében jelentős különbségek voltak a törzsek agresszivitásában. Ez az eredmény összhangban áll más szerzők által már korábban közölt eredményekkel, vagyis hogy az egyes törzsek agresszivitása rendkívül eltérő. A kétféle fertőzést összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy a törzsek agresszivitása a két növényi részen hasonlóan alakult: azok a törzsek, amelyek a szártövön gyengébb agresszivitást mutattak, a szárközépen is kisebb nektrózist okoztak, míg a fokozottan agresszív törzsek szintén mindkét esetben nagyobb mértékű foltokat eredményeztek. A korrelációs együttható értéke 0,892.

Az eredményeim szerint tehát a törzsek egymáshoz viszonyított agresszivitása nem az adott növényi résztől függ.

#### ***4.7. Az agresszivitás és egyéb tulajdonságok összefüggése***

Eredményeim szerint az agresszivitás nem mutatott összefüggést a sem a telepátmérővel, sem a törzsek által képzett szkleróciumok tömegével. Eredményeim alapján tehát a labor-körülmények között tapasztalt növekedési erély nem feltétlenül párosul fokozott agresszivitással, jóllehet a táptalajon gyorsabban növekvő törzsek valószínűleg jobban hasznosítják a tápanyagokat, a táptalajból a tápanyagokat „csak fel kell venni”. Hasonló helyzet kialakulhat a talajban is, amikor a kórokozó az ott található, már elhalt szerves anyagokon marad fenn és növekedik. Egészen más a helyzet egy élő növény esetén, amikor a tápanyagot „meg kell szerezni”. Ehhez azonban le kell győzni a növény védekező rendszerét, és a sejtfalat szét kell roncsolni, hogy a tápanyagok hozzáférhetőek legyenek. A nagyobb agresszivitással rendelkező törzsek esetében ez folyamat hatékonyabban működik. Ezt támasztotta alá az oxálsavtermelés és az agresszivitás korrelációjának vizsgálata: a két tényező között szoros lineáris összefüggést tapasztaltam. A korrelációanalízis elvégzésekor a szárközépen mért nektrózisok hossza és a fertőzött sárgarépából kivont oxálsav mennyisége között 0,924, a szártövön mért nektrózisok hossza és a termelt oxálsav között 0,898 volt a korrelációs együttható. Mindkét érték erős pozitív összefüggést jelez.

#### ***4.8. A micéliális kompatibilitás vizsgálata***

A micéliális kompatibilitás vizsgálata során 15 olyan micéliális kompatibilitási csoportot azonosítottam, amelybe egynél több törzs tartozott. A törzsek között a kapcsolat jellege egyértelműen eldönthető volt, az inkompatibilis „párosítások” esetében a két telep között a micélium jól láthatóan kiritkult, a kompatibilis törzsek telepei pedig teljesen egymásba nőttek.

A legnagyobb kompatibilitási csoport 7 törzsből állt, a csoportok nagyrésze pedig 2–3 törzsből állt. Tizenhárom törzs nem volt kompatibilis egyik törzssel sem, ezek egyenként képviseltek egy-egy MCG-t. Így a vizsgált törzsek összesen 28 micéliális kompatibilitási csoportot képviseltek.

A micéliális kompatibilitási csoportok nem egyértelműen különültek el egymástól, egyes csoportok között átfedések voltak. Ezek az eredmények több, ismételt leoltás után is ugyanígy alakultak. Bár ez a helyzet a törzsek kis részénél fordult csak elő, mégis azt jelzi, hogy a micéliális kompatibilitást valószínűleg több faktor határozza meg, amelyek nem mindegyike szükséges, hogy megegyezzen kompatibilis kapcsolat esetén. Így lehetséges az, hogy egy törzs több MCG-be is beletartozik.

A kunmadarasi törzsek jól elkülönülő kompatibilitási csoportokat alkottak, egy törzs sem volt közülük kompatibilis valamely más helyről származó törzssel. A gödöllői törzsek szintén alkottak két olyan MCG-t, amelybe csak azonos helyről származó törzsek tartoztak. Ám a csoportok nagy része különböző területekről származó törzsekből állt, 4 csoport esetében eltérő országokban izolált törzsek tartoztak azonos MCG-be. Az MCG-k tehát nem lokalizáltak egy-egy termőhelyre, hanem egymástól igen messze is akadnak kompatibilis törzsek. Voltak azonban olyan MCG-k is, amelyek csak egy-egy termőhelyen, 1-1 törzs által képviseltettek. Az azonos MCG-be tartozó törzsek a többi vizsgált tulajdonságot tekintve nem voltak egységesek: szignifikáns különbségek voltak egy-egy MCG-n belül a törzsek növekedési erélyében, a képzett szkleróciumok tömegében, az oxálsav-termelésben és az agresszivitásban is. A micéliális kompatibilitás tehát a vizsgált tulajdonságok közül eredményeim szerint egyiket sem befolyásolja.

#### ***4.9. A vegetatív kompatibilitás vizsgálata***

A fungicid-rezisztens vonalak előállítása során a procimidon és a tebukonazol hatóanyaggal szemben rezisztens törzseket néhány hét alatt sikerült előállítanom. Benomil hatóanyaggal szemben rezisztens törzseket nem sikerült előállítani. Miután a két, különböző hatóanyaggal szemben rezisztens vonal micéliumának találkozási zónájából kivágott, micéliumot tartalmazó agarkorongot kétszeresen mérgezett táptalajra oltottam át, néhány nap elteltével számos esetben micélium-növekedést tapasztaltam. Ez azt bizonyítja, hogy a törzsek, amelyekből a rezisztens vonalak származtak, vegetatívan kompatibilisek voltak, a növekedni képes micélium ugyanis biztosan heterokarion volt, mivel rendelkezett az egyik vonalból származó procimidon-, és a másik vonalból származó tebukonazol-rezisztenciáért felelős faktorral is. Az inkompatibilis törzsek esetében a két törzs találkozási pontjából kivett micélium nem

növekedett procimidont és tebukonazolt egyaránt tartalmazó táptalajon. Az azonos törzsből származó két vonal párba állításakor mindegyik esetben kompatibilitást tapasztaltam.

A páronkénti leoltások eredményeinek összesítése – mivel munkám során a törzsek közötti kompatibilitást minden lehetséges kombinációban megvizsgáltam – azt mutatta, hogy ha két kompatibilis törzs közül az egyik kompatibilitást mutatott egy harmadik törzssel, akkor a másik törzs is kompatibilis volt ezzel a harmadik törzssel szemben. Ilyen módon egyértelműen meghatározhatók a vegetatív kompatibilitási csoportok, melyeken belül az összes törzs kompatibilis egymással, azonban egy csoporton kívüli törzssel egyikük sem kompatibilis.

A heterokarion törzsekből izolált hifacsúcsok is növekedtek a kétszeresen mérgezett táptalajon, s normál (nem mérgezett) táptalajon való tenyésztés során is megtartották rezisztenciájukat.

Hat olyan vegetatív kompatibilitási csoportot azonosítottam, amelybe egynél több törzs tartozott. A legnagyobb csoport 13 törzset, azaz a törzsek egynegyedét A törzsek éppen kétharmada beletartozott valamelyik többtagú kompatibilitási csoportba. A törzsek egyharmada, azaz 17 törzs viszont nem volt kompatibilis egyetlen másik törzssel sem, így ezek mind egy-egy külön kompatibilitási csoportot képviseltek. Két kompatibilitási csoport különböző helyről izolált törzseket tartalmazott, eltérő országokból származó törzsek is megtalálhatóak benne. Az egyes kompatibilitási csoportok tehát széleskörűen elterjedtek, egymástól messze levő területeken is jelen vannak azonos VCG-be tartozó törzsek. Ez természetesen a heterokarion-képzés szempontjából teljesen semleges tényező, hiszen ahhoz, hogy a hifa-anasztomózis, és ennek során a sejtmag, és citoplazmatikus elemek vándorlása megtörténjen, arra van szükség, hogy az azonos VCG-be tartozó törzsek azonos helyen, egy időben legyenek jelen.

Sok olyan törzs volt, amelyik nem tartozott a csoportok egyikébe sem. Így egyes *Fusarium* fajokkal ellentétben itt nem kettő vagy néhány, hanem hasonlóan pl. a *Gibberella zeae* és *Botryotinia fuckeliana* fajokhoz, melyeknél az inkompatibilis kapcsolatok gyakorisága alapján nagyszámú VCG létezését valószínűsítik, a *S. sclerotiorum*-nál is sok kompatibilitási csoport létezik.

A törzsek azonos VCG-n belül is nagyon heterogének voltak. A mesterséges tenyésztésben vizsgált tulajdonságokban, és a szabadföldi kísérlet során tapasztalt agresszivitásban is szignifikáns különbségek voltak az azonos VCG-be tartozó törzsek között. Más gombafajok esetében ismert, hogy a VCG-k és az agresszivitás illetve patogenitásbeli tulajdonságok szorosan összefüggenek, ám ez a *S. sclerotiorum* esetében nem volt igazolható.

A sok VCG miatt annak ellenére, hogy ennél a kórokozónál is azonosítottak már hipovirulens törzseket, egyelőre nem látszik reálisnak az ezekre alapozott biológiai védekezés, hiszen a hipovirulenciáért felelős faktor átadásához is kompatibilis kapcsolat szükséges.

#### ***4.10. Sclerotinia sclerotiorum törzsek RAPD mintázatának összehasonlítása***

A munkám során felhasznált primerek esetében a kiválasztott törzsekkel elvégzett RAPD-vizsgálat nem eredményezte a más szerzők által leírtak alapján várt polimorfizmust.

Az egyenként felhasznált primerek (OPG08, OPK17, OPK18, OPG09, OPG11, OPG13, OPE15, OPG18, OPG19, OPG14, OPW04, OPK12) közül hatnál (OPG08, OPK17, OPK18, OPG09, OPG11, OPG13) nem sikerült polimorfizmust kimutatni, mindegyik törzs azonos mintázatot adott. A további 6 primer közül kettő (OPW04, OPK12) kizárólag az egy törzs különbözőségét jelezte, a többi törzs egyforma mintázatot mutatott. Négy primer (OPE15, OPG18, OPG19, OPG14) esetében sikerült polimorfizmust kimutatni a törzsek között, s ez esetekben a polimorfizmus összefüggött a kompatibilitási csoportokkal.

Megállapítottam, hogy az azonos VCG-be, illetve azonos MCG-be tartozó törzsek esetében mindig egyforma termékek képződtek, azaz egy kompatibilitási csoporton belül nem volt kimutatható polimorfizmus a csoportokon belül.

Az a három RAPD-reakció, melyben az OPC01-OPC02, OPC15-OPC16 illetve OPL02-OPL15 primereket páronként használtam, messze nem eredményezte az általam várt variabilitást: az OPC15-OPC16 primerkombináció esetén egyáltalán nem mutattak polimorfizmust, s a másik két reakció során is csak egyetlen törzs mutatott a többitől eltérő mintázatot.

Annak ellenére tehát, hogy az általam vizsgált törzsek is egymástól távoli helyekről (főként a VCG1 elemei) és eltérő gazdanövényekről származtak, továbbá az összes vizsgált tulajdonságban (telepnövekedés, szkleróciumképzés, oxálsavtermelés, agresszivitás) gyakran szignifikánsan különböztek egymástól, ezeknek a primereknek az alkalmazásakor nem mutattak értékelhető polimorfizmust. Az SCL törzsről – amely több esetben is az egyetlen olyan törzs volt, amely mintázata alapján a többitől eltért – érdemes megjegyezni, hogy ez a törzs minden mért tulajdonságában szignifikánsan különbözött a többitől. Rendkívül alacsony növekedési erélye volt, kevés és kisméretű szkleróciumokat képzett, az oxálsav termelése alacsony volt, és a kevésbé agresszív törzsek közé tartozott.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Munkám során az alábbi új tudományos eredményeket fogalmaztam meg:

1. Eredményeim szerint a *Sclerotinia sclerotiorum* törzsek növekedési erélye és a képzett szkleróciumok tömege nem függ össze az adott törzs agresszivitásával.
2. Megállapítottam, hogy a törzsek által az *in vitro* fertőzött növényi szövetekben mért pH csökkenés erős összefüggést mutat az adott törzs által termelt oxálsav mennyiségével. Mivel az oxálsavtermelő képesség szoros pozitív korrelációban van az agresszivitással, az *in vitro* fertőzött szövetekben előidézett pH csökkenés jó indikátora a szántóföldön tapasztalt agresszivitásnak.
3. Nem tapasztaltam különbséget az egyes törzsek szártövön és szárközépen agresszivitása között, ami azt jelentette, hogy – bár legtöbb törzs esetében a szártövön mért nektrózisok jóval nagyobbak voltak, mint a szárközépen találhatóak – ha egy törzs a szártövön fokozott agresszivitást mutatott, akkor biztos, hogy a szárközépen mért nektrózishossz alapján is a fokozottan agresszív törzsek közé tartozott. (S fordítva is: ha az egyik növényi részen alacsony agresszivitást tapasztaltam, akkor a másik növényi részen is kevésbé volt agresszív.)
4. Elsőként vizsgáltam Magyarországról származó törzsek vegetatív, illetve micéliális kompatibilitását. Megállapítottam, hogy hazánkban is sok MCG és VCG fordul elő. Sok VCG és MCG csak 1-1 törzs által képviseltette magát. Egyes MCG-k és VCG-k azonban a többihez képest sok tagot számlálnak, az országban több helyen is jelen vannak, illetve voltak olyan magyar törzsek is, amelyek külföldről származó törzsekkel is azonos kompatibilitási csoportba tartoztak, tehát egyes, széles körben elterjedt VCG-k jelen vannak Magyarországon is.
5. A kompatibilitási csoportok és egyéb vizsgált tulajdonságok (telepnövekedés, szkleróciumok mennyisége, oxálsavtermelés, agresszivitás) között nem mutatható ki összefüggés.
6. Az általam használt primerekkel végzett RAPD vizsgálat nem eredményezte a várt polimorfizmust, így ezek a primerek nem alkalmasak a VCG-k és az MCG-k meghatározására. A vegetatív kompatibilitási csoportokon és a micéliális kompatibilitási csoportokon belül a törzsek RAPD mintázata azonos.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A *S. sclerotiorum* izolátumok növekedési sebességének vizsgálata során, az optimális hőmérsékleten gyorsabb növekedést mutató izolátumok jobban tolerálták alacsonyabb hőmérsékletet is, azaz az in vitro kísérlet során szuboptimális körülmények között is életre valóbbnak bizonyultak. A táptalajon (ahol a tápanyagokat csak fel kell venni, nem szükséges hozzá a növény természetes védelmi rendszerének leküzdése) tapasztalt növekedési erély azonban nem függött össze az adott izolátum szántóföldi körülmények között, napraforgó növényen mutatott agresszivitásával. Mivel a két tulajdonság nem mutatott összefüggést, így nem kell attól tartani, hogy a talajban/talajon található szerves maradványokat jobban hasznosító, a rosszabb feltételeket jobban toleráló nagy agresszivitású törzsek jobban elterjednek egy-egy adott táblán.

Az agresszivitás a vizsgált tulajdonságok közül egyedül a termelt oxálsav mennyiségével mutatott erős pozitív összefüggést, azaz a több oxálsavat termelő törzsek – mivel az oxálsav a pH csökkentésével stresszt jelent a sejtek számára, továbbá optimális pH-t teremt a sejtfalbontó enzimek működéséhez, illetve a sejtfalban levő  $\text{Ca}^{2+}$  -ionokkal kelátot képezve gyengíti a sejtfal stabilitását – hatékonyabban győzik le a növény védelmi rendszerét, nagyban elősegítve ezzel a fertőzési folyamatot.

Mivel az oxálsav felelős a savas pH-t kedvelő poligalakturonáz enzimek számára megfelelő pH létrehozásáért, az adott izolátum által in vitro fertőzött sárgarépaszövetben előidézett pH-csökkenés szoros korrelációt mutat az adott izolátum oxálsav-termelésével, illetve hatékonyan becsülhető vele akár az izolátum szántóföldi agresszivitása is.

Eredményeim azt jelzik, hogy egyes gombafajokkal (pl. a *F. oxysporum* egyes *forma specialisai*) ellentétben a *S. sclerotiorum*-nál nem kettő vagy néhány vegetatív kompatibilitási csoport létezik, hanem a VCG-k száma nagy, és kísérleteim során azt tapasztaltam, hogy hazánkban is számos VCG van jelen, akár egyazon területen is. Emiatt, bár – pl. a *Cryphonectria parasitica*-hoz és *Ophiostoma*-fajokhoz hasonlóan – a *S. sclerotiorum*-nál is találtak már hipovirulens törzseket, az ezekre alapozott védekezés egyelőre nem tűnik reálisnak, hiszen a hipovirulenciáért felelős faktor (dsRNS) átadása általában csak azonos VCG-be tartozó izolátumok között működik hatékonyan.



A VCG-k között voltak olyanok, amelyek számos törzset foglaltak magukba, melyek közt voltak azonos és különböző helyekről származóak is. Az azonos helyen, azonos időben jelen levő izolátumoknak lehetőségük van természetes körülmények között is heterokarionokat létrehozni. Mivel azonos VCG-n belül is nagy variabilitást tapasztaltam az izolátumok minden egyéb tulajdonságát (növekedési erély, oxálsavtermelés, agresszivitás) illetően, érdemesnek találnám tovább vizsgálni azt, hogy az ilyen izolátumok által képzett heterokarionok ezen tulajdonságai hogyan alakulnak.

A RAPD vizsgálat – legalábbis az általam használt primerek alapján – nem bizonyult alkalmas módszernek a kompatibilitási csoportok elkülönítésére, így esetleg más módszer kipróbálását (a szakirodalom az RFLP-t és a DNS-ujjlenyomatot említi) tartom elképzelhetőnek.

**A SZERZŐNEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN  
EDDIG MEGJELENT KÖZLEMÉNYEI**

**Tudományos folyóiratcikk:**

**IF-os angol nyelvű**

Zándoki, E., Szódi, Sz., Turóczy, Gy. (2005): Mycelial compatibility of *Sclerotinia sclerotiorum* strains of different area. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 40(3-4), 295-301.

Zándoki, E., Szódi, Sz., Turóczy, Gy. (2005): Vegetative compatibility os *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary strains isolated in Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 40(3-4), 289-294.

**lektorált angol nyelvű**

Zándoki, E., Szódi, Sz., Turóczy, Gy. (2006): Mycelial compatibility, aggressiveness and cultural characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acta Agronomica Óváriensis* 48(1), 31-39.

**lektorált magyar nyelvű**

Zándoki E., Turóczy Gy. (2004): *Sclerotinia sclerotiorum* törzsek eltérő agresszivitása napraforgón. *Növényvédelem* 40(2), 67-70.

**egyéb értékelhető cikk**

Zándoki E., Turóczy Gy. (2002): Régi és új kérdések a fehérpenész (*Sclerotinia sclerotiorum*) elleni védekezésben. *Olaj, szappan, kozmetika* 51(4), 133-136

**Konferencia kiadvány (proceeding):**

**magyar nyelvű**

Zándoki E., Turóczy Gy, Szódi Sz. (2003): *Sclerotinia sclerotiorum* törzsek vegetatív kompatibilitásának vizsgálata. II. Erdei Ferenc Tudományos Konferencia, Kecskemét 2003. aug. 28-29. I. kötet, 423-427. old.

## **Előadás összefoglalás, poszter:**

### **idegen nyelvű**

Turóczi Gy, Zándoki E., Virányi F. (2001): Vergleich europäischer Isolate von *Sclerotinia sclerotiorum*. 3. Symposium Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau. Wien, 2001. September 17-20. (összefoglaló) 74-75. old.

Zándoki E., Turóczi Gy., Virányi F. (2003): Mycelial compatibility grouping of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different origin. 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, 2-7 February, 2003, Christchurch, New Zealand. (poszter)

### **magyar nyelvű**

Zándoki E., Turóczi Gy., Virányi F. (2001): *Sclerotinia sclerotiorum* – az ismeretlen ismerős. 47. Növényvédelmi Tudományos Napok, MTA, Budapest (összefoglaló)

Zándoki E., Turóczi Gy. (2002): Egy termőhelyről származó *Sclerotinia sclerotiorum* törzsek változékonysága. 48. Növényvédelmi Tudományos Napok, MTA, Budapest (összefoglaló) 103. old.

Zándoki E., Turóczi Gy. (2003): *Sclerotinia sclerotiorum* törzsek eltérő agresszivitása napraforgón - 49. Növényvédelmi Tudományos Napok, MTA, Budapest (összefoglaló) 124. old.

Sződi Sz., Zándoki E., Turóczi Gy. (2003): Napraforgóról izolált *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary törzsek változékonyságának vizsgálata. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok, MTA, Budapest (összefoglaló) 119. old.

Zándoki E., Turóczi Gy. (2004): *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary törzsek vegetatív kompatibilitásának vizsgálata. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok, MTA, Budapest. (összefoglaló)