



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

A repce plenodómuszos betegségét okozó hazai kórokozók
jellemezése

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Bagi Bianka

Budapest

2023

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Zámboriné dr. Németh Éva
egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Kertészettudományi Intézet
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezetők: Dr. Petróczy Marietta
egyetemi docens, PhD
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Növényvédelmi Intézet
Növénykórtani Tanszék

Dr. Palkovics László
egyetemi tanár, DSc
Széchenyi István Egyetem
Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar
Növénytudományi Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
.....
A témavezetők jóváhagyása

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A repce (*Brassica napus* L.) világszerte az egyik legfőbb olajnövény, melyet jelentős területen termesztnek (Brachaczek és mtsai., 2021). Az 1980-as évektől a főbb repcetermesztő régiókban – úgy, mint Kanadában, Európában, Kínában, Indiában, valamint Ausztráliában – a nagy hozamú hibridek bevezetése az élelmiszeripar és a takarmányozás piacán a repcemag előállításának fokozatos növekedését eredményezte. Az 1990-es évektől azonban Európában és Ausztráliában a termésmennyiség átlagos növekedési rátája hanyatlani kezdett. Ebben az időben a biotikus tényezőkkel szembeni védelem nem volt megfelelő, emellett a repce magas erukasav és glükoszínolát szinttel rendelkezett, amely mind élelmiszeripari, mind takarmányozási szempontból kedvezőtlen volt (Allender és King, 2010; Zheng és mtsai., 2020).

A nemesítés során ugyan optimalizálták az erukasav és a glükoszínolát szintjét, azonban ennek következményeképp csökkent a növények ellenállósága a kórokozókkal, többek között a plenodómuszos betegség kórokozóival szemben is. Az ellenállóképesség csökkenése miatt gyakoribbá vált a kórokozók előfordulása, egyre nagyobb károkat okoztak a repcetermesztők számára (Kightley és mtsai., 2012). Egyes feljegyzések szerint a plenodómuszos betegség kórokozói világszerte jelentős gazdasági kárt, évente több, mint 900 millió dollár veszteséget jelentenek (Fitt és mtsai., 2008).

A betegségért felelős két kórokozó – a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* – együttes jelenlétét ezidáig számos európai országban igazolták. Magyarországon a *P. lingam*-ot először 2006-ban írták le (Magyar és mtsai., 2006; Szlávik és mtsai., 2006). Szerbiában, Rimski Šančevi közelében gyűjtött repcemintákból 2016-ban Mitrović és mtsai. izolálták a *P. biglobosus*-t. A 2018-ban gyűjtött mintáinkból néhány esetben azonosítottuk a kórokozót, amelynek jelenléte Magyarországon korábban ismeretlen volt (Bagi és mtsai., 2020).

Vizsgálataink során célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- A plenodómuszos betegség kórokozó elterjedtségének feltérképezése hazánkban;
- A *Plenodomus* izolátumok fajszintű azonosítása és jellemzése morfológiai, valamint tenyészbélyegek alapján;
- A *Plenodomus*-fajok megbízható azonosítása molekuláris módszerrel;
- A *Plenodomus* izolátumok különböző genomi régiói (teljes ITS régió, az LSU, a β -tubulin-2 gén, az *rpb2* régió, valamint az *act1* gén egy szakasza) nukleotid szekvenciájának együttes elemzésével a hazai populáció változékonyságának feltérképezése, az izolátumok filogenetikai rokonságának feltárása;

- Egyéb genomi régiók (avirulencia gén, párosodási típusokat meghatározó gén) molekuláris vizsgálata;
- A *P. lingam* és a *P. biglobosus* izolátumok fungicid hatóanyagokkal szembeni érzékenységének *in vitro* vizsgálata sorozathígításos, mérgezett agarlemez módszerrel.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A növényi részek gyűjtése és tárolása

2017 és 2021 között, 10 vármegyéből, az ország 29 településének közeléből, a plenodómuszos betegség tüneteit mutató repce leveleket és szárazakat, az öt év során összesen 502 db növényi részt gyűjtöttünk. A tüneteket mutató növényi részeket még a gyűjtés napján az egyetem laboratóriumába szállítottuk. A továbbiakban kizárólag azokkal a levél-, és szárdarabokkal dolgoztunk, amelyeken a plenodómuszos betegség ivartalan termőtesteit, piknídiumok képződtek. A felhasznált növényi részeket a konídiumok előtöréséig (maximum 3 nap) nedves kamrában, természetes megvilágítás mellett, szobahőmérsékleten inkubáltuk.

A kórokozók izolálása és a tenyészetek fenntartása

A nedves kamrákban elhelyezett növényi részek a piknídiumokból sok esetben piknokonídiumok tömege tört elő. Goh (1999) módszerét követve láng felett kihúzott üvegapilláris sztereomikroszkóp alatt a konídiumtömeget leemeltük, majd steril vízbe helyeztük. A konídiumszuszpenziót ezután vortexeltük, majd PDA táptalajon szélesztettük. A Petri-csészéket 24 ± 1 °C-on, sötétben inkubáltuk, majd 3 nap elteltével a csírázó konídiumok hifacsúcsának átoltásával tiszta tenyészeteket hoztunk létre. Az izolátumokat hosszabb távon kémcsövekben, ferde agaron, valamint agarlemezekken tároltuk.

Morfológiai és tenyészbélyegek jellemzése és értékelése, patogenitási teszt

A két kórokozó piknídiumai morfológiai bélyegek alapján rendkívül hasonlóak (Shoemaker és Brun, 2001; Ghanbarnia és mtsai., 2011). A konídiumok tulajdonságainak értékelése alapján a két kórokozó nem különíthető el egymástól, az izolátumok fajszerű azonosítása molekuláris módszerrel történt. A konídiumok vizsgálatát 7 véletlenszerűen kiválasztott minta/izolátum esetében végeztük el: a konídiumok szélességét és hosszúságát μm pontossággal mértük le, valamint a konídiumok alakját és színét jellemeztük.

Az izolátumok tenyészbélyegeinek vizsgálata során feljegyeztük a tenyészetek alakját, színét, szélét, mintázottságát, a színanyag termelődését, a képződött légmicélium mennyiségét, valamint a piknídiumok képződését. Azon izolátumok esetében, amelyeknél a konídiumok méretét

lemértük, a tenyészetek átmérőjének napi átlagos növekedési ütemét is meghatároztuk (mm / 24 h). A tenyészetek tulajdonságait a leoltást követő 28. napon értékeltük.

Az izolátumok megbetegítő-képességének igazolására a Koch-posztulátumokat követve patogenitási tesztet végeztünk, melyhez repce növényeket neveltünk. A repce növényeket, valamint a leválasztott leveleiket fertőztük.

Molekuláris vizsgálatok

A molekuláris vizsgálatokhoz az izolátumok örökítőanyagát CTAB (cetil-trimetil-ammónium-bromid) tartalmú puffer segítségével vontuk ki (Maniatis és mtsai., 1983), majd kloroform és izoamil-alkohol 24:1 arányú elegyének felhasználásával tisztítottuk.

A *Plenodomus*-fajok genomjának több szakaszát polimeráz láncreakcióval (PCR) megsokszoroztuk. Az izolátumok fajsztintú azonosítását multiplex PCR-rel, az ITS régió egy szakasza alapján, specifikus primerek felhasználásával végeztük. A fajsztintú meghatározás a célszekvencia mérete alapján lehetséges (Liu és mtsai., 2006). A párosodási típusok vizsgálatához szintén multiplex PCR-t alkalmaztunk. A felhasznált forward primerek a párosodási típusokat tekintve specifikusak (Cozinjsen és Howlett, 2003). Van de Wouw és Howlett (2012) módszerét a hazai *P. lingam* izolátumokra adaptálva az *AvrLm4* gént is vizsgáltuk. A filogenetikai analízishez az ITS régió teljes szakaszát, az LSU régió egy szakaszát, a *tub2* gén egy szakaszát, az *rpb2* régió egy szakaszát és az *act1* gén egy szakaszát vizsgáltuk. Az *rpb2* szakasz amplifikációjához saját primereket terveztünk, míg a többi szakasz esetén külföldi referált folyóiratokban publikált primereket alkalmaztunk.

A PCR eredményességét gélelektroforézissel ellenőriztük. A szekvenciák meghatározása előtt a PCR-termékeket High Pure PCR Product Purification Kittel tisztítottuk meg. A tisztított termékek koncentrációját spektrofotométerrel ellenőriztük. A szekvenciák meghatározását a BaseClear B.V. (Leiden, Hollandia) cég végezte el.

A szekvenciák ellenőrzésére, szerkesztésére és a nemzetközi adatbázisból származó szekvenciákkal való összehasonlítására az NCBI adatbázis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programcsomagját használtuk fel (Altschul és mtsai., 1990). A szekvenciákat a CLC Sequence Viewer Viewer 8 (CLC Bio) program segítségével szerkesztettük, szükség esetén a kromatogramok alapján javítottuk őket, majd összehasonlítottuk más országokból származó izolátumok szekvenciáival.

A filogenetikai analízishez 26 *P. lingam* és 17 *P. biglobosus* izolátumot használtunk fel. A szekvenciák analíziséhez és a filogenetikai kapcsolatok vizsgálatához a MEGA11 programcsomagot választottuk (Tamura és mtsai., 2021). A vizsgált szakaszok alapján három

különálló filogenetikai törzsfát készítettünk. A törzsfákat a Neighbor-Join és a Maximum Composite Likelihood (MCL) becslésekkel készítettük. Az izolátumaink szubkládjának meghatározásához Mendes-Pereira és mtsai. (2003) vizsgálatához hasonlóan az ITS régiókat és az 5,8S rDNS gént használtuk fel. A „multi-locus”-os analízishez egy olyan *P. lingam* 'brassicae' és *P. biglobosus* 'brassicae' izolátumot használtunk fel, amelyek esetében a *tub2* gén, az ITS régió, az LSU régió és az *rpb2* gén általunk is vizsgált szakaszainak szekvencia adatai elérhetőek az NCBI adatbázisban. Ezen izolátumok *act1* génjének szekvenciaadatai nem érhetőek el az adatbázisban, emiatt az *act1* génre vonatkozóan egyéb NCBI adatbázisból származó izolátumok felhasználásával külön törzsfát készítettünk.

Fungicid hatóanyagok tesztelése

Az izolátumok fungicid érzékenységének vizsgálatára öt hatóanyagot (boszkalid, fluopiram, azoxistrobin, piraklostrobin és tebukonazol) választottunk ki. Sorozathígításos, mérgezett agarlemezes módszerrel a kórokozók micéliumának növekedésével szemben kifejtett hatását figyeltük meg. A tiszta hatóanyagokat 2, 10, 20 és 30 mg/L-es koncentrációban, négy ismétlésben, öt izolátum esetében vizsgáltuk, valamint készítettünk oldószert és hatóanyagot nem tartalmazó, valamint kizárólag oldószert tartalmazó kontrollt. Az alkalmazott hatóanyagok vízben nem, vagy csupán gyengén oldódnak, emiatt a hatóanyagtól függően oldószerként izopropanolt vagy metanolt választottunk. A tenyészetek átmérőjét a 3., 7. és a 10. napon mértük.

3. EREDMÉNYEK

A *Plenodomus*-fajok előfordulása őszi káposztarepcén, a kórokozók elterjedtsége

Az öt év alatt 308 alkalommal izoláltunk *Plenodomus*-fajt a tüneteket mutató növényi részekről. Az izolátumok közül 158 db (51,3%) a *P. lingam*, míg 150 db (48,7%) a *P. biglobosus* fajhoz tartozott. A vizsgált 29 mintavételi helyszín közül 24 helyszínről izoláltuk a *P. lingam*, míg 18 helyszínről a *P. biglobosus* kórokozót legalább egy esetben. Az egyes mintavételi helyszíneken a kórokozókat különböző arányban izoláltuk.

2017-ben kizárólag a *P. lingam* kórokozót izoláltuk (13 izolátum), míg 2020-ban az izolátumok több, mint 90%-a (40 izolátum) a *P. biglobosus* fajhoz tartozott.

A kórokozók tünetei, morfológiai- és tenyészbélyegei, patogenitási teszt

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* által okozott levéltünetek sötét szegéllyel körülölelt, több milliméteres, kerekded foltok, melyek közepén kivilágosodnak és gyakran kitöredeznek.

A szárazon barna, nekrotikus, később kifehéredő foltok jelennek meg. A *P. lingam* főként a szár alapi részénél, a *P. biglobosus* a felsőbb régióban okoz elhaló foltokat. A két faj által okozott tünetek rendkívül hasonlóak, emiatt a levél-, és szártüneteik alapján nem különíthetők el egymástól. Mind a levélen, mind a száron található nekrotizálódó foltokban tömegesen jelennek meg a piknídiumok. Az általunk megfigyelt piknídiumok fekete színűek, kerekdedek, közel 200-300 µm-es nagyságúak voltak. A piknídiumokból meleg és páradús környezetben konídiummassza áramlik ki, amelynek színe nagy tömegben látszólag a világosbarnától a bordóig változhat. A két kórokozó konídiumai mikroszkóp alatt színtelenek, henger alakúak, egysejtűek, mindkét végük tompa. A piknídiumokat és a konídiumokat a két faj esetében szemrevételezéssel nem lehet elkülöníteni egymástól. A konídiumok méreteinek statisztikai elemzése során a vizsgált izolátumok konídiumai nem különböztek szignifikánsan sem a szélesség, sem a hosszúság tekintetében.

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* tenyészbélyegeit a leoltást követő 28. napon értékeltük. A főbb tenyészbélyegek alapján az izolátumokat négy csoportba soroltuk. A *P. lingam* tipikus tenészetete szürkésfehér, vagy sötétszürke színű, szegélye csipkézett, nem színezi el a táptalajt, kevés légmicéliumot képez, míg a *P. biglobosus* jellegzetesen sárgára színezi a táptalajt, továbbá dús, fehér légmicéliumot képez, szegélye elmosódott.

A patogenitási teszt eredményeképp a fertőzési pontnál 2-3 nap elteltével a kórokozókra jellemző tünetek, barnulás és edénnyalábok elhalása jelent meg, valamint néhány esetben piknídiumok képződését is megfigyeltük.

A *Plenodomus* izolátumok molekuláris vizsgálata

Az izolátumok fajszerű azonosítása az ITS régió (ITS1 + 5,8S rDNS + ITS2) molekuláris vizsgálata alapján történt. A két kórokozó a keletkező PCR-termék hosszúsága alapján egyértelműen elkülöníthető egymástól. A *P. lingam* esetében 331 bp hosszúságú, míg a *P. biglobosus* esetében 444 bp hosszúságú szakasz keletkezett. A vizsgált 308 izolátum közül 158 (51,3%) a *P. lingam* fajhoz, míg 150 (48,7%) a *P. biglobosus*-hoz tartozott.

4 db *P. lingam* ITS régiójának 289 bp hosszúságú, míg 3 db *P. biglobosus* ITS régiójának 327 bp hosszúságú szakaszát egymással, valamint az NCBI adatbázisból származó külföldi izolátumok azonos hosszúságú szekvenciáival hasonlítottuk össze. Ennek eredményeképp megállapítottuk, hogy a *P. lingam* és a *P. biglobosus* izolátumok 100%-os megbízhatósággal elkülönülnek egymástól. A saját *P. lingam* izolátumainkat a referencia izolátumhoz hasonlítva 100%-os azonosságot, míg a saját *P. biglobosus* izolátumainkat a referencia izolátumhoz hasonlítva 99,7-100%-os hasonlóságot figyeltünk meg a BLAST analízis alapján.

Elsőként igazoltuk hazánkban a *P. lingam* esetében mind a MAT1-1, mind a MAT1-2 párosodási típus jelenlétét molekuláris módszerrel. A MAT1-1 típus esetén 656 bp hosszúságú, míg a MAT1-2 típus esetén 445 bp hosszúságú szakasz szaporodott fel a PCR során. A Nagylózsáról és a Kétpóról származó izolátumok között mindkét párosodási típushoz tartozó izolátumot is megfigyeltünk. Ebből megállapítható, hogy a *P. lingam* esetén Magyarországon is adott az ivaros szaporodás lehetősége.

Az *AvrLm4* gént a *P. lingam*, valamint a *P. biglobosus* izolátumok egy részénél vizsgáltuk PCR-rel. Az izolátumok különböző repcehibridekről származtak. A *P. lingam* esetében a célszekvencia mérete 1127 bp hosszúságú volt, a *P. biglobosus* izolátumok közül amplikon egyik esetén sem keletkezett.

A 43 db izolátum ITS1-5,8S-ITS2 szekvenciáját, az LSU régió egy szakaszát, a *tub2* gén egy szakaszát, az *rpb2* régió egy szakaszát, valamint az *act1* gén egy szakaszát sikeresen amplifikáltuk. A szakaszok szekvenciái tudomásunk szerint az első szekvencia adatok Magyarországról.

A teljes ITS1-5,8S-ITS2 régió alapján készült törzsfán a *P. lingam* és a *P. biglobosus* külön ágon helyezkedik el, emellett az egyes szubkládok is jól elkülönülnek egymástól. Az általunk vizsgált 26 *P. lingam* izolátum ITS1-5,8S-ITS2 szekvenciái teljes mértékben megegyeztek az Egyesült Királyságból származó izolátum ugyanazon szakaszának szekvenciájával. Ehhez hasonlóan a 17 *P. biglobosus* izolátum ITS1-5,8S-ITS2 szekvenciái is 100%-ban megegyeztek a referencia izolátum szekvenciájával. Az elemzés alapján egyértelmű, hogy mind a 43 *Plenodomus* izolátum a *P. lingam* 'brassicae', illetve a *P. biglobosus* 'brassicae' szubkládhoz tartozik.

A "multi-locus"-os analízis alapján a vizsgált szakaszok több, mint 98%-ban megegyeztek a referencia izolátumok ugyanazon szekvenciájával. A törzsfán a vizsgált *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumok egymástól elkülönülten helyezkednek el, a fajon belül kis mértékű variabilitást figyeltünk meg.

Az *act1* gén vizsgált szakasza alapján készült törzsfá esetén a *P. lingam* izolátumaink nukleotid szekvenciái 99,78-99,89%-ban, míg a *P. biglobosus* izolátumaink nukleotid szekvenciái 99,89-100%-ban megegyeztek a referencia izolátumok azonos szakaszával.

A *Plenodomus*-fajok fungicid érzékenysége

Az SDHI fungicidek közé tartozó boszkalid 10, 20 és 30 mg/L-es koncentrációban mindkét kórokozó esetében hatékonyan gátolta a vizsgált izolátumok növekedését. 2 mg/L-es koncentráció esetén mindkét kórokozó tenyészetei a 10 nap alatt kis mértékben növekedésnek indultak.

A szintén az SDHI fungicidek közé tartozó fluopiram hatékonysága fajonként és koncentrációnként is eltérő volt. A 30 mg/L-es koncentrációban minden izolátum esetén fungicid hatást figyeltünk meg. A 20 mg/L-es koncentráció esetén a vizsgált *P. lingam* izolátumoknál csupán minimális micéliumnövekedést tapasztaltunk, míg a *P. biglobosus* tenyészetek a 10. nap végére nagyobb telepátmérővel rendelkeztek. A 10 mg/L-es és a 2 mg/L-es koncentráció esetén is megfigyelhető a két kórokozó közötti különbség. Mindkét esetben a 10. nap végére a *P. biglobosus* tenyészetek esetén nagyobb átmérőt mértünk.

A QoI fungicidek közé tartozó azoxistrobin az izolátumok többségére csupán fungisztatikus hatásúnak bizonyult, gombaölő hatást egyik vizsgált koncentrációnál sem figyeltünk meg. A két kórokozó esetében a koncentráció tekintetében számottevő különbséget nem tapasztaltunk.

A szintén QoI fungicidek közé tartozó piraklostrobinnal végzett vizsgálat során a 10, 20 és 30 mg/L-es koncentráció esetén az összes *P. biglobosus*, valamint az L280-as *P. lingam* izolátum esetén is fungicid hatást figyeltünk meg. Az L279-es izolátum a 30 mg/L-es koncentráció esetén is növekedésnek indult. A hatóanyag 2 mg/L-es koncentrációban is minden vizsgált izolátumnál fungisztatikus hatásúnak bizonyult.

A DMI hatástani csoportba tartozó tebukonazol esetén izolátumonként és koncentrációnként is eltérő hatékonyságot figyeltünk meg. A 30 mg/L-es koncentráció esetén az L308-as *P. biglobosus* izolátum kivételével minden izolátumnál fungicid hatást figyeltünk meg. Az L308-as izolátum még ezen koncentráció esetén is növekedésnek indult. A 20 mg/L-es koncentráció esetén a tenyészetek mérete mindkét fajnál közel azonos volt, a hatóanyag ezen koncentrációban csupán fungisztatikus hatást eredményezett. A 10 és 2 mg/L-es koncentrációban a két fajhoz tartozó izolátumok között számottevő különbséget nem tapasztaltunk.

Az oldószerek a legmagasabb koncentrációban sem befolyásolták a *Plenodomus* izolátumok fejlődését, így a gátló hatás kizárólag a hatóanyagoknak tulajdonítható.

Új tudományos eredmények

- A *Plenodomus biglobosus* első hazai azonosítását (Bagi és mtsai., 2020) követően bizonyítottuk annak országos elterjedését és megállapítottuk, hogy a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* együttesen okozzák az őszi káposztarepcén megjelenő levélfoltosságot és szárrákot.
- Elsőként jellemeztük a hazai *Plenodomus biglobosus* populáció tenyészbélyegeinek változékonyságát.

- Magyarországon elsőként közöltünk szekvencia adatot a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* kórokozók kapcsán: az ITS régió, az LSU régió, a *tub2* gén, az *rpb2* régió és az *act1* gén egyes szakaszairól.
- Elsőként bizonyítottuk Magyarországon a *Plenodomus lingam* ivaros szaporodásának lehetőségét, valamint elsőként közöltünk hazánkban szekvencia adatokat a párosodási típusokat meghatározó gén egyes szakaszairól.
- Hazánkban elsőként végeztünk a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* izolátumok esetében fungicid hatóanyagokkal szembeni *in vitro* érzékenységi vizsgálatokat, melynek során az azoxistrobin esetén csupán fungisztatikus, míg a boszkalid, fluopiram, piraklostrobin és a tebukonazol esetén jelentős fungicid hatást tapasztaltunk.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Egy új kórokozó elterjedtsége

Egy új kórokozó megjelenése vagy egy populáció genetikai összetételének megváltozása megkérdőjelezheti a korábban alkalmazott növényvédelmi stratégiák hatékonyságát. A *P. biglobosus*-t 2018-ban gyűjtött mintákból izolálva 2020-ban írtuk le először Magyarországon őszi káposztarepcén (Bagi és mtsai., 2020). Ha egy országban új kórokozó jelenik meg, akkor következő lépésként a terjedésének feltérképezése segítséget nyújthat a növényvédelmi technológiák és a növénynevelési stratégiák újragondolásában (Huang és mtsai., 2014). Eddigi eredményeink arra engednek következtetni, hogy a *P. biglobosus* vélhetően az egész országban széles körben elterjedt. A kórokozók jelenléte és az általuk megbetegített növények gyakorisága alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a *P. biglobosus* sokkal elterjedtebb Magyarországon, mint azt korábban sejtettük.

Tünetek, morfológiai- és tenyészbélyegek

A két kórokozó esetében az általunk megfigyelt levéltünetek megegyeznek a Karolewski és mtsai. (2007) által leírtakkal és egyben megállapítható, hogy a két kórokozót a levéltünetek alapján nem lehet megbízhatóan elkülöníteni egymástól. A vizsgálatok során a száron megfigyelt tünetek megegyeztek a Liu és mtsai. (2014) által leírtakkal. A *P. lingam* inkább a szár gyökérnyakhoz közeli régiójában, míg a *P. biglobosus* inkább a szár felsőbb részén okoz hasonló, nekrotizálódó foltokat (Sprague és mtsai., 2007). Mintagyűjtésünk kezdeti szakaszában a növényeknek csupán a talajhoz közeli szárrészét mintáztuk, amely eredményeképp eleinte kizárólag a *P. lingam* kórokozót sikerült izolálnunk. A két kórokozó többnyire együtt jelenik meg

a gazdanövényeken, valamint rendkívül hasonló tüneteket okoznak, ennek következményeképp hosszú időn át nem derült fény hazánkban a *P. biglobosus* jelenlétére.

A kórokozók morfológiai bélyegei bizonyos tulajdonságokban hasonlóak, valamint egyes izolátumok tenyészeteinél a többitől eltérő, atipikus tenyészbélyegeket is megfigyeltünk. A szakirodalom alapján a két kórokozó egymástól való elkülönítése és fajsztípus meghatározása nagy biztonsággal kizárólag molekuláris módszerekkel lehetséges (Rouxel és mtsai. 2004), melyet eredményeinkkel mi is megerősítettünk.

Molekuláris vizsgálatok

Multiplex PCR segítségével gyorsan és megbízhatóan azonosítottuk fajsztípuson a hazai *Plenodomus* izolátumokat Liu és mtsai. (2006) módszere alapján. Elsőként bizonyítottuk a *P. lingam* ivaros szaporodásának lehetőségét, molekulárisan azonosítva a MAT1-1 és MAT1-2 párosodási típusokat (Cozijnsen és Howlett, 2003). A kiválasztott primerek a *P. biglobosus* izolátumok esetében nem működtek, így a kórokozó párosodási típusainak további vizsgálatához új primerek tervezése szükséges. Az ivaros szaporodás lehetővé teszi a kórokozó számára a gyorsabb alkalmazkodóképességet a gazdaszervezethez (Parlevliet, 2002), lehetővé teszi, hogy képes legyen áttörni annak kvalitatív rezisztenciáját (McDonald és Linde, 2002), vagy lehetőséget nyújt a peszticidekkel szembeni ellenálló képesség kialakítására (Kema és mtsai., 2018).

Az *AvrLm4* génnel rendelkező *P. lingam* izolátumok különböző hibridek fertőzött növényi részeiről származtak, amiből arra következtethetünk, hogy a hibridek ellenállóképessége nem nyújt megfelelő védelmet az *AvrLm4* génnel rendelkező *P. lingam* izolátumokkal szemben. Az *AvrLm4* gén vizsgálata során sikeresen adaptáltuk Van de Wouw és Howlett (2012) módszerét a hazai izolátumokra. A *P. lingam* populáció genetikai összetétele folyamatosan változik. Ennek következményeképp a kórokozó egyes izolátumai képesek megfertőzni a rezisztens hibrideket.

Filogenetikai analízis

A növényi kórokozók genetikai variabilitásának feltérképezése és nyomon követése hozzájárulhat jobb növényvédelmi stratégiák kialakításához (Huang és mtsai., 2014). A hazai *P. lingam* izolátumok molekuláris szintű elemzése után egyértelművé vált, hogy a vizsgált izolátumok kivétel nélkül a 'brassicae' szubkládhoz tartoznak, a tenyészetek morfológiai változatosságának ellenére egymással szoros rokonsági viszonyt mutatnak. Hasonlóképp, valamennyi *P. biglobosus* izolátumunk a *P. biglobosus* 'brassicae' szubkládhoz sorolható. Egyes kutatók szerint az Egyesült Királyságban a *P. biglobosus* 'canadensis' megjelenése felelős a *P. biglobosus* jelentőségének növekedéséért (King és West, 2022), amelynek megjelenése a

jövőben Magyarországon sem zárható ki. Egy kórokozó populációjának genetikai összetételében megjelenő hasonlóság feltételezhetően jelentheti a környezethez való alkalmazkodási képességének csökkenését, amely fontos információt nyújthat a fungicid-rezisztencia kialakulásának kockázatáról.

Fungicid hatóanyagok tesztelése

A *P. biglobosus* kórokozó kapcsán elsőként végeztünk hazánkban fungicid hatóanyagokkal *in vitro* vizsgálatokat. A két kórokozóval végzett vizsgálataink alapját képezhetik egy szélesebb körű monitoringnak, amely a növényvédelmi technológia optimalizálására irányul.

Eredményeink alapján mind a *P. lingam*, mind a *P. biglobosus* izolátumok érzékenyek bizonyultak a boszkaliddal szemben, mely egybevág Fajemisin és mtsai. (2022) eredményeivel. Eredményeik alapján a csehországi izolátumok esetében a rezisztencia kialakulását nem feltételezték.

Az általunk vizsgált *P. lingam* izolátumok érzékenyek tekinthetők a fluopiramra, ezzel szemben Van de Wouw és mtsai. (2021) egyes *P. lingam* izolátumok esetében az érzékenység csökkenését figyelték meg. Megfigyeléseink során a vizsgált *P. biglobosus* izolátumok is érzékenyek bizonyultak.

Az azoxistrobin esetén a *P. lingam* és a *P. biglobosus* izolátumokkal végzett vizsgálatunk során csupán fungisztikus hatást figyeltünk meg. Ezen hatóanyag tesztelésére Mondal és mtsai. (2005) *Alternaria alternata* kórokozó tenyészetével végeztek vizsgálatot *in vitro*. 100 µg/ml-es koncentráció esetén is kevesebb, mint 50%-os csökkenést tapasztaltak az izolátumok micéliumnövekedésében a kontrollhoz képest. Ennek oka egyes megfigyelések szerint a növénypatogén gombák biológiai folyamataiban keresendők, melyek *in vivo* és *in vitro* különbözhetnek. Feltehetőleg a *P. lingam* és a *P. biglobosus* izolátumokkal végzett *in vitro* tesztek nem összevethetők a növényen belül kifejtett gombaölő hatással, így ennek ellenőrzésére *in vivo* kísérletek szükségesek.

A piraklostrobin hatóanyagra a *P. lingam* izolátumokat Mondal és mtsai. (2005) megfigyeléseihez hasonlóan érzékenyek találtuk, valamint eredményeink alapján a *P. biglobosus* izolátumok is érzékenyek tekinthetők.

Eckert és mtsai. (2010) vizsgálatai alapján a tebukonazol hatóanyagra a *P. lingam* izolátumok érzékenyebbek bizonyultak a *P. biglobosus* izolátumoknál. A hatóanyag a micélium növekedését a kontrollhoz képest átlagosan 50%-kal a *P. lingam* esetében 0,67 mg/L-es koncentrációban, a *P. biglobosus* esetében csupán 1,45 mg/L-es koncentrációban csökkentette. Saját kísérletünk alapján az 50%-os gátlás eléréséhez 2 mg/L és 10 mg/L közötti koncentráció

lenne szükséges mindkét faj esetén. Így előzetes tesztünk alapján, a hazai *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumok kevésbé tűnnek érzékenynek a tebukonazol hatóanyagra, mint az Egyesült Királyságból származó izolátumok.

A tiszta hatóanyagok bevonásával végzett analízisünk a jövőben bekövetkező érzékenységbeli változásokat nyomon követéséhez fontos információkat biztosít. Eredményeink alátámasztásához több izolátum bevonásával ugyanezen vizsgálatok elvégzésére lenne szükség, hogy biztosabb következtetéseket lehessen levonni a magyarországi *Plenodomus* populáció fungicid érzékenységének tekintetében. A fungicid-rezisztencia kialakulásának megakadályozásához továbbra is különböző hatásmechanizmussal és hatáshellyel rendelkező fungicideket együttesen és/vagy változtatva lenne érdemes alkalmazni (Staub, 1991; Brent és Hollomon, 2007).

Idézett irodalmak

1. ALLENDER, C. J., KING, G. J. 2010. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology* 10 (54): 1-9.
2. ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410.
3. BAGI B., NAGY CS., TÓTH A., PALKOVICS L., PETRÓCZY M. 2020. *Plenodomus biglobosus* on oilseed rape in Hungary. *Phytopathologia Mediterranea* 59 (2): 345-351.
4. BRACHACZEK, A., KACZMAREK, J., JĘDRYCZKA, M. 2021. Warm and wet autumns favour yield losses of oilseed rape caused by phoma stem canker. *Agronomy* 11 (6): 1171.
5. BRENT, K. J., HOLLOWON, D. W. 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It be Managed? Brussels, Fungicide Resistance Action Committee, Crop Life International
6. COZIJNSEN, A. J., HOWLETT, J. 2003. Characterisation of the mating-type locus of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* 43: 351-357.
7. ECKERT, M. R., ROSSALL, S., SELLEY, A., FITT, B. D. L. 2010. Effects of fungicides on *in vitro* spore germination and mycelial growth of the phytopathogens *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* (phoma stem canker of oilseed rape). *Pest Management Science* 66 (4): 396-405.
8. FAJEMISIN, O., MAZÁKOVÁ, J., RYŠÁNEK, P. 2022. Evaluation of the sensitivity of *Leptosphaeria maculans* isolates causing phoma stem canker in oilseed rape in the Czech Republic to boscalid and dimoxystrobin fungicides. *Plant Protection Science* 1-10.
9. FITT, B. D. L., HU, B. C., LI, Z. Q., LIU, S. Y. LANGE, R. M., KHARBANDA, P. D., BUTTERWORTH, M. H., WHITE, R. P. 2008. Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathology* 57 (4): 652-664.

10. GHANBARNIA, K., FERNANDO, W. G. D., CROW, G. 2011. Comparison of disease severity and incidence at different growth stages of naturally infected canola plants under field conditions by pycnidiospores of *Phoma lingam* as a main source of inoculum. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33 (3): 355-363.
11. GOH, T. K. 1999. Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity* 2. 47-63.
12. HUANG, Y. J., KARANDENI-DEWAGE, C. S., FITT, B. D. L. 2014. Importance of *Leptosphaeria biglobosa* as a cause of phoma stem canker on winter oilseed rape in the UK. *Aspects of Applied Biology* 127: 117-122.
13. KAROLEWSKI, Z., WALCZAK, D., KOSIADA, T., LEWANDOWSKA, D. 2007. Occurrence of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in oilseed rape leaves with different symptoms of stem canker. *Phytopathologia polonica* 44: 43-50.
14. KEMA, G. H. J., GOHARI, A. M., AOUINI, L., GIBRIEL, H. A. Y., WARE, S. B., VAN DEN BOSCH, F., MANNING-SMITH, R., ALONSO-CHAVEZ, V., HELPS, J., M'BAREK, S. B., MEHRABI, R., DIAZ-TRUJILLO, C., ZAMANI, E., SCHOUTEN, H. J., VAN DER LEE, T. A. J., WAALWIJK, C., DE WAARD, M. A., DE WIT, P. J. G. M., VERSTAPPEN, E. C. P., THOMMA, B. P. H. J., MEIJER, H. J. G., SEIDL, M. F. 2018. Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nature Genetics* 50: 375-380.
15. KIGHTLEY, S. P. J., KNIGHT, S. M., BINGHAM, I. J., LANG, B., PHILPOTT, H. L. 2012. The impact of changes to agronomic practice on farm yield trends in oilseed rape. *Aspects of Applied Biology* 117: 137-144.
16. KING, K. M., WEST, J. S. 2022. Detection of the *Phoma* pathogens *Plenodomus biglobosus* subclades 'brassicae' and 'canadensis' on wasabi, and 'canadensis' in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 162: 751-756.
17. LIU, Z., LATUNDE-DADA, A. O., HALL, A. M., FITT, B. D. L. 2014. Phoma stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae'. *European Journal of Plant Pathology* 140: 841-857.
18. LIU, S. Y., LIU, Z., FITT, B. D. L., EVANS, N., FOSTER, S. J., HUANG, Y. J., LATUNDE-DADA, A. O., LUCAS, J. A. 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. *Plant Pathology* 55 (3): 401-412.
19. MAGYAR D., BARASITS T., FISCHL G., FERNANDO, W. G. D. 2006. First report of the natural occurrence of the teleomorph of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape and airborne dispersal of ascospores in Hungary. *Journal of Phytopathology* 154 (7-8): 428-431.
20. MANIATIS, T., SAMBROOK, I., FRITSCH, E. F. 1983. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

21. MCDONALD, B. A., LINDE, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Phytopathology* 40: 349-379.
22. MENDES-PEREIRA, E., BALESSENT, M. H., HORTENSE, B., ROUXEL, T. 2003. Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans* – *L. biglobosa* species complex. *Mycological Research* 107 (11): 1287-1304.
23. MITROVIĆ, P., JEROMELA, A. M., TRKULJA, V., MILOVAC, Ž., TERZIC, S. 2016. The first occurrence of stem canker on oilseed rape caused by *Leptosphaeria biglobosa* in Serbia. *Ratarstvo i povrtarstvo* 53 (2): 53-60.
24. MONDAL, S. N., BHATIA, A., SHILTS, T., TIMMER, L. W. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. *Plant Disease* 89 (11): 1186-1194.
25. PARLEVLJET, J. E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124: 147-156.
26. ROUXEL, T., MENDES-PEREIRA, E., BRUN, H., BALESSENT, M. H. 2004. Species complex of fungal phytopathogens: *Leptosphaeria maculans* – *L. biglobosa* case study. In: SHARMA, A. K., SHARMA, A. (szerk.) *Plant Genome: Biodiversity and Evolution*. 2. edition. Science Publisher, Enfield, NH. 33-75.
27. SHOEMAKER, R. A., BRUN, H. 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany* 79 (4): 412-419.
28. SPRAGUE, S. J., WATT, M., KIRKEGAARD, J. A., HOWLETT, B. J. 2007. Pathways of infection of *Brassica napus* roots by *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*. 176 (1): 211-222.
29. STAUB, T. 1991. Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29: 421-442.
30. SZLÁVIK S., BARASITS T., FERNANDO, W. G. D. 2006. First report of pathogenicity group-3 of *Leptosphaeria maculans* on winter rape in Hungary. *Plant Disease* 90 (5): 684.
31. TAMURA, K., STECHER, G., KUMAR, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38. 3022-3027.
32. VAN DE WOUW, A. P., HOWLETT, B. J. 2012. Estimating frequencies of virulent isolates in field populations of a plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*, using high-throughput pyrosequencing. *Journal of Applied Microbiology* 113 (5): 1145-1153.
33. VAN DE WOUW, A. P., SCANLAN, J. L., MARCROFT, S. J., SMITH, A. J., SHEEDY, E. M., PERNDT, N. W., HARRISON, C. E., FORSYTH, L. M., IDNURM, A. 2021. Fungicide sensitivity and resistance in the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, across canola growing regions in Australia. *Crop & Pasture Science* 72 (12): 994-1007.

34. ZHENG, X., KOOPMANN, B., ULBER, B., VON TIEDEMANN, A. 2020. A global survey on diseases and pests in oilseed rape – current challenges and innovative strategies of control. *Frontiers in Agronomy* 2: 590908.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Impakt faktoros folyóiratban megjelent közlemények

BAGI B., NAGY CS., TÓTH A., PALKOVICS L., PETRÓCZY M. 2020. *Plenodomus biglobosus* on oilseed rape in Hungary. *Phytopathologia Mediterranea* 59 (2): 345-351. IF: 2,020 (2020)

BAGI B., PALKOVICS L., PETRÓCZY M. 2023. Phylogenetic analysis of *Plenodomus lingam* and *Plenodomus biglobosus* isolates in Hungary. *Journal of Plant Diseases and Protection* – online elérhető – IF: 1,847 (2022)
2. Lektorált folyóiratban megjelent közlemények

BAGI B., NAGY CS., TÓTH A., PALKOVICS L., PETRÓCZY M. 2020. Az őszi káposztarepce plenodómuszos betegségének kórokozói. *Növényvédelem* 81 (56): 544-552.

BAGI B., PALKOVICS L., PETRÓCZY M. 2023. Magyarországi *Plenodomus lingam* és *Plenodomus biglobosus* izolátumok filogenetikai analízise. *Növényvédelem* – in press
3. Konferencia összefoglalók

BAGI B., PETRÓCZY M., NAGY CS., TÓTH A., PALKOVICS L. 2019. Az őszi káposztarepce leptoszfériás betegségének kórokozói. In: HALTRICH A., VARGA Á. (szerk.) 65. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 55.

BAGI B., JÁKI V., PALKOVICS L., PETRÓCZY M. 2021. A *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* génjeinek molekuláris vizsgálata. In: HALTRICH A., VARGA Á. (szerk.) 67. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 61.

BAGI B., PETRÓCZY M., PALKOVICS L. 2021. Frequency and importance of *Plenodomus* species causing blackleg in Hungary. In: KÖVICS GY., TARCALI G. (szerk.) Tiszántúli Növényvédelmi Fórum (Összefoglalók) – 9th International Plant Protection Symposium at University of Debrecen (Abstracts), Debrecen, 86.