

DEBRECENI EGYETEM

KERPELY KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

Prof. Dr. Holb Imre, DSc.

egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető:

Prof. Dr. Karaffa Erzsébet Mónika

egyetemi tanár

**A DIÓ TERMÉSZROTHADÁSÁNAK KIALAKÍTÁSÁBAN
RÉSZTVEVŐ GOMBAPOPULÁCIÓK VIZSGÁLATA ÉS A FAJOK
IDENTIFIKÁLÁSA HAGYOMÁNYOS MIKROBIOLÓGIAI ÉS
MOLEKULÁRIS GENETIKAI MÓDSZERREL**

Készítette:

Zabiák Andrea

doktorjelölt

Debrecen

2024

**A DIÓ TERMÉSZROTHADÁSÁNAK KIALAKÍTÁSÁBAN
RÉSZTVEVŐ GOMBAPOPULÁCIÓK VIZSGÁLATA ÉS A FAJOK
IDENTIFIKÁLÁSA HAGYOMÁNYOS MIKROBIOLÓGIAI ÉS
MOLEKULÁRIS GENETIKAI MÓDSZERREL**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Növénytermesztési és kertészeti tudományágban

Írta: Zabiák Andrea, Élelmiszerbiztonsági és -minőségi mérnök

Készült a Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán Növénytermesztési és Kertészeti
Tudományok Doktori Iskolája Növénytermesztési és kertészeti tudományok programja
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Karaffa Erzsébet Mónika, egyetemi tanár

Az értekezés bírálói:

.....

.....

A bírálóbizottság:

elnök:

tagok:

.....

.....

Az értekezés védésének időpontja:

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A dió (<i>Juglans regia</i> L.) tulajdonságai és élettani hatásai	6
2.2. A diótermesztés globális helyzete	7
2.3. A dió környezeti igénye	8
2.4. A dióültetvények növényvédelme	10
2.5. A dió növényvédelmi problémái	11
2.6. A gombák jellemzése, szerepük a növényvilágban	12
2.7. A növény kórokozó gombák fertőzése	14
2.8. A növénypatogén gombák túlélési stratégiái	15
2.9. A globális éghajlatváltozás hatása a növényekre és a dióra	16
2.10. A Botryosphaeriaceae család bemutatása	17
2.11. A Botryosphaeriaceae család patogenitása	19
2.12. A <i>Botryosphaeria dothidea</i> faj bemutatása	21
2.13. A <i>Diaporthe</i> nemzetség bemutatása	22
2.14. A <i>Diaporthe eres</i> faj bemutatása	24
2.15. Növényvédő szerek fő tulajdonságai	25
2.16. A fungicidek hatékonyságát befolyásoló tényezők	26
2.17. Antagonista gombák növényvédelemben történő alkalmazásának lehetőségei	27
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	30
3.1. Mintavételezés, mintavételezési helyek	30
3.2. Fonelas gombák izolálása és azonosítása	31
3.2.1. A dió különböző növényi részeinek mikrobapopulációjának kitenyésztése	31
3.2.2. A tenyészetek morfológiai és molekuláris biológiai azonosítása	32
3.3. Látens fertőzöttség meghatározása ONFIT technikával	33
3.4. Hőmérséklet hatása <i>Botryosphaeria</i> és <i>Diaporthe</i> izolátumok növekedésére	33
3.5. Patogenitási teszt éretlen diótermésen	34
3.6. Dió- és almaágak mesterséges fertőzése	36
3.7. Fungicidek hatása a dió terméskárosodását okozó gombákra	37
3.8. Az <i>Epicoccum nigrum</i> és a <i>Trichoderma gamsii</i> antagonisták vizsgálata	38
3.9. A törzsek mikroszatellitjeinek vizsgálata	39
3.10. Az adatok kiértékelése során alkalmazott statisztikai módszerek	39
4. EREDMÉNYEK	40
4.1. A diófa ágainak, rügyeinek és terméseinek fonelas gomba populációja a kora nyári időszakban	40

4.2. Diótermések fonalas gombaközössége 2018-ban	45
4.3. A rügyek mikrobaközössége	52
4.4. Látens fertőzöttség meghatározása ONFIT technikával.....	53
4.5. Diótermések gombaközösségének vizsgálata érett terméseken 2019-ben	54
4.6. Hőmérséklet hatása <i>Botryosphaeria</i> és <i>Diaporthe</i> izolátumok növekedésére.....	57
4.7. Patogenitási teszt éretlen diótermésen	58
4.8. Diófa ágak patogenitási tesztje tünetes diótermésekből izolált kórokozókkal	60
4.9. Almafa ágainak inokulálása tünetes diófa szövetekből izolált kórokozókkal	62
4.10. Fungicidek hatása a dió terméskárosodását okozó gombákra	65
4.11. A 25% tebukonazol-tartalmú készítmény EC50 értékének meghatározása	66
4.12. Az <i>Epicoccum nigrum</i> és a <i>Trichoderma gamsii</i> antagonisták vizsgálata.....	69
4.13. A törzsek mikroszatellitjeinek vizsgálata	70
4.14. Mikroszatellitek alapján készített törzsfák és elemzésük	75
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	77
5.1. A diófa ágainak, rügyeinek és terméseinek fonalas gomba populációja a kora nyári időszakban.....	77
5.2. Diótermések fonalas gombaközössége 2018-ban	78
5.3. A rügyek mikrobaközössége	79
5.4. Látens fertőzöttség meghatározása ONFIT technikával.....	79
5.5. Diótermések gombaközösségének vizsgálata érett terméseken 2019-ben	81
5.6. Hőmérséklet hatása <i>Botryosphaeria</i> és <i>Diaporthe</i> izolátumok növekedésére.....	82
5.7. Patogenitási teszt éretlen diótermésen	82
5.8. Diófa ágak patogenitási tesztje tünetes diótermésekből izolált kórokozókkal	83
5.9. Almafa ágainak inokulálása tünetes diófa szövetekből izolált kórokozókkal	84
5.10. Fungicidek hatása a dió terméskárosodását okozó gombákra	85
5.11. A törzsek mikroszatellitjeinek vizsgálata	86
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	89
7. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK	91
8. ÖSSZEFOGLALÁS	92
9. SUMMARY	96
10. IRODALOM	100
11. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	127
12. NYILATKOZATOK	130

1. BEVEZETÉS

A dió (*Juglans regia* L.) Magyarországon a harmadik legnagyobb területen termesztett gyümölcs, termelési értéke a gyümölcstermelés 5,1%-át teszi ki. A hozam azonban az utóbbi években folyamatos csökkenést mutat a betakarított területek növekedésének dacára, viszont a külkereskedelmi egyenleg a héjas diót tekintve pozitív (FAOSTAT, 2021). A hazai ültetvényekben az utóbbi évtizedben a globalizáció és az éghajlati változások eredményeként új, a diótermést veszélyeztető kórokozók és kártevők jelentek meg (Voigt-Tóth, 2013; Kovács et al., 2018). A növénypatogén gombák által okozott, a diófa minden részét érintő megbetegedés világszerte jelen lévő probléma, mely jelentős veszteséget idéz elő az ágazatban (Chen et al., 2014; Meng et al., 2018; Moral et al., 2019).

A Botryosphaeriaceae és Diaporthaceae családok tagjait gyakran azonosítják kórokozóként számos fás szárú növényben, a diófában is (León et al., 2020; López-Moral et al., 2020; Luna et al., 2022). Hazánkban a termesztők a 2010-es évek közepén szembesültek a súlyos növényvédelmi kihívással a diótermések feketedése, aszalódása és penészesedése következtében. Előzetes felmérés során a bélállományok vizsgálatát követően nagy arányban tenyésztettünk ki *Diaporthe* és *Diplodia* nemzetségekbe tartozó gombákat (Kovács et al., 2018). Ezek a kórokozók képesek életben maradni a nyugalmi állapotban lévő és elhalt növényi részekben, majd a sebzéseken keresztül behatolni a növényi szövetekbe (Moral et al., 2019; López-Moral et al., 2020). A sérülések létrejöhetnek a metszés következtében, de fertőzési kaput jelenthetnek a patogének számára a nap okozta égés, a jégeső vagy az állatok okozta sebek (Michailides, 1991; Michailides et al., 2014).

A Botryosphaeriaceae és Diaporthaceae gombák elterjedését tovább súlyosbíthatja a klímaváltozás felgyorsulása, ami komoly veszélyeket tartogathat a diókereskedelem számára (Kybartaitė et al., 2020; Garcia et al., 2021), ugyanis jelenleg nincs a diófára engedélyezett, hatékony növényvédő szer ezen gombák ellen. Az ősszel és télen bekövetkező fertőzések általában tünetmentesek maradnak a következő év nyaráig, mialatt az inokulum források jelentősen felhalmozódhatnak. Ezt követően, a Botryosphaeriaceae fajok által kiváltott betegségek kitörésének kockázata a bő csapadékkal járó évszakokban tetőzik, mivel a kórokozók szaporító képletei főként a víz által szállított konídiumokkal terjed (Ahimera et al., 2004; Michailides–Morgan, 2004). Azonban ha egy csapadékos évet egy aszályos év követ, a Botryosphaeriaceae fajok

által okozott tünetek jellemzően súlyosak, mivel a víz stressz növeli a gazdaszervezet fogékonyágát a fertőzésekkel szemben (Marsberg et al., 2016).

A diófa különböző részeinek fertőzöttségének vizsgálata elengedhetetlen a betegség megismeréséhez és a kezelések optimális időpontjainak meghatározásához. Ennek egyik eszköze a BUDMON, mely során a rügyek mikrobiológiai állapotát tanulmányozhatjuk a nyugalmi időszak végén, ezzel segítve a gazdálkodókat a megfelelő növényvédelmi intézkedésekkel kapcsolatos döntésekben (Moral et al., 2019). A kora nyári időszakban, a zöld dió kifejlődésekor alkalmazható technika az ONFIT, mely során a növényi minta fagyasztását követően felderíthetővé válnak az esetleges látens kórokozók, ezáltal képet kapunk a betakarításkor várható fertőzöttségről és az ültetvény állapotáról (Michailides et al., 2000). Ezen módszerek továbbá hozzásegíthetnek a fertőzési utak feltárásához.

Ugyan a fő probléma a termések károsodása, nem mehetünk el a Botryosphaeriaceae és Diaporthaceae család fás szöveteket kolonizáló tulajdonsága mellett (Agustí-Brisach, et al., 2019). Hazánkban az ágak megbetegedése, rákosodása és elhalása nem öltött még súlyos mértéket a diófákon, a termések fogékonyabbnak és érzékenyebbnek tekinthetők ebből a szempontból (Zabiák et al., 2023). Kaliforniában azonban okoztak már jelentős veszteségeket ezen gombák ilyen módon (Chen et al., 2014). A kérdés pedig felvetődhet, hogy a fokozottan fertőzött termésekben található patogén gombák elterjedhetnek-e a fa más szöveteiben, ahogyan azt Moral és munkatársai (2019) is tapasztalták a dión. Ennek tanulmányozása lényeges lehet nem csak a dió kapcsán, hanem a kórokozók számára kedvező klimatikus viszonyok tekintetében is, mely akár új gazda-kórokozó kapcsolatokat is eredményezhet (Davis–Shaw, 2001).

A dió terméskárosodásában szerepet játszó gombafajokat tanulmányozó munkám során végzett kísérletek célja volt (1) a diófa különböző részeiben jelen lévő gombák kitenyésztése és a kórokozók meghatározása morfológiai és molekuláris biológiai markerek segítségével, (2) a kórokozó gombák optimális növekedési hőmérsékletének, (3) valamint a zöld diótermésekre és -ágakra gyakorolt patogenitásának tanulmányozása. A klímaváltozás potenciális következményeként fellépő új gazdanövény-kórokozó kapcsolatok feltárására (4) vizsgáltuk a patogén fajok fertőzőképességét almaágakon. Továbbá célul tűztük ki (5) a betegségben szerepet játszó nemzetségekbe tartozó törzsekkel szembeni kémiai és biológiai védekezési lehetőségek vizsgálatát és (6) az izolált gombatörzsek populációgenetikai tanulmányozását.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A dió (*Juglans regia* L.) tulajdonságai és élettani hatásai

A közönséges dió (*Juglans regia* L.) egy ősi növény, egyike a 25 gyümölcsfajnak, melyet már az új kőkorszakban is ismertek (Rapaics, 1940). Fő génközpontja Perzsia, de őshonosnak tekinthető Magyarországon is, mely egyike a Nyugat-Ázsiától húzódó szekunder géncentrumoknak (Vavilov, 1928). Dél- és Nyugat-Európában elterjedt növényfaj, a kontinensen megtalálható legészakibb előfordulási helye pedig Norvégia, ahol esetenként még termést is hozhat (Zahov, 1943).

Olyan évelő, egylaki, szél porozta héjas növény, amely változatos talaj- és éghajlatviszonyok között él a világon, így igen eltérő fenológiai jellemzőkkel rendelkezik. A különböző régiókban élő diófák termése, színe, héjvastagsága, bélállománya, lombkoronája, levélmérete, illetve alakja jelentősen eltér (Solar, 1990; Tomás, 1990; Balci et al., 2001; Draganescu et al., 2001; Rouskas–Zakynthinos, 2001; Caglarirmak, 2003).

A dió az élelmiszeripar számára fontos gazdasági szerepet tölt be. Termése az egész világon népszerűségnek örvend, frissen vagy feldolgozva is fogyasztásra kerülhet. A dió minőségét táplálkozási, egészségügyi és érzékszervi tulajdonságai határozzák meg. Kereskedelmi célból nagy mennyiségben termesztik Közép- és Dél-Európában, Észak-Afrikában, Kelet-Ázsiában, az USA-ban és Dél-Amerikában. Magyarország teljes területén termesztethető a növény, a Tiszahát pedig különösen jó környezeti feltételekkel rendelkezik. Mára számos nemesített és hibrid faj létezik (Szentiványi, 1980).

A diófa termése tápanyagforrásban gazdag, különösen a fehérjéket és az esszenciális zsírsavakat tekintve. A két fő, terméséért termesztett faj a fekete dió (*Juglans nigra*) és a közönséges dió (*Juglans regia*). A fekete dió kellemes ízű, azonban kemény héja és a nehéz bontása miatt nem termesztik kereskedelmi célra, így szinte kizárólag a közönséges dióval és hibridjeivel találkozhatunk a piacon (Boriss et al., 2006).

Számos egészségre gyakorolt kedvező hatása van, amelyek kémiai összetételének köszönhetők. Rendszeres fogyasztása hozzájárul a szívkoszorúér-betegségek kockázatának csökkentéséhez (Davis et al., 2007). Ezen felül kitűnő forrása az esszenciális zsírsavaknak és a tokoferoloknak (Amaral et al., 2003; 2004). A legjelentősebb zsírsava a linolsav, illetve tartalmaz oleinsavat, linolénsavat, palmitinsavat és sztearinsavat is (Ruggeri et al., 1998; Savage et al., 1999; Amaral et al., 2003). A benne található nagy mennyiségű többszörösen telítetlen zsírsavak az LDL-

koleszterinszint csökkentésével és a HDL-koleszterinszint növelésével hozzájárul az egészséges érhálózathoz (Tapsell et al., 2004; Davis et al., 2007). A diótermésnek további pozitív hatást kifejtő összetevői a növényi fehérjék, az étkezési rostok, a melatonin (Reiter et al., 2005), a növényi szterolok (Amaral et al., 2003), a folsav, a tanninok és a polifenolok (Anderson et al., 2001; Li et al., 2006). A kémiai összetétel, különösen az olaj- és a zsírsavtartalom, valamint a tokoferolok mennyisége szignifikánsan eltérőek a diófajták között és a különböző környezeti feltételek mellett termesztett egyedek között (Amaral et al., 2004).

2.2. A diótermesztés globális helyzete

A dió egy gazdaságilag fontos növény. 2021-ben világszinten 1,1 millió hektár területen művelték, a betakarított termésmennyiség pedig elérte a 3,5 millió tonnát. Ennek 31%-át Kínában termelték, 19%-át az Amerikai Egyesült Államokban, 10%-át pedig Európában, ahol Ukrajna a domináns diótermelő ország (**1. táblázat**) (FAOSTAT, 2021).

1. táblázat: A legjelentősebb diótermesztő országok termésmennyisége (ezer t)

Ország	2017	2018	2019	2020	2021
Kína	1000	850	1000	1100	1100
USA	571	616	594	717	658
Irán	394	304	321	357	387
Törökország	210	215	225	287	325
Mexikó	147	159	190	171	165
Ukrajna	109	127	125	113	115
Chile	100	152	125	140	148

Forrás: FAOSTAT, 2021

Az Európai Unió jelentős diótermelő országai közé tartozik Franciaország (26 850 ha) Görögország (16 200 ha) és Románia (2 400 ha) (FAOSTAT, 2021). Az elmúlt években több tagállamban nőtt a betakarított termésmennyiség, különösen Görögországban, ahol a 2020-as évről 2021-re majdnem megduplázódott ez az érték, mely tendencia az exportban is megmutatkozott. A Magyarországon betakarított héjas dió mennyisége stagnál az elmúlt években, az exportja pedig ötödére csökkent 2017 óta (**2. táblázat**).

2. táblázat: Az EU jelentős diótermelő országainak és Magyarország termésmennyisége (ezer tonna)

Ország	2017	2018	2019	2020	2021
Franciaország	33	38	35	36	38
Románia	46	54	50	48	54
Görögország	36	32	31	36	63
Magyarország	8	6	7	5	6

Forrás: FAOSTAT, 2021

A dió Magyarországon igen kedvelt, a legnagyobb arányban termesztett héjas. Az alma és a meggy után a harmadik legnagyobb területen művelt gyümölcs, és az utóbbi években növekedés volt tapasztalható a telepítések tekintetében. A két leggyakrabban termesztett nemesített fajtája a 'Milotai 10' és az 'Alsószentiváni 117' (KSH, 2017; KSH, 2021).

2021-ben 6000 tonna termést takarítottak be a termesztők az országban (**2. táblázat**). A héjas dió exportja az utóbbi években jelentős csökkenést mutat, 2019-es évről 2020-ra harmadára, 470 tonnára csökkent a mennyisége. A dióbél behozatala jelentősen kisebb mennyiségű, azonban folyamatos növekedés tapasztalható. 2017-ben 4 tonna volt a termés importja, mely 2021-re 54 tonnára növekedett (FAOSTAT, 2021).

2.3. A dió környezeti igénye

A dió változatos környezeti feltételekkel rendelkező területekre telepíthető, és természetes terjedése által széles körben meg is található. Azonban a jó minőségű termésekhez és megfelelő hozamhoz a növénynek meghatározott igényei vannak, melyek fokozottabbak más gyümölcsfajokéhoz képest. Magyarországon a legjobb teljesítményű fák neveléséhez a legalkalmasabb feltételek a Tiszaháton adóttak, amit Dél-Dunántúl és a szárazabb adottságokkal rendelkező Duna-Tisza-köze követ (Szentiványi, 1978).

A hőmérsékletet tekintve jól tolerálja a szélsőségeket: -30 °C-os minimum hőmérséklettel rendelkező helyeken túlél károsodás nélkül, amennyiben a fa megfelelően táplált (Palocsay et al., 1957). Érzékenyebb fajtának tekinthető fagysérülésre való hajlama miatt a kaliforniai 'Pedro' (Ughini–Roversi, 1990). A

nyugalmi időszak elején bekövetkező hőmérsékletesés különösen káros lehet (Sibbet et al., 1998).

A környezeti feltételek kardinális pontja a késő tavaszi fagyok előfordulása, amely akár súlyos ágakárosodást okozhat, ezen felül a fakadásnak indult rügyek fagykárt szenvedhetnek. Ebből a szempontból előnyösebbnek tekinthetők a magasabb fekvésű termőhelyek, elkerülendők a fagyzugok (Szentiványi et al., 1978). Hőmérséklet szempontjából alkalmas telepítési helyek a domboldalak nyugati és déli lejtői, ahol a diófa magas vízigényét azonban nehéz kielégíteni, így a folyók menti telepítést javasolt előnyben részesíteni (Mohácsy–Porpáczy, 1951).

A hűvös nyarak negatívan befolyásolják a termés minőségét, a héj elvékonyodását, valamint termés- és hajtásméret csökkenést okoznak. A túl magas nyári hőmérséklet szintén romboló hatású, a 35 °C feletti száraz környezeti körülmények a terméseket és az ágakat is károsíthatják (Szentiványi–Kállay, 2006).

A Felső-Tisza környéke bő vízellátottsága miatt is alkalmas diótermesztésre, ugyanis ezen a területen található laza talaj biztosítja a gyökerek levegővel ellátását, a gyorsan lefolyó víz magasabb oxigén-tartalma pedig szintén kedvező hatást gyakorol a növényre. A diófa évi vízszükséglete 800-1000 mm. Ez a csapadékösszeg hazánkban nem biztosított, emiatt alkalmasak telepítésre az árterek, ahol a gyökérrothadás elkerülhető, amennyiben az ár rövid időn belül elvonul (Szentiványi–Kállay, 2006).

A nyár eleji vízhiány meghatározza a jövő évben szerepet játszó termőrügyek kifejlődését, valamint a dió méretét, ami ebben az időszakban realizálódik a dióhéj kifejlődése által. A száraz időjárás hatására romlik a termések minősége a méretcsökkenés következtében, valamint hatással van rügydifferenciálódásra is, és deformációt is okozhat. A nyár második felében fellépő vízhiány csökkenti a bélarányt, rontja a bél minőségét és a fa általános állapotát. A szüret idejének közeledtével csökken a csapadék fontossága, de a zöld burok repedéséhez szükséges egy minimális vízmennyiség, akár a harmat által (Porpáczy, 1962).

A diót a világon széles körben, igen eltérő klimatikus tényezők mellett termesztik. A mérsékelt övezet északi részén a fagyok, míg a mediterrán térségekben a szárazság jelent veszélyt a növény számára. Ennek megfelelően a különböző földrajzi helyek sajátos időjárási jellemzői alapján fajtakörök alakultak ki, melyek környezeti igényeikben és fiziológiai tulajdonságaikban térnek el. Ez alapján megkülönböztetünk Kárpáti, Francia, Mandzsúriai, Perzsa és Kaliforniai csoportokat. Kulcsfontosságú

tulajdonságok közé tartozik a kiváló minőségen felül a télállóság, a szárazságtűrés és a megfelelően időzített fakadási idő (Szentiványi, 1976).

Az alkalmazkodóképesség és a termésmennyiség maximalizálása érdekében különböző fajtákat hoztak létre a fajtakörökön belül. Korábban próbáltak külföldi bőtermő fajtákat adaptálni hazánkban, azonban bebizonyosodott, hogy nem képesek alkalmazkodni az itteni termőhelyi viszonyokhoz, így elvesztették pozitív tulajdonságaikat (Szentiványi, 1976).

A Magyarországon termesztett fajták nagy része Dr. Szentiványi Péter munkájához fűződik, aki az 1990-es évekre módszeres szelekcióval rendkívül jó tulajdonságokkal rendelkező hibrideket hozott létre. A dió értékét a termés mennyisége és minősége, a betegségekkel szembeni ellenállóság, a magbél aránya, a termőhely tulajdonságainak toleranciája, a fakadási idő és az oldalrügyön való terméshozás készsége határozza meg (Brózik–Kállayné, 2001).

2.4. A dióültetvények növényvédelme

A dióültetvények növényvédelmi technológiáját a kémiai hatóanyagú szerek alkalmazása jellemzi. A közelmúltban engedélyeztek kártevők ellen hatékony növényi kivonatot is (Combi-protec), melyet azonban segédanyagként ajánlott kijuttatni (Nébih, 2023).

A vegyszeres fungicidek alkalmazása napjainkban elkerülhetetlennek tekinthető a dióültetvényekben a kórokozók elleni védekezésben. Fontos azonban szem előtt tartani az egyoldalú szerhasználat negatív hatásait, amely nem csak a kultúrát érintheti, hanem a környezetet is (Radócz, 2010). A dió kiemelten veszélyeztetett ebből a szempontból, mivel az engedélyezett gombaölő szerek kínálata igen korlátozott. A Nébih által közétett listán jelenleg réz alapú, valamint tebukonazol hatóanyagú szerek szerepelnek. Az egyetlen biokontroll lehetőségként a *Bacillus subtilis* antagonista baktériumot tartalmazó Serenade Aso választható (Nébih, 2023).

Különböző típusú védekezési módszerek együttes alkalmazása csökkentheti a vegyszeres kezelések kijuttatási mennyiségét és gyakoriságát, mely az EU-ban is jobb értékesítési lehetőséget biztosíthat a diónak (Mónus, 2002; Szabó, 2004). Cél tehát a jó minőségű termékek gazdaságos termesztése az ökológiai szempontok figyelembevételével (Radócz, 2002).

A gombás megbetegedések elleni hatékony védekezéshez elkerülhetetlenek az ismétlődő kezelések, amelyekhez azonban minden esetben megfigyelések és vizsgálatok

szükségesek (Eke, 1997). A dió integrált növényvédelmének egyik fontos eleme a Monitoring Rendszer. Ennek keretein belül fel kell mérni a növény fenológiai fázisaiban fennálló környezeti körülményeket, beleértve az időjárást és a kórokozók jelenlétét. Ezzel a módszerrel előrejelezhetők az esetleges fertőzések, ami lehetővé teszi a növényvédelmi kezelések megfelelő időzítését (Iváncsics, 2002). A kémiai védekezés során fontos a permetezés körülmények kivitelezése megfelelően karbantartott és beállított permetezőgéppel a permetlé veszteség és a sodródás elkerülése érdekében (Mónus, 2002; Radócz, 2002). Az integrált szemlélet teljekörű alkalmazásához fontos továbbá a szakmai ismeret és a szaktudás folyamatos frissítése (Radócz, 2010).

Az ültetvény telepítése során sokat tehetünk a megelőzés érdekében, ha a kórokozókra kevésbé érzékeny fajtákat választunk. Ezen felül a környezeti igények alkalmassága elősegíti a növény védekezési rendszerének hatékony működését, ami ellenállóbbá teszi a fertőzésekkel szemben (Mónus, 2002). A faiskolai állomány állapota is döntő lehet a későbbi betegségek elterjedésében. A telepítés során törekedni kell a megfelelő tőtávolságra és a lombkoronák kialakítására az alatta megrekedő páratartalom, és az ezt követő kórokozó felszaporodás elkerülése érdekében (Radócz, 2002).

Az öntözés olykor elkerülhetetlen a megfelelő termőhely kiválasztása ellenére is. A rendszer kialakítása során javasolt a csepegtető szerkezetek alkalmazása, ami az esőztető technológiával szemben nem segíti a patogén szervezetek terjedését (Moral et al., 2019).

A metszés által létrejött fertőzési kapuk lezárására fizikai megoldásként alkalmazhatók a sebkezelő anyagok. Fontos a fertőzött növényi részek és a betakarítás után a fán maradt termések eltávolítása és megsemmisítése (Petesné, 2008).

2.5. A dió növényvédelmi problémái

A dió termésének épségét az időjárási tényezők, a rovarok és a mikrobák egyaránt befolyásolhatják. A vegetációs időszakban bekövetkező hosszabb ideig tartó vízhiány a dióbél aszalódását eredményezheti. A késő tavaszi fagyok a megtermékenyülés során okozhatnak gondot a generatív szervek fagyérzékenysége miatt, ami a dió papírhéjúsághoz vezet, üregesedéssel, vagy akár a bél eltűnésével kiegészülve (Holb, 2002).

A diótermesztést világszerte veszélyeztetik a rovarok és a különböző kórokozók világszerte. A gyűrűsfoltosság (cherry leaf roll nepovirus) a termést is károsítja, mely

következtében a dióhéj elvékonyodása és betöredezése tapasztalható, ami a magbél összeaszalódását vonja magával. A baktériumok közül a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* vált ki súlyos tüneteket. Különösen a diófák fiatal növényi részeit támadja meg, melyet követően a burkon és a magbélén barna foltok jelennek meg (Holb, 2002). A baktérium szerepet játszik továbbá a barna csúcsi elhalás kialakulásában is, mely során a zöld dió felső részén barna színváltozás jelenik meg, majd a fejlődő fázisban lévő belet is megtámadhatja és a zöld dió lehullását eredményezheti. A tüneteket azonban nemcsak a baktérium, hanem gombák is kiválthatják, például az *Alternaria* és *Fusarium* nemzetség tagjai (Belisario et al., 1999; Belisario et al., 2004).

A dió antraknózisa általánosan elterjedt kór világszerte, melyet az *Ophiognomonia leptostyla* és a *Colletotrichum godetiae* gombafajok váltanak ki. A diótermést tekintve csak a burkon okoz tüneteket barna foltok formájában, amelyek egyre nagyobbá, szürkévé, és rothadóvá válnak. A betegség kihat a bél minőségére is és idő előtti gyümölcshullást eredményezhet (Holb, 2002; Varjas et al., 2021).

2.6. A gombák jellemzése, szerepük a növényvilágban

A gombák (Fungi) genetikailag elkülönülő, kisméretű, általában mikroszkopikus, hifákkal rendelkező, spórát képző eukarióta szervezetek. Sejtfaik vázszerkezete kitint és glükánokat tartalmaz, melyek poliszacharidok és glikoproteinek közé ágyazódik be (Agrios, 2005).

A legtöbb gomba minden irányba elágazó fonalas vegetatív testszerveződéssel, hifákból álló micéliumokkal rendelkezik, melyek csúcsi (apikális) növekedésre képesek. A hifák általában 2-10 µm vastagságúak, habár egyes gombáknál 100 µm-t meghaladó méretű is megfigyelhető, hosszúságuk pedig néhány µm-től több méterig terjedhet. A gombák elsősorban ivaros vagy ivartalan módon képződő spórákkal szaporodnak (Agrios, 2005).

A legtöbb gomba túlélése és szaporodása nagymértékben függ a hőmérséklettől és a csapadéktól, illetve a környezetükben lévő víz jelenlététől. A micéliumok csak bizonyos hőmérséklet-tartományban (-5 és 45 °C között), valamint megfelelő nedvesség mellett képesek növekedni. A legtöbb spóra a kedvezőtlenebb környezeti hatásoknak is ellenáll, így alacsony, téli hőmérséklet mellett, illetve forró, száraz nyári időszakokban is túlélnek, azonban a csírázás optimális hőmérsékletet és nedvességet igényel (Agrios, 2005).

A fonalas gombák nagyobb gazdasági károkat okoznak a növénytermesztés területén, mint bármelyik másik mikrobacsoport (Birren et al., 2003). A növények és a kórokozó gombák kölcsönhatásainak kialakulása 400 millió évre nyúlik vissza (Taylor et al., 1992), ez az idő pedig rengeteg patogén faj létrejöttét és betegség kialakulását tette lehetővé. Körülbelül 10.000 gombafaj okozhat növényi betegségeket. Észak-Amerikában 8000 gombafaj okoz közel 100.000 betegséget. Csupán 50 faj köthető közülük humán megbetegedésekhez, és körülbelül ugyanennyi fertőző állatot (Agrios, 2005). Ennek valószínűsíthetően az az oka, hogy a növények az evolúció során az állatok előtt fejlődtek ki, így a növények és gombák közötti kölcsönhatások jóval hamarabb létrejöttek, tehát több idő állt rendelkezésre az interakciók fejlődésére és terjedésére (Berbee–Taylor, 2007). A növények által kialakított védekezési válaszok is tovább növelték a gombák növényekre mért patogenitási mechanizmusainak összetettségét, aminek köszönhetően morfológiai szempontból igen speciális fertőző struktúrák fejlődtek ki (Mendgen–Deising, 1993; Mendgen et al., 1996). A fertőzés biokémiáját vizsgálva arra jöttek rá a kutatók, hogy a szekunder metabolitok a fertőzés különböző fázisaiban hatnak a gazdanövényre (Friesen et al., 2008; Bräse et al., 2009; Daub–Chung, 2009).

Az utóbbi három évtizedben az endofita gombák jelentősége egyre nagyobb teret nyert, melyet jól mutat a kutatásokban és szakirodalomban történő gyakori említésük. Elsőként Anton de Bary (1866) írta le az endofita kifejezést, mely alatt a növényi szövetekben élő szervezeteket értette. A legtagabb definíció szerint az endofita gombák olyan mikrobák, amelyek élő szervezetben telepednek meg anélkül, hogy azonnali negatív hatást fejtenének ki (Hirsch–Kapulnik, 1998). Ez a meghatározás gyakorlatilag a szimbióta kölcsönhatások teljes spektrumát magába foglalja, amelyekben a gombák és a növények részt vehetnek: parazitizmus, kommenzalizmus és mutualizmus. Az endofitaként nyilvántartott gombák közül számos fajt másodlagos kórokozóknak tekintenek. A patogén gombák, melyek képesek tünetmentesen kolonizálni a gazdaszervezetet (Selosse et al., 2004), és a csökkent virulenciával rendelkező törzsek is endofitának tekinthetők (Schardl–An, 1993). Gyakran előfordulnak egészséges és beteg szövetekben egyaránt, melyből adódóan fontos kiemelni az endofiták, a fakultatív kórokozók és a látens kórokozók közötti határok bizonytalanságát. Kutatók megfigyelték továbbá, hogy ezen gombák növekedésére és szaporodására jellemző egy elhúzódó nyugalmi időszak, amely újraindul a gazdaszervezetet ért fizikai vagy érési folyamatok hatására (Stepniewska–Kuzniar, 2013; Zuccaro et al., 2014).

2.7. A növény kórokozó gombák fertőzése

A gombák számos módon képesek a növények kolonizálására, és ezek a kölcsönhatások széles skálán mozognak a jótékony kölcsönhatásoktól a gazdanövény elhalásáig. A növényi kórokozók tekintetében valószínűleg a gombák jelentik az ökológiailag és gazdaságilag releváns veszélyforrások legváltozatosabb csoportját. Ezek a gomba fajok elsősorban az Ascomycota és a Basidiomycota törzsekben találhatók (Doehlemann et al., 2017).

A gombás fertőzések változatos tüneteket válthatnak ki, mely szoros kapcsolatban áll a növekedéshez és szaporodáshoz szükséges táplálkozási módjukkal, mely alapján három csoportra osztják őket. A nekrotróf szervezetek az előzetesen elpusztított sejtekből szerzik meg a tápanyagokat, mely során fitotoxikus vegyületeket és sejtfalbontó enzimeket termelnek. Ezzel szemben a biotróf kórokozók célja a kolonizált növény életképességének fenntartása és az abból származó tápanyagok felhasználása (Mendgen–Hahn, 2002). A harmadik csoport, a hemibiotrófok eleinte biotróf fázist mutatnak, amit nekrotróf táplálkozási mód követ. A biotróf és a nekrotróf fázis időtartama jelentősen eltér a hemibiotrófok között.

A biotróf kórokozókhoz képest a nekrotróf kórokozók csoportja a nemzetségek és fajok sokkal szélesebb körét foglalja magában. A nekrotróf szervezeteket szűk és széles gazdatartományú fajokra lehet osztani (Mengiste, 2012).

A gazdaspecifikus nekrotrófok gazdaszervezet-specifikus toxinokat termelnek, és ezek határozzák meg a patogenitásukat (Wolpert et al., 2002). A virulenciájukat a gazdanövény immunválasza befolyásolja. A nekrotróf fertőzések kezdetén különböző másodlagos metabolitok, antimikrobiális peptidek és hormonok halmozódnak fel. Ezen felül sejtfalmódosításáért felelős vegyületek is képződnek (Mengiste, 2012). A széles gazdanövény körrel rendelkező nekrotrófokból hiányoznak a gazdaszervezet-specifikus toxinok, és számos, akár 200-400 növényfajt megtámadhatnak (Amselem et al., 2011). A szkleróciumok központi szerepet játszanak egyes nekrotróf gombák életciklusában, mivel innen indul az apotéciumok képződése, amelyekből askospórák szabadulnak fel. A gazdaspecifikus nekrotrófok elleni védelem biztosításához elegendőek az öröklött rezisztencia-tulajdonságok is, a széles gazdaspektrumú nekrotróf kórokozókkal szembeni rezisztencia genetikai alapja azonban sokkal összetettebb (Oliver–Solomon, 2010).

A növényi kórokozó gombák fertőzési ciklusa kedvező körülmények esetén veszi kezdetét spóracsírázással és csíracso képződéssel. Ekkor a hifák polarizált sejtnövekedést mutatnak, és a gazdanövény felszínén nőnek (Ebbale, 2007). Különböző kémiai és fizikai körülmények befolyásolják a folyamatot, például receptorok és fehérjék, melyek nélkülözhetetlenek appressórium kialakulásához (Talbot, 2003). Az appressóriumok akár 0,8 Mpa nagyságú nyomást fejtenek ki a növények felületére, mely következtében a kutikula réteg felszakad, a kórokozó pedig bejut a gazdanövénybe (Howard et al., 1991). A penetráció megtörténhet továbbá hifával is, mely során a képlet csúcsa megduzzad. A folyamatot lítikus enzimek segítik (Gourgues et al., 2004). A gombák egyes csoportjai képesek a növények természetes nyílásán keresztül behatolni (Maheshwari–Hildebrandt, 1967).

A növények fejlett immunrendszerrel rendelkeznek, ami segít a kórokozókkal szembeni védekezésben. A növényi sejtmembránon lokalizált receptorok felismerik a kórokozókra jellemző molekuláris mintázatokat. Ezek váltják ki az alaprezisztencia választ is, beleértve az oxidatív stresszt, a növényi hormonok szintézisét és a kallóz lerakódást (Nicaise et al., 2009; Zipfel, 2014; Lo Presti et al., 2015). A kórokozó gombák erre reagálva egy második támadási hullámot indítanak szekretált effektor fehérjék kijuttatásával. Ha a gazdanövény felismeri az effektorokat, az effektor által kiváltott érzékenységhez vagy az alaprezisztencia agresszív formájához vezethet, amelyet effektor által kiváltott immunitásnak nevezünk (Jones–Dangl, 2006). A nekrotróf gombák képesek kihasználni a növények immunválaszát és a saját növekedésükre és fejlődésükre fordítják azt (Haueisen et al., 2018).

2.8. A növénypatogén gombák túlélési stratégiái

A növényi betegségek vizsgálata során fontos meghatározni a kórokozó szezonok közötti túlélési módját. Ez az ismeret felfedheti a betegség ciklusának csúcspontját is, így lehetőség nyílik eredményes növényvédelmi kezelést alkalmazni. Az élő növények kórokozói állandóan jelen lehetnek szövetekben vagy azok felületén, de nem feltétlenül aktívan. Ha a kórokozó nem rendelkezik olyan mechanizmusokkal, amelyek lehetővé teszik a kedvezőtlen környezetben történő életben maradást, a betegség körforgása megszakad és a kórokozó elpusztul (Brown, 1997).

A gombák egyik túlélési stratégiája a spóraképzés, melyek rendkívül nagy távolságokra képesek eljutni a széllel, rovarokkal, vagy szaporítóanyagokkal. Ez lehetővé teszi a faj számára, hogy fenntartsa vagy kiterjessze földrajzi elterjedését, új

gazdanövényekkel kerüljön kapcsolatba, és megőrizze vagy növelje genetikai változatosságát (Brown, 1997).

A legtöbb növényi kórokozó csak a gazdanövények ismételt újrafertőzésével képes életben maradni. Ezt a folyamatot fertőzési láncnak nevezzük. Ha a kórokozó megszakítás nélkül fertőzi a fogékony növényeket folyamatosan a fertőzési lánc. A parazita ebben az esetben túlél ugyanazon, vagy a fő gazdanövénytől eltérő faj folyamatos megfertőzésével. Az ilyen növényeket alternatív gazdáknak nevezik, és gyakran rokonságban állnak a fő gazdanövény fajokkal. Ha az alternatív gazda nem mutat tüneteket, akkor kórhordozónak nevezzük. A patogén gomba nem alkot nyugvó struktúrákat, és nem él szaprofita vagy epifita módon a növények felületén. A túlélésük tehát a fogékony gazdanövények jelenlététől függ (Brown, 1997).

Amennyiben a betegség ciklusát epifita, szaprofita, vagy nyugalmi fázis szakítja meg, megszakadt fertőzési láncról beszélünk. Számos kórokozó él gazdanövényeik és más növények felszínén nem elősködő kapcsolatban, epifitaként, majd amikor a fertőzési ciklus ismét a megfelelő fenológiai stádiumba érkezik, ismét kórokozóként lépnek fel (Brown, 1997).

Számos növénypatogén gomba szaprofitaként marad életben a beteg növényi törmelékeken vagy a talajban, például pszeudotéciumokban, melyek tavasszal aszkospórákat termelnek, és elindítják a betegség ciklusát az új szezonban (Brown, 1997).

A gombák megfelelő gazdanövények hiányában vagy kedvezőtlen környezet esetén képesek olyan nyugalmi struktúrákat képezni, amelyek lehetővé teszik számukra a túlélést, gyakran hosszú időn keresztül. Az oospórák, teliospórák és klamidospórák hosszú évekig életképesek maradnak. Számos gombafaj szkleróciumot termel, amelyek a talajban vagy a fertőzött növényi részeken fajtól függően akár évekig képesek túlélni. A gombák által alkotott egyéb nyugalmi struktúrák közé tartoznak az ivaros termőtestek, mint például a kleisztotécium, a peritécium és a pszeudotécium (Brown, 1997).

2.9. A globális éghajlatváltozás hatása a növényekre és a dióra

Az éghajlat a növényfajok földrajzi elterjedését meghatározó fő tényező (Hickler et al., 2012). A klímaváltozás olyan, az egész világot érintő szélsőséges időjárási viszonyokkal jár, mint például megnövekedett hőmérséklet, hirtelen lehulló nagymennyiségű csapadék, aszály, hurrikán és áradások (Costello et al., 2009). A

jelenség nem csak a ritka és a kevés földrajzi helyen előforduló fajokat fenyegeti (Walas et al., 2019), hanem széles körben elterjedt csoportokat is veszélyeztethet (Thurm et al., 2018). A levegő emelkedett CO₂ szintje hozzájárul a növényi szervezetek gyorsabb növekedéséhez (Kozłowski–Pallardy, 1997) és a szárazságtűrésükhöz (Lindner et al. 2014), azonban csökkentheti az élettartamukat (Büntgen et al., 2019). Egyes modellek szerint a közönséges dió klimatikus optimuma egyre északabbra tolódik el az óceáni éghajlat mérsékelt éghajlattá változása miatt, mely veszélyeztetheti a dél-európai dióültetvényeket az értékes genetikai forrásokat is beleértve (Büntgen et al., 2019; Paž–Dyderska et al., 2021).

A megváltozott környezet miatt a növények olyan új kórokozókkal kerülhetnek kapcsolatba, amelyeknek korábban soha nem voltak kitéve. Ez azt jelenti, hogy a fertőzések új gazdanövényekhez adaptálódhatnak és új földrajzi területekre terjedhetnek (Valent, 1990; Davis–Shaw, 2001; Hoberg–Brooks, 2015). Néhány megváltozott környezeti tényező, mint például a magasabb páratartalom, kedvező feltételeket teremthet a gombák számára, növelve a betegségek kialakulásának kockázatát. (Huber–Gillespie, 1992). A kórokozók nagyobb valószínűséggel telelhetnek át a hőmérséklet emelkedése miatt, ami növényvédelmi problémákat vetít előre a nyugalmi időszak után (Coakley et al., 1999). A kutatók már évtizedekkel ezelőtt megállapították, hogy egyes gombák a melegebb években súlyosabb tüneteket okoznak (Brasier, 1996). A növényi betegségek jelenleg is komoly veszteségeket okoznak, és a globális élelmiszertermelés 10-16%-át érintik (Chakraborty–Newton, 2011).

Kutatók szerint a következő öt évtizedben a hozamnövekedést célzó intézkedéseket ellensúlyozni fogják a klímaváltozás következtében megjelenő ismert és újonnan megjelenő kórokozók által kiváltott betegségek (Chaloner et al., 2021). A kórokozó gombák gyakran a növényt érő stressz következtében kezdenek el oly módon szaporodni a korábban kolonizált gazdaszervezetben, hogy tünetet is kiváltsanak (Perez et al., 2010), a klimatikus viszonyok változása pedig megfelelő alkalmat szolgálhat számukra (Desprez-Loustau et al., 2006). A fertőzés sikerességét elősegítheti továbbá a módosult környezeti paraméterek okozta növényi immunválasz-csökkenés is (Saijo–Loo, 2020).

2.10. A Botryosphaeriaceae család bemutatása

A Botryosphaeriaceae család tagjai közül elsőként az 1820-as években írták le a *Sphaeria* nemzetséget (Crous et al., 2006; Schoch et al., 2006). A *Botryosphaeria*

fitopatogén nemzetséget 1863-ban hozták létre. Már ekkor megfigyelték, hogy szaprofita életmódot folytatnak a fás szárú növények elhalt szöveteiben. Későbbi tanulmányokban egyre inkább erre a nemzetségre összpontosítottak, különösen a mezőgazdaságban betöltött szerepüket tekintve (Bega et al., 1978; Brown–Britton, 1986; von Arx, 1987; Michailides, 1991).

A *Botryosphaeria* nemzetséghez több mint 20 faj tartozik, melyek közül a leggyakoribbak a *Botryodiplodia*, a *Diplodia*, a *Dothiorella*, a *Fusicoccum*, a *Lasiodiplodia*, a *Macrophoma* és a *Sphaeropsis* nemzetségbe tartozó fajok (Denman et al., 2000). A Botryosphaeriaceae család nemzetségeinek többségét endofitonként írták le, mint például a *Guignardia*, a *Botryosphaeria*, a *Dothidotthia*, a *Neofusicoccum*, a *Pseudofusicoccum*, a *Lasiodiplodia* és a *Diplodia* nemzetséget (Crous et al., 2006).

A morfológiai azonosítás sok esetben elegendő, ám ezek a vizsgálatok bizonyos esetekben nem tükrözik a fajok valós változatosságát (Taylor et al., 2000). A *Botryosphaeria* nemzetség leírásához az 1950-es évekig az aszkospórák általános morfológiáját tartották taxonómiaiilag és filogenetikailag informatívnak. Ezek a jellemzők azonban később fajon belüli eltéréseket mutattak (Denman et al., 2000).

A Botryosphaeriaceae családot filogenetikailag taxonómiai összetettsége miatt zavar övezte, ám a DNS-alapú molekuláris biológiai technikák hatékony eszközként szolgálnak a fajok azonosítására és jellemzésére. Ezen módszereket alkalmazó tanulmányok rávilágítottak arra, hogy egyes gazdanövények esetén jóval nagyobb a fajok sokfélesége, mint gondolták. Az elmúlt években egyre gyakrabban vizsgálnak különböző DNS-alapú molekuláris adatokat, különösen a DNS szekvencia adatokat a taxonok megkülönböztetésére a Botryosphaeriaceae család tagjainak vizsgálatára. Ezt követően a DNS-szekvenciák közötti különbségeket sikeresen kombinálták a morfológiai jellemzőkkel (Smith et al., 2001; Denman et al., 2003; Phillips et al., 2005).

A legtöbb Botryosphaeriaceae családon végzett DNS-szekvencia-különbségeket tanulmányozó taxonómiai vizsgálat során a riboszómális DNS régió (rDNS) „internal transcribed spacer” (ITS) szekvenciáit vizsgálják, de csak ennek az egy szakasznak a tanulmányozása elfedheti a fajok valódi sokféleségét a szorosan kapcsolódó, vagy még le nem írt fajok között. Ennek kiküszöbölésére többszörös génszekvencia-vizsgálatokat alkalmaznak, leggyakrabban pedig a transzlációs elongációs faktor (*tef1*) és az ITS nukleotidsorrendjének elemzését kombinálják (de Wet et al., 2003; Slippers et al., 2004; Burgess et al., 2005; Phillips et al., 2005).

2.11. A Botryosphaeriaceae család patogenitása

A Botryosphaeriaceae családba tartozó fajok okozta megbetegedések gyakran akkor következnek be, ha a növényeket valamilyen stresszhatás éri, például ha nem optimálisak a környezeti körülmények (Stanosz et al. 2001). Ilyen fellépő stresszhelyzet leggyakrabban a szárazság, de előfordulhat fizikai károsodás, illetve olyan negatív biológiai folyamatok, amelyeket kórokozók, rovarok, fagy, hó, továbbá a nem megfelelő helyre történő telepítés válthat ki (Schoeneweiss, 1981; Ma et al., 2001; Moral et al., 2019).

A Botryosphaeriaceae gombák által okozott betegségek tünetei gyorsan terjedhetnek, és jelentős veszteségeket okozhatnak nagyobb területeken. A klímaváltozással kapcsolatos modellek már évtizedekkel ezelőtt megjósoltak olyan szélsőséges időjárási körülményeket, mint a kiszámíthatatlan felhőszakadások, valamint rendkívüli alacsony vagy magas hőmérséklet (Coakley et al., 1999). Ezek a tényezők kiegészülve a kórokozók és kártevők egyre szélesebb földrajzi elterjedésével járó biológiai nyomással nagymértékben elősegíti Botryosphaeriaceae gombák okozta betegségek egyre szélesebb körű elterjedését (Desprez-Loustau et al., 2006). Ezek miatt kritikus fontosságú az ökológiai szerepük, a patogenitásuk, a diverzitásuk, és a gazda-kórokozó-környezet kölcsönhatásának megértése annak érdekében, hogy meg lehessen határozni és kezelni tudjuk a felmerülő növényvédelmi problémákat.

A mezőgazdasági területeken a fás szárú növények gyakran bőséges Botryosphaeriaceae közösséggel rendelkeznek (Burgess et al., 2006; Smith et al., 1996a; Smith et al., 1996b). Korábban a családba tartozó nemzetségek kevésbé voltak képesek megfertőzni az őshonos növényeket, mint a betelepítetteket (Fisher et al., 1993; Slippers et al., 2004). Néhány alaposan vizsgált fajról pedig molekuláris eszközök alkalmazásával megerősítették azt a tényt, hogy számos gazdaszervezetet képes megfertőzni. Így jellemezhetők a *Botryosphaeria dothidea*, a *Botryosphaeria obtusa*, a *Botryosphaeria parva*, és a *Botryosphaeria australis* fajok. Ezzel szemben egyes gombák csak bizonyos gazdanövényeket vagy meghatározott növény családot kolonizálnak, mint a *Diplodia pinea* és a *Diplodia scrobiculata*, melyek a *Pinus* nemzetség tagjaiban és alkalmanként más tűlevelűekben élnek. A *Neofusicoccum eucalyptorum* és a *Neofusicoccum eucalypticola* az *Eucalyptus* nemzetség fajait képesek fertőzni, míg a *Saccharata protea* és *Neofusicoccum protearum* fajok a *Proteaceae*

családra jelenthetnek veszélyt (Swart et al., 2000; Smith et al., 2001; Denman et al., 2003; Slippers et al., 2004; Burgess et al., 2005).

A Botryosphaeriaceae kórokozókra vonatkozóan azt figyelték meg, hogy azok a legártalmasabb fajok, amelyek több gazdaszervezetet képesek kolonizálni, illetve földrajzilag széles körben előfordulnak. Ilyen faj a *Botryosphaeria rhodina*, a *Neofusicoccum parvum*, a *Botryosphaeria australis*, a *Botryodiplodia pinea*, a *Botryosphaeria dothidea*, és a *Botryosphaeria obtusa*. Gyakran ezek a széles gazdanövénykörrel és kiterjedt földrajzi tartományban előforduló fajok a legpatogénebbek (Pavlic et al., 2004; van Niekerk et al., 2004). Kutatók megfigyelték, hogy hiába van számos gazdanövénye egyes fajoknak, mégsem okoznak fertőzést minden területen. Például a *B. dothidea* faj gyümölcs- és diófélékben komoly betegségeket okoz az Egyesült Államokban, ám egyáltalán nem, vagy csak ritkán fordul elő ezekben a gazdaszervezetekben Dél-Afrikában és más régiókban (Michailides, 1991; Pavlic et al., 2004; Slippers et al., 2004).

A gyümölcsök Botryosphaeriaceae család fajaival történő fertőződése gyakori, mely a termések rothadásához vezet röviddel a betakarítás előtt vagy után, ami jelentős veszteségeket okoz (Johnson et al., 1992; Kim et al., 2001, 2004). Mint más növényi részek, a termések is a természetes nyílásaikon keresztül fertőződnek meg, továbbá a gyümölcsök felszínén is megjelenhetnek appresszóriumok (Kim et al., 1999). A gombák a gyümölcsöket már a korai fejlődési szakaszukban megfertőzhetik, de a betegség tünetei gyakran a cukorszint emelkedését követően, az érés vagy a tárolás során jelennek meg (Johnson et al., 1992; Parker–Sutton, 1993).

A Botryosphaeriaceae fajok diófában lezajló fertőzési ciklusát a növény élő jellege és az éghajlat határozza meg. A gomba család tagjai a 2000-es években mediterrán éghajlatú területeken okoztak problémát héjas ültetvényekben. Az ivartalan spórák (piknídiumban keletkező konídiumok) a fő inokulum források, az ivaros spóráknak (aszkuszban létrejövő aszkospóráknak) korlátozott szerepük van a fertőzési ciklusban (Michailides–Morgan, 2004; Inderbitzin et al., 2010). A Botryosphaeriaceae fajoknak van egy szaprofita fázisa, amikor a fa kérgében, valamint a talaj felszínére hullott növényi szövetekben telepednek meg (Michailides et al., 2018).

A *B. dothidea* faj almatermés megbetegítésére vonatkozó részletes tanulmányosorozat a Botryosphaeriaceae fertőzések biokémiai vonatkozásait is taglalja (Kim et al., 1999, 2001, 2004). Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy a fertőzés során a *B. dothidea* hifájában mikrotestek és lipid gömbök alakulnak ki. Ezeket a képleteket

glioxiszómákként definiálták, amelyek lehetővé teszik a gomba számára, hogy elviselje a tápanyaghiányt és a gazdanövény védekező mechanizmusait a látens időszakokban és kedvezőtlen körülmények között.

A *Botryosphaeriaceae* család tagjai által okozott fertőzéseknek a kémiai szerekekkel történő gátlása rendkívül nehéz vagy lehetetlen a területek kiterjedtsége vagy a gazdaszervezet adottságai miatt, környezeti szempontból pedig az ilyen kezelések aggályosak lehetnek. A gyümölcsösökben a fák beteg részeinek eltávolítása vagy kezelése ajánlatos prevenciós céllal (Brown-Rytlewski–McManus, 2000; Flowers et al., 2001). A sprórák megtapadásának megelőzésre alkalmazható a neem olaj, habár hatékonysága kérdéses (Brown-Rytlewski–McManus, 2000). Ezen kívül a tünetes növényi részek eltávolítása is segíthet a betegség visszaszorításában (Palmer et al., 1988; Michailides, 1991; Stanosz et al., 2001).

Nagyon kevés kutatást végeztek a *Botryosphaeriaceae* családra vonatkozóan arról, hogy az éghajlatváltozások milyen következményekkel járhatnak a gazdaszervezet-kórokozó kölcsönhatás tekintetében. A szélsőséges időjárási viszonyok, illetve a kártevők és a betegségek szélesebb körűvé válása további stresszt és nyomást fejthet ki a fás szárú növényekben. Ha az ilyen stresszhatások mindenütt jelen vannak egy nagy területen, akkor az endofita gombák által okozott egyébként enyhe betegségek súlyosabbá válhatnak (Desprez-Loustau et al., 2006).

2.12. A *Botryosphaeria dothidea* faj bemutatása

A *Botryosphaeria dothidea* fajt 1853-ban írták le (Cesati–De Notaris, 1853). Sebfertőző kórokozóknak tartották, az elmúlt évtizedek során azonban ezeket a gombákat elsősorban endofitonnak tekintik, amelyek megfertőzik a fás szárú növények egészséges szöveteit, és nyugalmi állapotban maradnak a stresszhelyzetek kialakulásáig (Stanosz et al., 2005; Maresi et al., 2007; Perez et al., 2010). A *B. dothidea* fajt detektálták már fenyőn, eukaliptuszon (Smith et al., 1996a), almán (Parker–Sutton, 1993), pisztácián (Michailides et al., 1991) és áfonyán is (Milholland, 1972), tehát széles gazdanövény körrel rendelkezik. Magyarországon mamutfenyőben mutatták ki a jelenlétét (Vajna–Schwarczinger, 1998).

Az általuk okozott tünetek kialakulása gyakran kapcsolódik abiotikus stresszhez, például aszályhoz, fagyhoz, vagy alkalmatlan termesztési környezethez (Ma et al., 2001; Desprez-Loustau et al., 2006; Bostock et al., 2014). A betegség tünetei az ágak és

törzsek rákosodása, a hajtások és az ágak elhalása, a gyümölcsrothadás és szélsőséges esetben a gazdanövény elhalása (Michailides, 1991; Slippers–Wingfield, 2007)

Az aszkospórák egysejtűek, áttetszők, 17-22 μm hosszúak, tojásdadok. A konídiumok egysejtűek, hosszúkásak, lekerekített végekkel. A konídiumok hossza is 17-22 μm és szintén áttetszők. Tenyésztés során a telepek kezdetben olíva-zöldek, majd sötétszürkévé és feketévé válnak. A micéliumszövet közepesen sűrű (Slippers et al., 2004; Phillips et al., 2013). A piknídiumok keletkezéséhez fenyőtűket szükséges helyezni a táptalaj felületére. Ezek a termőtestek gömb alakúak és micéliummal borítottak (Slippers et al., 2004). A morfológiai jellemzőket már nem használják rutinszerűen az azonosítás során az izolátumok közötti eltérések és a Botryosphaeriaceae fajok közötti átfedések miatt.

A *B. dothidea* DNS-alapú azonosítása jellemzően a β -tubulin, az rDNA ITS és a *tefl* lókuszek szekvenciáinak tanulmányozásával történik (Slippers et al., 2004). A tanulmányok többsége az rDNA ITS génszakaszt vizsgálja, amelyről kimutatták, hogy egyértelműen megkülönbözteti ezt a fajt a legközelebbi ismert rokonaitól (Phillips et al., 2013). Az elmúlt évtizedben tapasztalt genetikai átfedések miatt azonban javasolt az ITS szekvencia adatainak kombinálása a *tefl* és legalább egy másik filogenetikai markerrel (Marsberg et al., 2016).

2.13. A *Diaporthe* nemzetség bemutatása

A *Diaporthe* nemzetséget Nitschke (1870) írta le. A csoport tagjai széles körben elterjedt növényi patogének, endofitonok vagy szaprofiták, de az emberi szervezet és más emlősök kórokozói is (Webber–Gibbs, 1984; Carroll, 1986; Boddy–Griffith, 1989; Rehner–Uecker, 1994; Garcia-Reyne et al., 2011; Udayanga et al., 2011). Az egyik leggyakrabban izolált endofiton nemzetség számos növény tekintetében (Murali et al., 2006; Botella–Diez, 2011). A *Phomopsis* nemzetség a *Diaporthe* fajok ivartalan alakja, így a szakirodalomban a gombacsoport által okozott betegségekre vonatkozó adatok mindkét elnevezéssel megtalálhatók (Mostert et al., 2001; Ash et al., 2010; Diogo et al., 2010).

A *Diaporthe* nemzetség tagjai megfertőznek olyan gazdaszervezeteket is, amelyek világszerte fontos növények gazdasági szempontból. A fertőzés következtében gyümölcsrothadást, gyökerek és fás szövetek elkorhadását, levélfoltosodást, és akár teljes elhalást okoznak (Uecker, 1988; Santos et al., 2011; Thompson et al., 2011).

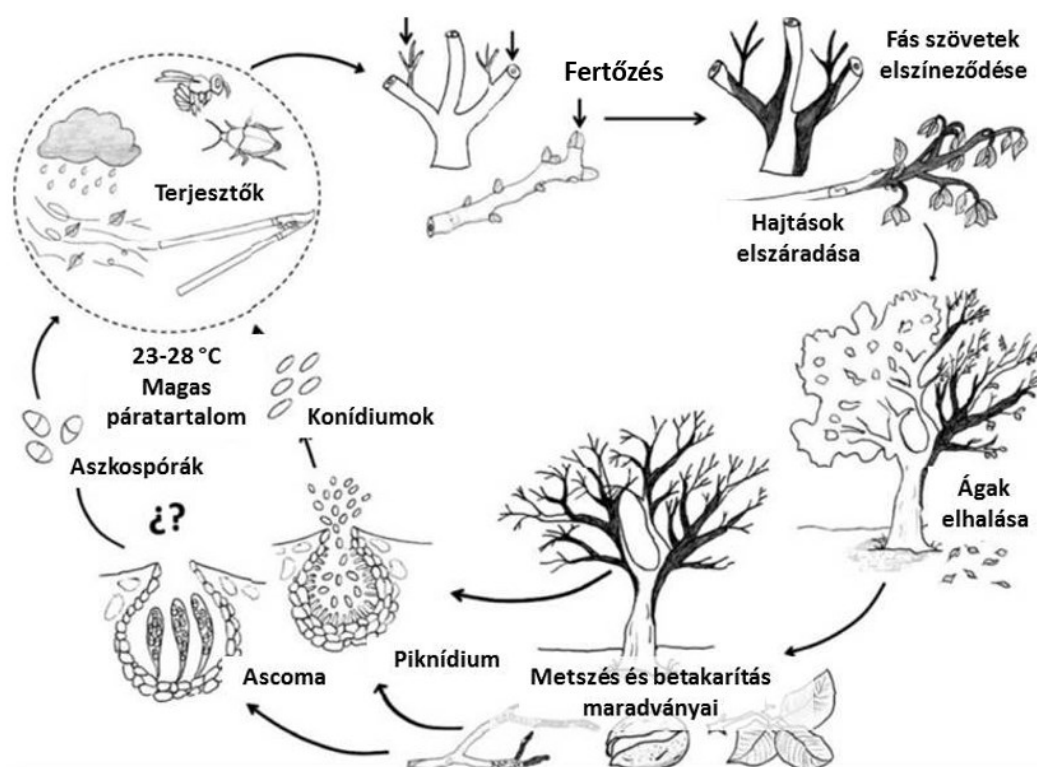
A *Diaporthe* fajokat korábban a morfológiai bélyegeik és a megfertőzött gazdanövény alapján azonosították, azonban később kiderült, hogy ezek az információk általában nem alkalmasak a faj szintű azonosításra a fajok közötti és fajon belüli variabilitás miatt (Santos et al., 2010; Udayanga et al., 2011). Az egyes *Diaporthe* fajok lehetnek a gazdaszervezettől és annak egészségi állapotától függően kórokozók vagy ártalmatlan endofita gombák is (Santos et al., 2011; Sebastianes et al., 2012).

Molekuláris vizsgálatok eredményei rávilágítottak arra, hogy a *Diaporthe* fajok nem mutatnak nagymértékű gazdaspecifikusságot (Rehner–Uecker, 1994; Mostert et al., 2001; Diogo et al., 2010). Kutatók sikeresen izoláltak több *Diaporthe* fajt egy gazdanövényből, illetve ugyanazon fajt több gazdaszervezetből (Santos–Phillips, 2009; Diogo et al., 2010; Santos et al., 2011; Thompson et al., 2011).

A *Diaporthe* nemzetséget taxonómiaiilag újradefiniálták a morfológia, a növénykórtani megfigyelések és a DNS szekvencia adatok alapján (Rehner–Uecker, 1994; Zhang et al., 1998; Mostert et al., 2001; Farr et al., 2002; Santos et al., 2010). A legpontosabb filogenetikai besorolást azonban a többgének DNS szekvencia elemzések eredményezték, amelyek értékes információkat szolgáltatnak az összetett evolúciós kapcsolatok feltárásához (Castlebury–Mengistu, 2006; van Rensburg et al., 2006; Santos et al., 2010; Udayanga et al., 2012). Számos molekuláris adaton alapuló, filogenetikai elemzéssel kombinált morfológiai karaktereket vizsgáltak a *Diaporthe* spp. gombák taxonómiai besorolása céljából. Ennek során az rDNS ITS szekvenciáinak, az elongációs faktor (*tefl*), a „mating type” (MAT) -gén, továbbá a β -tubulin (TUB) és a kalmomodulin (CAL) lókuszok tanulmányozására került sor (Diogo et al., 2010; Santos et al., 2010; Udayanga et al., 2011; 2012; Gomes et al., 2013). Udayanga és munkatársai (2012) az ITS, az *tefl*, a TUB és a CAL génszakaszokat vizsgálták a *Diaporthe* fajok széleskörű filogenetikai elemzéséhez. A legalkalmasabb törzsfákat az ITS és az *tefl* szekvenciaadatok vizsgálatával tudták létrehozni, így a továbbiakban ezeknek a géneknek a használatát részesítették előnyben a nemzetség genetikai tanulmányozásához.

Különös figyelmet kell fordítani a nemzetség fertőzési folyamatára. Agustí-Brisach és munkatársai (2019) kimutatták, hogy mind a Botryosphaeriaceae, mind a *Diaporthe* gombák jelentős mértékben fertőzik meg a dióhajtásokat metszési sebeken keresztül.

További fontos megfigyelésük, hogy a két gombacsoport antagonista vagy szinergista kölcsönhatást is létesíthet a fertőzési folyamat során, ha egyazon szövetben fordulnak elő. López-Moral és munkatársai (2020) ezeket a szempontokat vizsgálta a betegség biológiájának és epidemiológiájának tanulmányozása során, leírva a betegség biológiai ciklusát mediterrán éghajlati környezeti feltételek mellett (**1. ábra**), ahol a csapadékos, mérsékelt hőmérsékletű tavaszi időjárás, majd a hosszú száraz és meleg időszak késő tavasszal és nyáron kedvez a kórokozók terjedésének és fertőzésének. Ezt az életciklust szükséges tanulmányozni a kórokozók fertőzésének kritikus időpontjainak meghatározására, hogy hatékony kezelési stratégiákat lehessen kialakítani a betegséggel szemben.



1. ábra Kórokozók fertőzési ciklusa mediterrán éghajlati körülmények között.

Forrás: López-Moral et al., 2020

2.14. A *Diaporthe eres* faj bemutatása

A *Diaporthe eres* a nemzetség típusfaja. Elsőként Nitschke írta le (1870), mely során szilből izolálta. 1933-ban Wehmeyer (1933) számos szinonimát sorolt fel morfológiai karakterek alapján. Később a molekuláris adatok szerint néhány szinonimát több szerző is elfogadott (Gomes et al., 2013; Udayanga et al., 2014). Udayanga és mtsai. (2014) hét

lókusz kombinálásával vizsgálták a *D. eres* és a közeli rokon fajok genetikai tulajdonságait, és kijelölte az epitípus *D. eres* törzset.

A fajt régebben nem tekintették jelentős kórokozónak, azonban a szőlőben (Guarnaccia et al., 2018) és az áfonyában (Lombard et al., 2014) a rákosodás kialakulásának egyik fő okozójaként határozták meg.

A *D. eres* fajt azonosították továbbá őszibarackon (Thomidis–Michailides, 2009), mogyorón (Arciuolo et al., 2021), almán (Ali et al., 2019), szedren (Vrandečić et al., 2011) és körtén is (Bai et al., 2015). A szakirodalmi adatok alapján a faj gazdanövény köre az elmúlt évtizedekben jelentős növekedést mutat. Magyarországon szőlőtőkében azonosították (Kovács et al., 2014).

A *D. eres* faj tagjai PDA táptalajon kezdetben fehér, majd bézs színű telepeket alkotnak, jellemzően bolyhos micéliummal. Telepképzésük sebessége közepesnek tekinthető, átlagosan 14 napos tenyésztést követően nőnek be a 90 mm-es Petri-csészé teljes felületét. A sporulációt növényi szövettel kiegészített tápközegben lehet eredményesen kiváltani, mely során krémes sárga csepp jelenik meg azok felületén (Abramczyk et al., 2018). A piknidiumok szétszórtan helyezkednek el, feketék vagy sötétbarnák, átmérőjük pedig elérheti a 800 µm-t (Tao et al., 2020). A gombafaj alfa és béta konídiumokat képez. Az alfa konídiumok aszeptikusak, áttetszőek és enyhén hosszúkásak. Méretük $2-9 \times 1-2$ µm. A béta konídiumok szintén áttetszőek, fonalszerűek, egyenesek vagy enyhén ívelték, $20-30 \times 1-2$ µm nagyságúak (Abramczyk et al., 2018).

2.15. Növényvédő szerek fő tulajdonságai

A gombaölő szerek kifejlesztése és rutinszerű használata fontos része volt növényi betegségek elleni küzdelemnek, és hozzájárult a termés hozamok növeléséhez, a minőség javításához és a hozam stabilitásának biztosításához. A gazdálkodók számos hatékony vegyszerhez jutottak hozzá, amelyek alacsony dózisban is hatásosak voltak, és magas szintű védelmet biztosítottak a betegségek ellen (Russel, 2005).

A fungicideket több mint egy évszázada használják a mezőgazdaságban, és kezdetben nem tapasztalták a hatékonyságuk csökkenését (Horsfall, 1945). Az utóbbi időben az új hatóanyagok kidolgozásának és regisztrálásának költségei és nehézségei a termékkínálat csökkenéséhez vezetett. Az egyre szigorúbb szabályozások számos termék kivonását eredményezte, különösen Európában. A gombaölő szerekkel szembeni rezisztencia kialakulása számos kórokozó esetében veszélyezteti az eredményes

védekezést. Egyes növényi kórokozók esetében aggodalomra ad okot, hogy az ellenük való védekezés kémiai lehetőségei korlátozottak, vagy akár elérhetetlenekké válnak (Spellberg et al., 2008; Livermore, 2009; D'Costa et al., 2011).

A kontakt gombaölő szerek olyan anyagok, amelyek a növények felszínén maradnak, és elpusztítják a spórákat és a hifákat. A szisztémás gombaölő szereket a növényi kutikula és az alatta lévő szövetek szívják fel, és elpusztíthatják a felszínen lévő spórákat és hifákat, valamint a felszín alatt kezdődő fertőzéseket. A szisztémás gombaölő szerek közül néhány csak lokálisan hat, mások pedig teljesen szisztémás hatásúak. Egyes fungicidek xilém mobilitást mutatnak, nagy távolságra eljutva felfelé haladva a növény növekedésének irányában. Más fungicidek a floémában mutatnak mobilitást a hajtásoktól a gyökerekig (Caffi–Rossi, 2018).

A belső növényi szöveteket fertőző kórokozók esetében a kontakt és a szisztémás gombaölő szerek is hatásosak lehetnek. A gomba fertőzése után csak a szisztémás fungicidek hatásosak. Egyes szisztémás készítményeknek hosszabb a fertőzés utáni aktivitásuk, mert mélyebben behatolnak a növényi szövetekbe, és képesek kölcsönhatásba lépni az előrehaladt fertőzésekkel (Caffi–Rossi, 2018).

2.16. A fungicidek hatékonyságát befolyásoló tényezők

A gombaölő szerek hatékonysága a hatás időtartamára és mértékére utal. Az hatás időtartamát és mértékét egyaránt befolyásolja a gombaölő szer hatóanyaga, összetétele, adagolása, kijuttatása, a kijuttatás utáni időjárási viszonyok, a növény növekedése, és ezen tényezők kölcsönhatása (Caffi–Rossi, 2018).

A kontakt fungicidek maradványai az idő elteltével fokozatosan eltűnnek a kémiai károsodás, a növényi felületeken végbemenő mikrobiális aktivitás, az időjárási hatások, valamint a növények felületére kerülő pára, eső, harmat vagy öntözővíz miatt (Lukens, 1971). A csapadék az egyik fő tényező, amely csökkenti a gombaölő szerek fennmaradását a növények felszínén. A növekvő növényi szövetek is csökkentik a gombaölő szer hatékonyságát, mivel a táguló növényi felületek bevonat nélküli területeket eredményeznek (Lukens, 1971).

A szisztémás gombaölő szerek koncentrációja elsősorban a növekvő növényi szövetek általi újraeloszlás, valamint a növényi anyagcsere által történő lebomlás miatt csökken. A felszívódó tulajdonságuk miatt kevésbé érzékenyek a csapadék általi lemosódásra, mint a kontakt fungicidek, amelyek a növények felületén maradnak (Caffi–Rossi, 2018).

Az eredménytelen fungicid kezelések gyakran a rossz kijuttatásból, azaz a növényi felületek nem egyenletes beborításából erednek. A szisztémás fungicidok eloszlanak a növényben, így ez esetben kevésbé függ a hatékonyság a permetezés egyenletességétől (Evans, 1977). A fungicidok megszáradása fontos része a kezelésnek, különösen a kontakt szerek esetén. A felszívódó gombaölők kevésbé érzékenyek ebből a szempontból, azonban az ilyen készítményeknek a kijuttatása után is szükséges valamennyi száradási idő a teljes felszívódás érdekében. Az esőállóság azt az időt jelenti, amely az alkalmazás és a csapadék között szükséges ahhoz, hogy a termék hatékonyan működjön. A megfelelő száradáshoz és felszívódáshoz egyes készítmények esetén kevesebb, mint fél óra is elegendő, míg más termékek akár nyolc óránál is többet igényelnek (Kudsk et al., 1991; Lindner et al., 1995; Andersen et al., 2014).

A gombaölő szerek az eső hatására újra eloszlanak a lombkoronán (Brent–Atkin, 1987). Enyhe eső esetén a felső lombkorona rétegekre kijuttatott gombaölő szer egy része az alsó szintekre kerülhet, de mindkét réteg védett marad (Hislop, 1966). Heves esőzés esetén azonban a gombaölő szer kimosódhat (Pereira et al., 1973). A lemosódás mértékét befolyásolják a készítmény összetevői (Vicent et al., 2007; Gaskin–Steele, 2009; Hunsche et al., 2011), a csapadék mennyisége és intenzitása (Pérez-Rodríguez et al., 2015), valamint a kezelés napszaka is (Augusto et al., 2010).

A növényvédelmi kezelésekkal kapcsolatos döntéshozatal során fontos a megfelelő dózis és időpont meghatározása (Rossi et al., 2012). A növény tulajdonságaihoz igazodó permetezés lehetővé teszi a leghatékonyabb kezelés kivitelezését, valamint csökkenti a kijuttatott gombaölő mennyiségét, miközben a hagyományos permetezéssel egyenértékű védelmet biztosít (Gil et al., 2011).

2.17. Antagonista gombák növényvédelemben történő alkalmazásának lehetőségei

A kémiai növényvédő szerek alkalmazásának csökkentése igen fontos mind ökológiai, mind gazdasági szempontból. A fogyasztók részéről egyre nagyobb igény mutatkozik a bio élelmiszerek iránt, mely alapja a biológiai gazdaságok működtetése. Ezen felül a fenntarthatóság és az egészség védelmének szempontjából elengedhetetlen a peszticidek körültekintő használata. A kémiai fungicidok negatív környezeti és egészségügyi hatásai, valamint a kórokozók gombaölő szerekkel szembeni növekvő rezisztenciája miatt világszerte előtérbe került a biokontroll ágensek növényvédelemben történő alkalmazásának vizsgálata (Jiang et al., 2019). Ezen felül, tekintettel a biológiai

sokféleségre, a hasznos mikroorganizmusokra, a talaj egészségére, az élelmiszerek minőségére, és ebből következően az emberi egészségre gyakorolt negatív hatásokra, a környezetbarát védekezési módok prioritást érdemelnek (Yan et al., 2022). A módszerfejlesztés azonban költséges és időigényes folyamat, emellett kiemelten fontos a közép és hosszú távú hatások vizsgálata, ugyanis egyes esetekben a kezdetben környezetbarátnak tartott módszerek valójában károsak lehetnek (Goulson, 2013).

Egyik módja a kémiai szerek növényvédelemben történő csökkentésére a biológiai ágensek alkalmazása, mely antagonista hatással rendelkező mikrobák használatával valósítható meg. Fontos azonban, hogy a védekezés céljából alkalmazott törzs antagonista hatása csak a célzott patogénnel szemben érvényesüljön, ne legyen negatív hatással a gazdanövény természetes mikrobiótájára, és ne jelentsen veszélyt a növényre, a természetes ellenségekre, és az emberre sem (Turóczy, 1999). Egyes gombák növénykórokozók leküzdésére történő felhasználása jelentős fejlődési kilátásokkal rendelkezik a környezetbarát ökológiai mezőgazdaság kialakításában, a mezőgazdasági termékek minőségének javításában és a fenntartható mezőgazdasági stratégiák kidolgozásában. Az egyik legismertebb szervezet a *Trichoderma* spp., mely nemzetségnek öt faja biokontroll hatással bír, a leggyakrabban alkalmazott pedig a *Trichoderma harzianum* fajkomplex (Filizola et al., 2019). A nemzetség egyes tagjai által kiváltott antagonista mechanizmusok közé tartozik a parazitizmus, az antibiózis és a versengés (Costa et al., 2019). A *Trichoderma* törzseknek számos előnyös tulajdonsága van, amelyek lehetővé teszik a növényvédelemben és a biostimulációban való felhasználásukat. A nemzetség egyes tagjai hatékonyan kolonizálják a rizoplánt, a rizoszférát és a gyökeret egyaránt. Számos metabolitot termelnek, melyeknek lehet antimikrobiális (sejtfalbontó enzimek, antibiotikumok) és biostimuláló (fitohormonok, fitoregulátorok) hatása is. Ezen túlmenően a teljes talaj mikrobiommal is kölcsönhatásba lépnek (Martínez-Medina et al., 2014; Ghorbanpour et al., 2018; Jaroszuk-Ścisł et al., 2019).

Az *Epicoccum* spp. nemzetség tagjai között megtalálhatók endofiton (Araujo et al., 2012), szaprofita (Beasley et al., 2001) és patogén (Taguian et al., 2020) életmódot folytató törzsek is. Patogén hatásuk gyengének tekinthető, leggyakrabban levélpötytyösödést váltanak ki tünetként a kolonizált gazdaszervezeteken (Andersen et al., 2009; Liu et al., 2018), de az *Epicoccum nigrum* gyümölcsrothadást is okozhat (Lin et al., 2018). A fertőződés megtörténhet akár előzetes sebzés nélkül is (Yu et al., 2019). Egyes *Epicoccum* fajok antagonista hatással bírnak bizonyos növényi kórokozókkal

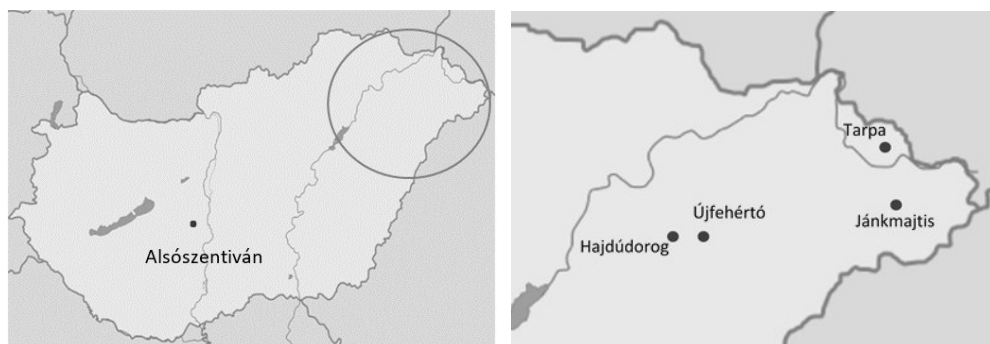
szemben (Braga et al., 2018; Bagy et al., 2019), köztük az *E. nigrum* is, mely antagonista hatását eredményesen tesztelték több növényfajon is, pl. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium irregulare*, *Phytophthora infestans* és *Monilinia laxa* fajokkal szemben (Zhou–Reeleder, 1989; Larena et al., 2005; Koutb–Ali, 2010; Li et al., 2013).

Az *Epicoccum* nemzetség által kifejtett biokontroll hatás a hifák fejlődési rendellenességeként fejeződik ki, mely során csökken a növekedésük és a csírázásuk (Bian et al., 2020), ezen felül lízis is bekövetkezhet (Lahlali–Hijri, 2010). Egyes *Epicoccum* fajok antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkező másodlagos metabolitokat termelnek, melyek közül az egyik legismertebb metabolit a flavipin (Madrigal et al., 1991), amely az *Epicoccum* spp. gombaölő tulajdonságaiért felelős. A biológiai védelem mellett javítják a gazdanövény általános állapotát és növekedését (Favaro et al., 2012), ezáltal növelik a növény betegségekkel szembeni ellenálló képességét (Bagy et al., 2019).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Mintavételezés, mintavételezési helyek

A kutatás során a vizsgálatokhoz szükséges növényi részeket négy északkelet-magyarországi és egy alsószentiváni dióültetvényből gyűjtöttük be (**2. ábra**), melyek közül az egyik a Debreceni Egyetem Agrár Kutatóintézetek és Tangazdaság Újfehértói Kutatóintézetében (AKIT, ÚJKI) (a vizsgálat idején NAIK Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet Újfehértói Kutatóállomás) található, a fennmaradó négy pedig kereskedelmi ültetvény.



2. ábra: Mintavételezési helyek

Forrás: Saját szerkesztés

Nem gyűjtöttünk mintát az ültetvények szélső soraiban található fákról. A különböző növényi részek begyűjtésének megkezdése előtt, valamint az egyes minták között alkohollal és leégetéssel sterilizáltuk a metszőollókat, valamint a gumikesztyűt is rendszeresen fertőtlenítettük. A begyűjtött növényi részeket tiszta zacskóba helyeztük, és a feldolgozásig 4 °C-on tároltuk.

Az fiatal ágak mintavételezését 2018 júniusában végeztük. Kis kiterjedésű nektorikus elváltozásokat mutató és termőtestekkel rendelkező, valamint tünetmentes mintákat gyűjtöttünk be a lombkorona alsó részéről a patogén gomba nemzetségek és az esetleges látens fertőzés meghatározásához. Mind a négy kelet-magyarországi mintavételezési hely felmérése során 10 fáról 10-10 darab három éves ágat gyűjtöttünk be. Ezen kívül összesen kilenc tünetmentes rügyet és hét barna foltos zöld termést is bevontunk a vizsgálatba.

A következő mintavételezés a betakarításkor történt, mely során tünetes és tünetmentes terméseket is gyűjtöttünk három ültetvényből (Hajdúdorog, Jánkmajtis, Tarpa), összesen 200 db-ot.

A nyugalmi időszak végén, 2019 márciusában 150 db tünetmentes porzós és 10 db termős rügyet szedtünk a jáankmajtisi ültetvényből. A vizsgálat célja a látens fertőzés meghatározása és a fertőzöttség felmérése volt. A technika elnevezése BUDMON (Michailides et al., 2014).

Az ONFIT vizsgálatához 2019 júniusában 38 tünetes és 32 tünetmentes diót gyűjtöttünk be Jáankmajtisról, valamint 50 tünetes termést Alsószentivánról. A mintákat a fákról gyűjtöttük be, a lombkorona alsó és középső részéről. A tünetek között szerepeltek nagyobb kiterjedésű sötétbarna elváltozások, valamint apró foltok a zöld burok felszínén.

2019-ben a betakarításkor Alsószentiván (43 db), Tarpa (42 db) és Jáankmajtis (50 db) területén található kereskedelmi dióültetvényekből gyűjtöttünk be diókat. A vizsgálataink során szerzett tapasztalatok alapján kiterjesztett növényvédelmi kezeléseket alkalmaztak ebben az évben Jáankmajtison, de kísérleti beállítás nem történt. A Folicur Solo készítményt azonban két hónappal korábban alkalmazták a 2018-as évben történő időzítéshez képest, valamint a kijuttatást megismételték 10 nap elteltével, mely szintén elmaradt az ezt megelőző évben.

3.2. Fon alas gombák izolálása és azonosítása

3.2.1. A dió különböző növényi részeinek mikrobapopulációjának kitenyészése

A kutatómunka során megvizsgáltuk a diófa különböző növényi részeinek patogén mikrobaközösségét annak feltérképezésére, hogy a dióbélrothadással kapcsolatba hozható *Botryosphaeriaceae* és *Diaporthe* kórokozók milyen arányban vannak jelen az ágakban, termésekben és rügyekben.

Az ágminták külső hancs rétegét steril szikével eltávolítottuk, majd az 1-2 cm-es szövetdarabot négy részre daraboltuk és Falkon-csőbe helyeztük. Ezt követően egy percig áztak a növényi részek 10%-os klorogén-szeszkvihidráttal (Neomagnol, Parma Produkt Ltd.) és 0,1%-os Tween20 oldatban (Merck KGaA). A termések esetén a darabolás és a fertőtlenítés ugyanúgy zajlott, mint az egyéb növényi részeknél. A fertőtlenítőszerrel dupla steril vizes öblítéssel mostuk le a minták felületéről (Kovács et al., 2017).

A rügyeket két részre osztottuk, azonban a külső részüket nem tudtuk eltávolítani. A környezetnek való kitettségük miatt 5%-os NaClO-ot alkalmaztunk fertőtlenítőszerként, amit ebben az esetben is kétszeres öblítéssel távolítottunk el.

A növényi részeket burgonya-dextróz agar (PDA, Biolab) táptalajra helyeztük és hét napig inkubáltuk 25 °C-on. A telepek által képzett gombafonalakból tiszta tenyészeteket készítettünk szintén PDA táptalajra. Egyes törzseket további vizsgálatok céljából -80 °C-on tároltuk 33%-os glicerín oldat alkalmazásával.

3.2.2. A tenyészetek morfológiai és molekuláris biológiai azonosítása

A tenyészetek nemzetség szintű azonosításához a telepek színét és textúráját, mint makromorfológiai jellemzőket vizsgáltuk. Az ivartalan termőtesteket, valamint a konídiumok alakját és méretét Zeiss AxioImager fáziskontraszt mikroszkóppal és AxioCam MRc5 kamerával (Zeiss) vizsgáltuk (Jacobs–Rehner 1998; Andersen et al., 2002; Summerell et al., 2003; Gomes et al., 2013; Visagie et al., 2014).

A genomi DNS-t NucleoSpin Plant II Kittel (Macherey-Nagel) vontuk ki a gyártó protokolljában található utasítások szerint. Az azonosítandó izolátumokat PDA táptalajon tenyésztettük ki, majd hét napos inkubációt követően a micéliumokat 0,7 ml 2 mm-es kerámia feltárási gyöngyöt és 500 µL lízispuffert tartalmazó 2 ml-es csövekbe (Zymo Research Corp) helyeztünk. A PCR reakciók során az ITS régió és a *tefl* gén felszaporítását végeztük el ITS1 és ITS4 (IDT) (White et al., 1990), valamint EF1-728F és EF1-986R (IDT) (Carbone–Kohn, 1999) primerpárok és Bio-Rad T100 típusú készülék alkalmazásával. A PCR-elegyek végső térfogata 25 µl volt, amely 12,5 µl DreamTaq Green Master Mix-et (Thermo Fisher Scientific), 0,5-0,5µl primert (10 pmol µL⁻¹), 10,5 µl nukleázmentes vizet és 1 µl DNS-t (10 ng µL⁻¹) tartalmazott.

Az amplifikáció 3 perces kezdeti denaturációs ciklussal kezdődött 95 °C-on, amit 35 ciklus követett 30 sec 95 °C-on, 45 sec 56 °C-on ITS, 55 °C-on *tefl* primerek esetén, majd 60 sec 72 °C-on. A program utolsó fázisa a végső lánchosszabbítás volt 72 °C-on 5 percre.

A PCR reakció sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztük 1%-os agaróz gél (Bioline) és 4 µL EcoSafe (Pacific Image Electronics) festék alkalmazásával, 100V-os 60 perces futtatással (Bio-Rad). A bázispárok hosszúságának meghatározásához 5 µl FastRuler Low Range (Thermo Scientific) létrát jutattunk a szélső zsebekbe.

A termékek tisztításához NucleoSpin Gel, PCR Clean Up Kit-et (Macherey-Nagel) alkalmaztunk. A szekvenáláshoz külső szolgáltatót vettünk igénybe, így a felcímkézett csöveket postáztuk a Mirosynth GmbH részére. A kapott, ITS1 irányából induló szekvenciákat BLAST algoritmussal elemeztük, és összevetettük a GenBank adatbázisban található típustörzsekkel (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

A filogenetikai elemzéshez a szekvenciákat először a Clustal-X programban összeillesztettük (Larkin et al., 2007). Az eredményül kapott illesztést ellenőriztük, és ahol szükséges volt Genedoc (Nicholas et al., 1997) segítségével korrigáltunk. A filogenetikai elemzést a MEGA 7.0 programmal végeztük el az összeállított DNS-illesztéseket használva bemenetként (Kumar et al., 2016). A törzsfa elkészítéshez Maximum likelihood módszert alkalmaztunk, valamint Tamura 3-paraméteres modellt (Tamura, 1992). Az elágazások pontosításához 1000-szeres Bootstrap-analízist végeztünk.

3.3. Látens fertőzöttség meghatározása ONFIT technikával

A zöld dió patogén mikrobiomját ONFIT módszerrel (Michailides et al., 2010) vizsgáltuk. Az egyéjszakás fagyasztási és inkubációs technika eredetileg a *Monilinia fructicola* csonthéjas gyümölcsökben történő kimutatására használták (Michailides et al., 2000). A módszer lényege a minta szöveteinek fagyasztása és ezáltal a zöld gyümölcsben levő fungisztatikus komponensek lebontása (Pezet et al., 2003). A felületi fertőtlenítéssel eltávolítjuk a dióburkon lévő szennyeződéseket, így az inkubációt követő micélium megjelenése csak a patogén gombák fertőzésének tulajdonítható. Ezzel a módszerrel feltárhatók a látens fertőzések és a tünetek potenciális kiváltói, valamint támpontot nyújthat a betakarítási időszakban várható veszteség előrejelzéséhez.

Első lépésként fertőtlenítettük a mintákat az előző fejezetben olvasható módszerrel (Kovács et al., 2017). A zöld diókat ezután -16 °C-on 15 órán át inkubáltuk, majd fertőtlenített műanyag edényekbe helyeztük, és magas relatív páratartalom mellett 14 napig, 25 °C-on inkubáltuk sötétben. A burok felszínén számos esetben specifikus micéliumok és piknidiumok voltak megfigyelhetők, melyeket PDA táptalajra oltottunk le.

3.4. Hőmérséklet hatása *Botryosphaeria* és *Diaporthe* izolátumok növekedésére

Négy *Diaprothe eres* (J2034, J2028, JT2024, JT2050) és két *Botryosphaeria dothidea* (JT2015, T2016) izolátum telepképzéséhez szükséges optimális hőmérsékletét elemeztük. A törzseket leoltottuk PDA táptalajra, majd a hét napos gombatelepek aktívan növekvő széléről steril dugófúróval 10 mm-es micéliumkorongot vágunk ki és helyeztünk PDA táptalajra három ismétlésben, és 15, 20, 25, 30 és 35 °C-ra, sötétbe. A legkisebb és a legnagyobb telepátmérőt rögzítettük az 1-4., valamint a 7. napon.

3.5. Patogenitási teszt éretlen diótermésen

A dióágból, rügyből és termésből izolált *Diplodia seriata* és *Diaporthe eres* fajokkal mesterségesen fertőztünk zöld dióterméseket, annak tanulmányozására, hogy képesek-e elváltozást előidézni. A tesztet 2018 augusztusában állítottuk be Chen és munkatársai (2014) leírása alapján. A vizsgálathoz tüneteket nem mutató 'Milotai 10' fajtájú zöld diókat gyűjtöttünk be, amelyek az AKIT ÚJKI tulajdonában lévő újfelhértói ültetvényről származtak. A vizsgálatba öt *D. eres* (J1004, T1010, U1001, U1003, U1008) és három *D. seriata* (D1012, U1012, U1013) törzset vontunk be patogén kórokozóként.

A teszt beállítása előtt a zöld diókat Neomagnol-Tween20 oldatban áztattuk egy percig, majd a fertőtlenítőszert steril vízzel mostuk le, ezt követően hagytuk megszáradni őket. Leégetett dugófüró segítségével behatoltunk a kemény héjig, és kimetszettünk egy 1 cm-es darabot a dió zöld burkából. Az így létrejött sebbe belehelyeztünk egy micéliummal átszőtt agar korongot, amelyet a patogén tenyészet aktív növekedési zónájából metszettük ki. Az inokuláció helyét Parafilmmel (Meck) zártuk az agar és a seb kiszáradásának elkerülése érdekében, majd a diókat 25 °C-os termosztátban inkubáltuk három hétig, fertőtlenített műanyag dobozokban, magas páratartalom mellett, sötétben. A vizsgálat során három ismétléssel dolgoztunk, kontrollként három minta esetében steril PDA korongot helyeztünk az általunk képzett sebbe.

A kórokozók virulenciáját a burkon és a bélállományon McKinney-index kiszámításával számszerűsítettük (Imc%) (McKinney, 1923). Ehhez a **3. táblázat** szerint osztályoztuk a tünetek súlyosságát, a burok esetében I-VI-ig, a bél esetében 0-III-ig terjedő skálán.

A fertőzöttség mértékét az alábbi képlet alapján adtuk meg (%):

$$\text{Fertőzöttségi index} = \frac{\sum \text{összes tünet osztályozása} \times \text{darabszám}}{\text{összes darabszám} \times \text{legnagyobb tünet osztályozása}} \times 100$$

3. táblázat: A burok és a bél tünetek osztályozása

Tünet osztályozása		Burok	Bél
0		Nincs tünet	Nincs tünet
I		A metszés körüli zónában barnulás	A termés elszíneződött
II		A metszés tágabb területében barnulás	Fonalak, foltok a bélen
III		A burok fele barna	Elfolyósodott, elfeketedett bélállomány
IV		A zöld burok ¾-e barna	III-as osztályzattal megegyező tünetek.
V		Az egész dió elbarnult	III-as osztályzattal megegyező tünetek.

3.6. Dió- és almaágak mesterséges fertőzése

Annak meghatározására, hogy a diótermésből származó patogén izolátumok képesek-e a diófa ágainak szövetein is tünetet okozni, patogenitási tesztet állítottunk be. Ehhez egészséges három éves ágmintákat gyűjtöttünk a Debreceni Egyetem Bemutatókertjében. Az inokulációt három db *Botryosphaeria dothidea* (JT2015, JT2035, T2016) és hat db *Diaporthe eres* (J2012, J2023, J2024, J2028, J2034, JT2050) törzssel végeztük el.

Az ágmintákat csapvízben megmostuk, három percig 70%-os etanolban áztattuk, majd steril desztillált vízzel kétszer leöblítettük. Az ágak közepén steril szikével bemetszést készítettünk, majd a sebbe helyeztük a patogén tenyészetből származó micéliumkorongot, három ismétlésben. Kontrollként három sebzett ágat steril PDA koronggal inokuláltunk. A sebzés helyét, valamint az ágak végeit befedtük Parafilm-mel. A fertőzött ágakat műanyag dobozba helyeztük, valamint tettünk a dobozokba egy-egy steril vízzel töltött Petri-csészét a megfelelő páratartalom biztosítása érdekében (Tang et al., 2011).

Négy héttel később szemrevételeztük a patogén gombák által okozott tüneteket a kérgen és a belső szövetekben, valamint lemértük a léziók kiterjedését.

A kórokozók visszaizolálását az 3.2.1-es fejezetben leírt módon végeztük el annak megállapítására, hogy a gombák kolonizálták-e az ágak szöveteit.

A dión kívül más növényfaj dió kórokozókkal szembeni fogékonyságának és a patogének fertőzési módjának lehetőségeinek meghatározását is vizsgáltuk a kutatómunka során. Kelet-magyarországi mintázásaink során figyeltük meg, hogy a dióültetvények közelében alma és más csonthéjas ültetvények találhatók. Felvetődött a kérdés, hogy a dióültetvényekben pusztító gombás betegség veszélyt jelenthet-e az almaültetvényekre, mely keresztfertőződés útján akár fel is ütheti a fejét. A keresztfertőzés lehetőségének bizonyításához tanulmányoztuk, hogy a vizsgálataink során dióágból izolált *Diplodia seriata* (D1011), valamint dióbélből izolált *Botryosphaeria dothidea* (JT2015) és *Diaporthe eres* (JT2036) izolátumok képesek-e tünetet okozni almafa ágakon *in vitro*. A tünetet nem mutató almafa ágakat a Debreceni Egyetem Pallagi Kertészeti Kísérleti Telepéről gyűjtöttük be 2019 tavaszán. A vizsgálatot a dióág mesterséges befertőzésekor alkalmazott módszerrel állítottuk be.

3.7. Fungicidek hatása a dió terméskárosodását okozó gombákra

A növényvédő szerek hatását mérgezett agar lemezes módszerrel vizsgáltuk. Két *Diaporthe eres* (J2028, J2034) és egy *Botryosphaeria dothidea* (JT2015) izolátum érzékenységét teszteltük *in vitro*, melyeket előzetes kutatómunkánk során rothadt dióbélből tenyésztettünk ki és azonosítottunk ITS és *tefl* markerszekvenciák alapján.

A három patogén izolátum érzékenységét négy hatóanyag vagy hatóanyag kombináció jelenlétében vizsgáltuk: ciprodinil 37,5% + fludioxonil 25% (Switch) fluopiram 17,7% + tebukonazol 17,7% (Luna Experience), tebukonazol 25% (Folicur Solo), valamint fluopiram 21,3% + trifloxistrobin 21,3% (Luna Sensation) (4. táblázat). A készítményeket kézmeleg PDA (Biolab, Magyarország) táptalajba kevertünk az engedélyokiratban található héjasokra vagy gyümölcsfákra vonatkozó üzemi koncentrációban.

4. táblázat: A fungicidteszt során alkalmazott hatóanyagok tulajdonságai

Jelmagyarázat: *A legalacsonyabb kijutattási koncentráció héjas vagy csonthéjas termésű gyümölcsfák esetén (Nébih, 2023)

Hatóanyag	Hatásmechanizmus	Hatóanyag/Hatóanyag-kombináció	Kijutattási koncentráció L vagy kg/ha*
ciprodinil	metionin bioszintézist gátló, felszívódó gombaölő szer	fludioxonil + ciprodinil	0,8
fludioxonil	jelátviteli folyamatokat módosító, kontakt gombaölő szer		
fluopiram	sejtlégzést gátló, felszívódó hatóanyag	tebukonazol + fluopiram	0,44
tebukonazol	szterol bioszintézist gátló, felszívódó hatóanyag	tebukonazol	0,75
trifloxistrobin	sejtlégzést gátló, felszívódó hatóanyag	trifloxistrobin + fluopiram	0,37

A Petri-csészébe kiöntött és megszilárdult mérgezett táptalajra helyeztünk a vizsgált patogén izolátumok egy hetes tenyészetéből egy-egy 10mm micéliummal átszőtt táptalajkorongot, három ismétlésben. Ezt követően sötétben, szobahőmérsékleten hét napig inkubáltuk őket, majd rögzítettük a telepátmérőket.

A kapott értékekből gátlási indexet (Pandey et al., 1982) számoltunk az alábbi képlet alapján:

$$I (\%) = \frac{\text{kontroll tenyészet telepátmérője} - \text{tenyészet átmérője a mérgezett agaron}}{\text{kontroll tenyészet telepátmérője}} \times 100,$$

A fungicid érzékenység pontos meghatározásához az EC50 érték megadása szükséges. Ehhez Folicur Solo készítményt választottuk ki, mely hatóanyaga a tebukonazol, így egyértelműen az e hatóanyaggal szembeni érzékenységet tudtuk számszerűsíteni. A szert az engedélyokiratán feltüntetett legalacsonyabb üzemi koncentrációban, illetve annak 1-10000-szeres hígításában alkalmaztuk, 47,5 – 0,00475 mg/l koncentrációban. A tenyészetek szobahőmérsékleten növekedtek, sötétben, 14 napig.

Kontrollként fungicidet nem tartalmazó PDA táptalajra oltott tenyészetek szolgáltak. A vizsgálat során három ismétléssel dolgoztunk. Az inkubációs idő után lemértük a legkisebb és legnagyobb telepátmérőket, és meghatároztuk a fungicidek micéliális növekedésgátlását (I%). Az EC50 kiszámításához lineáris regressziós analízist végeztünk (Pasche et al., 2004).

3.8. Az *Epicoccum nigrum* és a *Trichoderma gamsii* antagonisták vizsgálata

Diórügyből előzetesen izolált *Epicoccum nigrum* (génbanki azonosító: MT111108) és Kovács és munkatársai (2021) által izolált TR08-as *Trichoderma gamsii* (OK560831) növekedésgátló hatását direkt konfrontációban vizsgáltuk. A kísérlet során az antagonisták gátló hatását két *Diaporthe eres* (J2028, J2034), egy *Botryosphaeria dothidea* (JT2015) és egy *Diplodia seriata* izolátummal (D1011) szemben tanulmányoztuk. Az egy hetes tenyészetek aktív növekedési zónájából egy-egy micéliumkorongot PDA lemezre helyeztünk, egymástól három cm-re. A *Botryosphaeria* és a *Diplodia* nemzetség tagjairól elmondható, hogy szobahőmérsékleten gyorsabb növekedést mutatnak az *Epicoccum* fajokhoz képest, az antagonistát ebben az esetben három nappal korábban helyeztük a táptalajra. A *T. gamsii* fajt viszont gyorsabb növekedés jellemzi a tesztelt patogénekhez képest, emiatt a kórokozókat oltottuk le egy nappal az biokontroll gombát megelőzve, valamint az inkubáció egy hét volt eltérően az *E. nigrum* gomba vizsgálatával, ahol két hét növekedést követően mértük meg a tenyészetek telepátmérőjét.

Ezt követően az antagonisták micéliális gátlásának mértékét Biokontroll Index-szel (Szekeres et al., 2006) fejeztük ki az alábbi képlet alapján:

$$BCI (\%) = \frac{\text{Antagonista tenyészet átmérője}}{\text{Antagonista} + \text{patogén tenyészet átmérője}} \times 100$$

3.9. A törzsek mikroszatellitjeinek vizsgálata

Kutatómunkánk során 34 darab, dióból kitenyésztett izolátum genetikai diverzitását tanulmányoztuk mikroszatellit markerek segítségével. A vizsgált három faj a *Botryosphaeria dothidea*, a *Diaporthe eres* és a *Diplodia seriata* fajok voltak, melyek dióágból, rügyből, vagy termésből származtak.

A rövid DNS szakaszok amplifikálását négy primer alkalmazásával végeztük el, melyek a következők voltak: (ACAC)₅, (GGA)₇, (GTG)₅, M13 (IDT). A PCR elegyet 2 µl primer, 7 µl nukleázmentes víz, 11 µl DreamTaq Green Master Mix, és 2 µl DNS alkotta. A molekuláris biológiai vizsgálatok előtt optimalizáltuk a PCR reakció anellációs hőmérsékletét és a reakcióelegy dNTP koncentrációját, illetve az agarózgél összetételét (SeaKem vagy Bioline, 1% és 2%).

Az amplifikáció 3 perces kezdeti denaturációs ciklussal kezdődött 95 °C-on, amit 40 ciklus követett 20 sec 95 °C-on, 60 sec 56 °C-on, majd 2 perc 72 °C-on. A program utolsó fázisa a végső lánchosszabbítás volt 72 °C-on 10 percig.

A gélelektroforézist az 3.2.2-es fejezetben leírtak alapján végeztük el, módosítva a futtatás hosszán (80V, 100 perc). A gélfotók FlourChem M (ProteinSimple) géppel készültek, az eredmények kiértékeléséhez pedig AlphaView Stand Alone programot (ProteinSimple) alkalmaztunk. Az adatok elemzéséhez az egyes izolátumokat a különböző amplikonok jelenléte vagy hiánya szerint értékeltük. A három vizsgált gombafaj dendrogramját ezt követően UPGMA szoftverrel készítettük el. A létrejött filogenetikai törzsfákat a genetikai távolságok alapján kládokra osztottuk.

3.10. Az adatok kiértékelése során alkalmazott statisztikai módszerek

A kísérletek során kapott adatok kiértékeléséhez nem parametrikus Mann–Whitney U-tesztet alkalmaztunk a csoportok összehasonlítása során. Az értékek nem teljesítették a paraméteres tesztekkel szemben támasztott feltételeket (normáloszlás, varianciák homogenitása). Az elemzések során alkalmazott szignifikancia szint 5% volt. Az elemzéshez és a diagramok készítéséhez a StatSoft Statistica 7 szoftvert és a MS Excel 2016 programot használtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A diófa ágainak, rügyeinek és terméseinek fonalas gomba populációja a kora nyári időszakban

A négy felmért ültetvény általános állapota megfelelő volt (**3. ábra/A**), azonban több esetben az ágakon és a rügyeken is elváltozásokat figyeltem meg: egyes vesszők felületén termőtestek (**3. ábra/B**), léziók (**3. ábra/C**), valamint a belső szövetekben barna elváltozások alakultak ki (**3. ábra/D**). A minták laboratóriumi feldolgozása 113 tenyészetet eredményezett, melyekből a szakirodalomban található leírások alapján 7-7 darabot *Diaporthe* (**3. ábra/E**) és *Diplodia* (**3. ábra/F**) nemzetségbe soroltunk. A minták 25%-ában, valamint a mintázott fák 35%-ában megtalálható volt valamely általunk vizsgált patogén gomba. Ezen izolátumokat főleg tünetes növényi szövetekből izoláltuk. Egy-egy *Diplodia* izolátumot tünetmentes rügyből és tünetes zöld termésből, a többi *Diplodia* és a *Diaporthe* izolátumokat pedig tüneteket mutató fiatal ágakból tenyésztettük ki. A vizsgált növényi részekben jelentős volt az *Alternaria* spp. (45%) valamint a *Fusarium* spp. (15%) jelenléte.



3. ábra: (A) Hajdúdorogi dióültetvény. (B) Diófaág piknidiákkal a felületén (C) Fiatal ág barna lézióval (D) Külső és belső barnult szövetek. (E) *Diaporthe eres* PDA táptalajon (F) *Diplodia seriata* PDA táptalajon

Forrás: Saját felvétel

A *D. seriata* által fertőzött ágrészek külső részén nagy kiterjedésű barna elváltozások voltak megfigyelhetők, a metszést követően pedig a szállítószövetekben is megmutatkoztak a nekrotikus elváltozások (**3. ábra/C**). A fajt Újfehértóról (4 db), Hajdúdorogról (2 db) és Tarpáról (1 db) származó mintákból tenyésztettük ki.

A *D. eres* által okozott tünetek kisebb kiterjedésűek voltak, egyes esetekben azonban termőtestek jelentek meg a kéregrészen (**3. ábra/B**). A szállítószövetekben megfigyelhető elváltozások szintén kisebb mértékűek voltak a másik vizsgált kórokozó faj által kiváltott tünetekhez képest. A kórokozót Újfehértóról (3 db), Tarpáról (1 db) és Jánkmajtisról (3 db) gyűjtött növényi részekből izoláltuk.

A *Diplodia* tenyésztetek PDA táptalajon eleinte fehérek voltak, majd olajzöldekké és szürkévé váltak, melyhez pelyhes textúra párosult emellett bőséges, és gyors micéliumképződést figyeltünk meg (**3. ábra/F**).

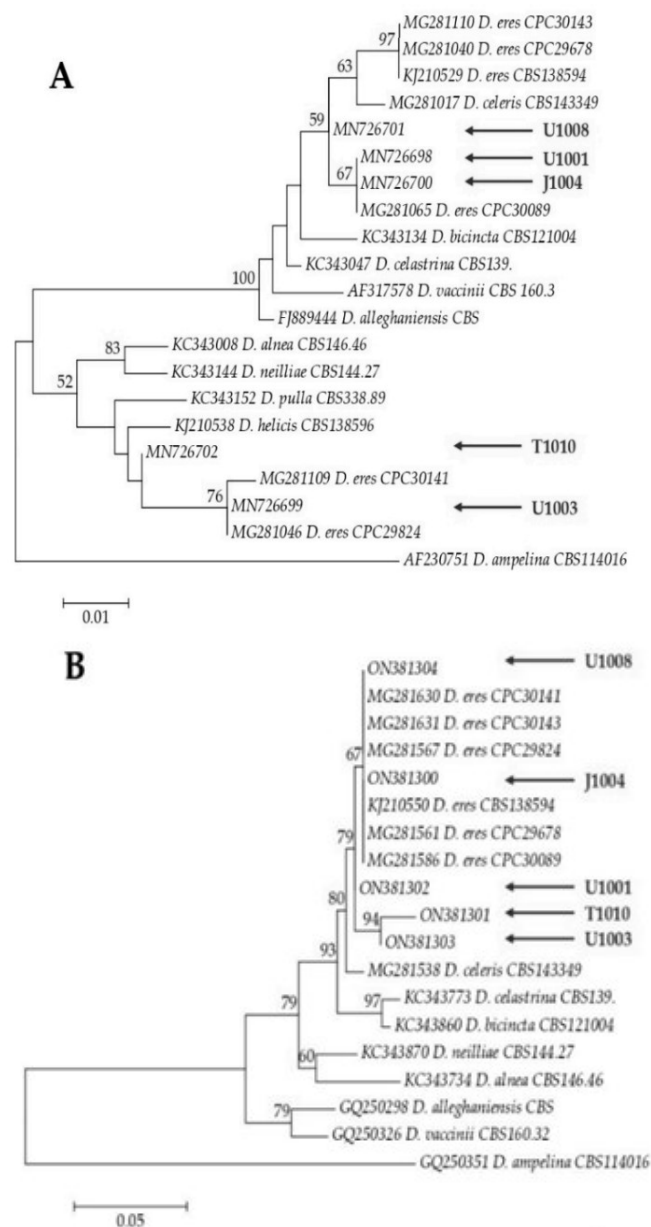
A *Diaporthe* nemzetségbe tartozó izolátumok PDA táptalajon lassú telepkezést mutattak, melyek kezdetben fehérek, majd piszkosfehérek, foltokban barnák voltak. A piknídiumok jól beazonosíthatók voltak 10 nap inkubáció elteltével, melyek koncentrikus köröket formáltak (**3. ábra/E**).

A molekuláris azonosítás során az ITS (500-530 bp) és a *tefl* (320-390 bp) fragmensek szekvenciaanalízise megerősítette, hogy a vizsgált izolátumok *D. seriata* és *D. eres* fajba sorolhatók, mely alátámasztotta a morfológiai vizsgálatok során tett megállapításainkat (**5. táblázat**).

5. táblázat: A diófa különböző részeiből kitenyésztett izolátumok, valamint az ITS és *tefl* PCR fragmentumokhoz kapcsolódó génbanki azonosító számaik

Faj	Izolátum száma	Származási hely	Növényi rész	Hozzáférési szám	
				ITS	<i>tefl</i>
<i>Diaporthe eres</i>	J1004	Jánkmajtis	Tünetes ág	MN726700	ON381300
	T1010	Tarpa	Tünetes ág	MN726702	ON381301
	U1001	Újfehértó	Tünetes ág	MN726698	ON381302
	U1003	Újfehértó	Tünetes ág	MN726699	ON381303
	U1008	Újfehértó	Tünetes ág	MN726701	ON381304
<i>Diplodia seriata</i>	D1012	Hajdúdorog	Tünetmentes rügy	MN726703	ON381305
	U1012	Újfehértó	Tünetes ág	MN726705	OP207880
	U1013	Újfehértó	Tünetes zöld termés	MN726704	OP207879
	D1011	Hajdúdorog	Tünetes ág	MN706194	-

Az ITS szekvenciák alapján készített törzsfá szerint két izolátum külön genetikai csoportba került a többi *Diaporthe* izolátumtól (**4. ábra/A**). A T1010-es törzs esetén a különbséget 18 bázis szubsztitúció és 4 deléció okozta. Az U1003-as törzs 22 bázis szubsztitúció és 3 deléció miatt tért el a másik csoporttól. A filogenetikai vizsgálatok alapján elmondható, hogy a *tefl* gén szerint mind az öt vizsgált *Diaporthe* izolátum szoros kapcsolatban állt a *D. eres* fajkompleksszel, más *D. eres* törzsekkel és egyéb *Diaporthe* fajokkal (**4. ábra/B**) (Dissanayake et al., 2017). Hilário és munkatársai nemrégiben végzett tanulmánya alapján ez a „fajkomplex” valójában egyetlen fajt képvisel (Hilário et al., 2021), ezért valamennyi magyarországi izolátumunk a *D. eres*-nek tekinthető.

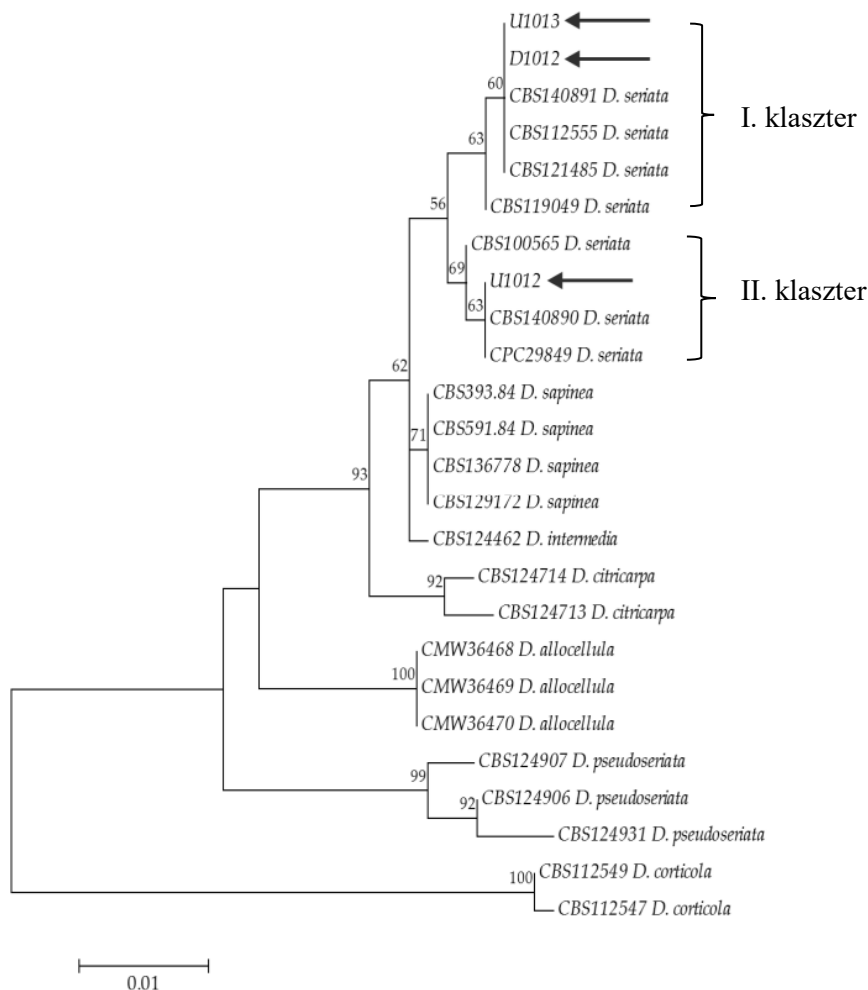


4. ábra: A *Diaporthe eres* fajkomplex Maximum likelihood módszerrel készült törzsfái (A) ITS és (B) *tef1* szekvenciák alapján.

Jelmagyarázat: A fajnevek előtt található az NCBI webszerver felületén deponált törzsek számai. A saját, dióból kitenyésztett izolátumokat nyíllal jelöltük. A *D. eres* faj típustörzseként a CBS 138594-es számú törzs szolgált. A törzsfa elágazásainak hossza arányos a nukleotid különbségek számával. Az elágazások felett feltüntetett értékek az 1000-szeres Bootstrap analízis eredményei. A törzsfán csak az 50%-nál nagyobb értékeket tüntettük fel. Csoporton kívüli izolátumként (a törzsfa gyökereztetéséhez)

Diaporthe ampelina kórokozó izolátumát használtuk

A *Diplodia* izolátumok közül kettő a *Diplodia seriata* De Notaris epitípusú CBS 112555 törzsszel került egy csoportba a filogenetikai analízis során a *D. seriata* fajkomplexen belül az ITS és *tefl* markerszekvenciák alapján (5. ábra). Az U1012-es törzs négy bázis szubsztitúció miatt került a II-es klaszterbe. Az ITS marker esetében az I-es klaszterbe sorolt törzsek szekvenciája 100%-ban azonosak volt a CBS 112555 törzs nukleotidsorrendjével. A harmadik *D. seriata* izolátum egy másik csoporttal alkotott klasztert, amelyet Zhang és munkatársai (2021) a közelmúltban közöltek.



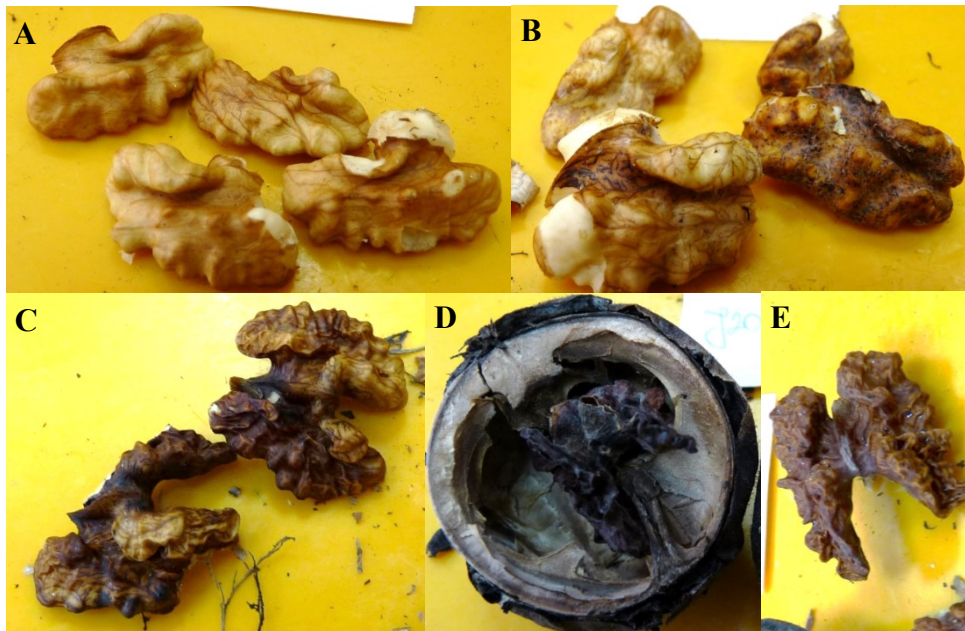
5. ábra: A *Diplodia seriata* izolátumok ITS és *tefl* markerek alapján készített törzsfája.

Típustörzsként a CBS 112555-es számú törzset alkalmaztuk.

Jelmagyarázat: A nyilak a saját *D. seriata* izolátumokat jelölik

4.2. Diótermések fonalas gombaközössége 2018-ban

A 2018 októberében gyűjtött 200 db dió feltörése során változatos tüneteket figyeltünk meg a bélállományokon (**6. ábra**).



6. ábra: Különböző mértékű tüneteket mutató diótermések és osztályozásuk.

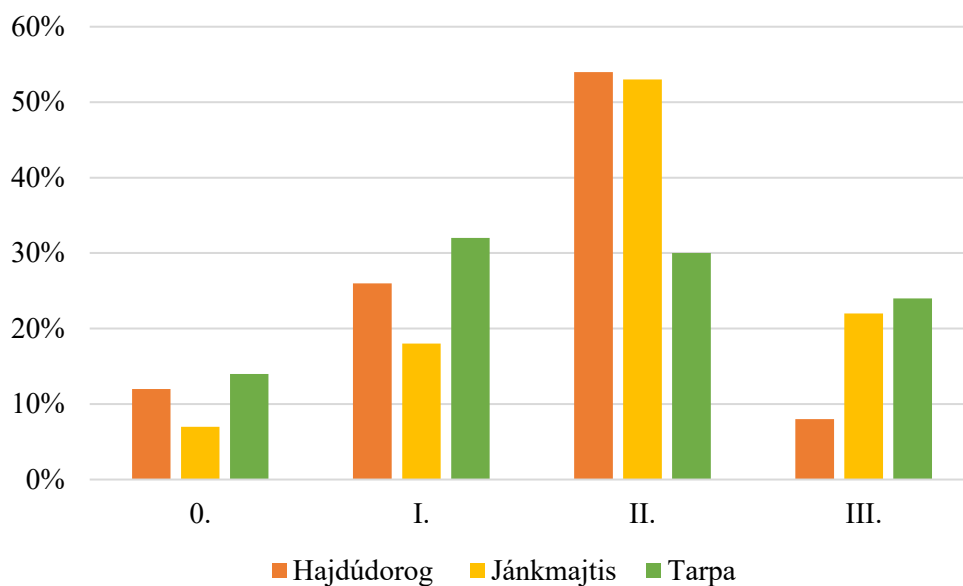
Jelmagyarázat: A: 0 - tünetmentes dió; B: I - pöttyös és hifával átszőtt bél; C: II - részben összeaszalódott, elszíneződött termés; D-E: III - elrothadt fekete bélállomány és teljes egészében összeaszalódott diótermés.

Forrás: Saját felvétel

A tünetek osztályozása eredményeként összességében tünetmentesnek ítéltük meg a termések 10%-át (0), 23%-át pedig az I. osztályba soroltunk. A legtöbb dióbél (48%) részben összeaszalódott állapotú volt, vagy a külső hártájuk elfeketedett, melyekhez II-es értéket rendeltünk, valamint a begyűjtött bélállományok 20%-a teljesen károsodott (III) (**6. ábra**).

A legkevesebb teljes mértékben elrothadt termést a hajdúdorogi mintavételi helyről gyűjtöttünk be. Az aszalódott és ezáltal fogyaszthatatlan bélállományok aránya (54%) azonban hasonló volt a másik két mintázott idősebb ültetvényhez tartozó adatokhoz (Jánkmajtis: 53%; Tarpa 30%).

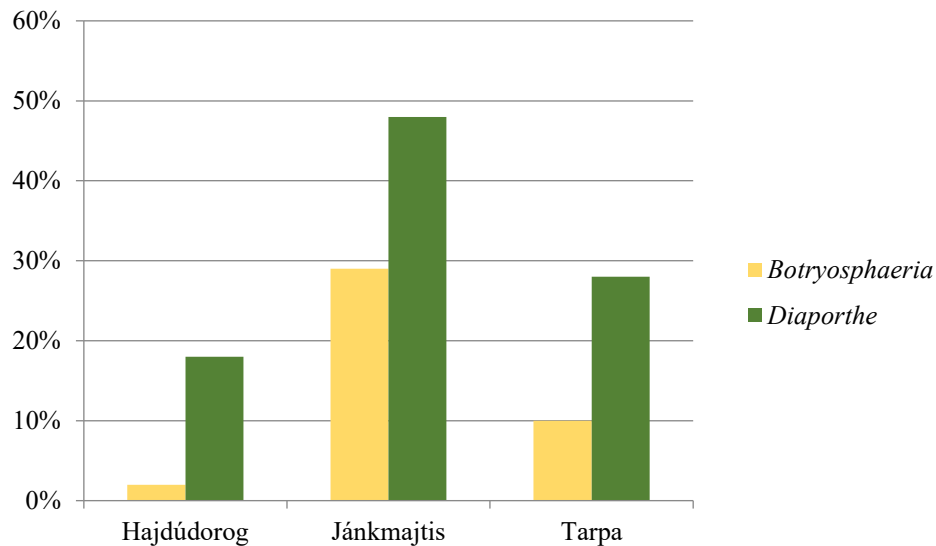
A tünetmentes és kisebb elváltozásokkal rendelkező termések aránya kisebb volt a jánkmajtisi ültetvény esetében a másik két helyszínhez képest, a teljes rothadást pedig Tarpáról gyűjtött minták esetén tapasztaltuk a legnagyobb arányban (24%) (**7. ábra**).



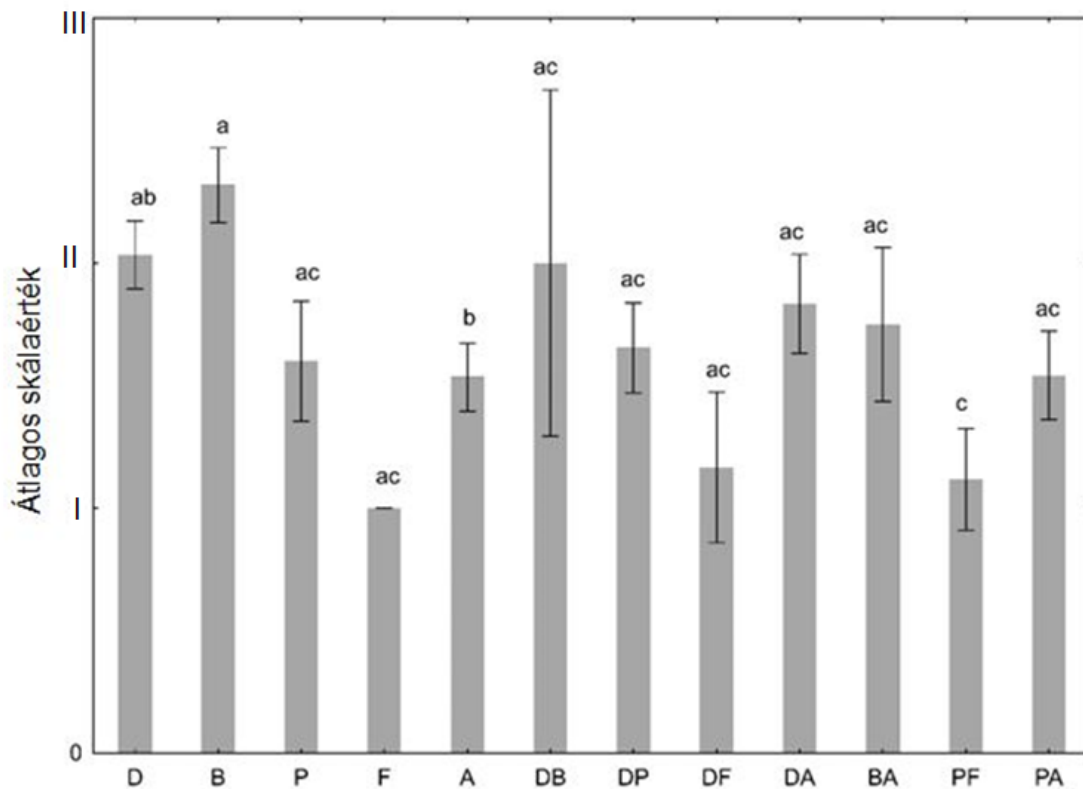
7. ábra: A 2018-ban begyűjtött termékek állapot szerinti osztályozásának eredménye a mintázott dióültetvényekben

A tiszta tenyészetek morfológiáját tanulmányozva öt nemzetség tagjai, *Alternaria* (31%), *Diaporthe* (26%), *Penicillium* (22%), *Botryosphaeria* (13%) és *Fusarium* (9%) spp. voltak jelen a vizsgált termékekben. Számos esetben egyetlen termésből több gomba nemzetséget is tudtunk izolálni. A nyári felméréssel ellentétben *Diplodia* nemzetségbe tartozó izolátumot nem tenyésztettünk ki, a *Botryosphaeria* fajok megjelenését pedig ebben a vizsgálatban tapasztaltuk először.

Botryosphaeria és *Diaporthe* fajokat a jánkmajtisi ültetvényben begyűjtött termékekből izoláltunk a legnagyobb arányban: összesen a termékek 77%-ából voltak kitenyészthetők. A mintavételi helyek tekintetében jelentős eltérést tapasztaltunk a kitenyésztett nemzetségek arányaiban. A Jánkmajtis közelében található területről származó termékek voltak a legfertőzöttebbek *Botryosphaeria* (29%) és *Diaporthe* (48%) fajokkal, amit a tarpai (*Botryosphaeria* spp. 10%, *Diaporthe* spp. 28%), majd a hajdúdorogi (*Botryosphaeria* spp. 2%, *Diaporthe* spp. 18%) ültetvény követett (8. ábra).



8. ábra: A *Botryosphaeria* és *Diaporthe* nemzetségek előfordulási gyakorisága a mintázott területekről származó diótermésekben



9. ábra: A diótermésekből izolált nemzetségek és a hozzájuk kapcsolódó átlagos skálaértékek.

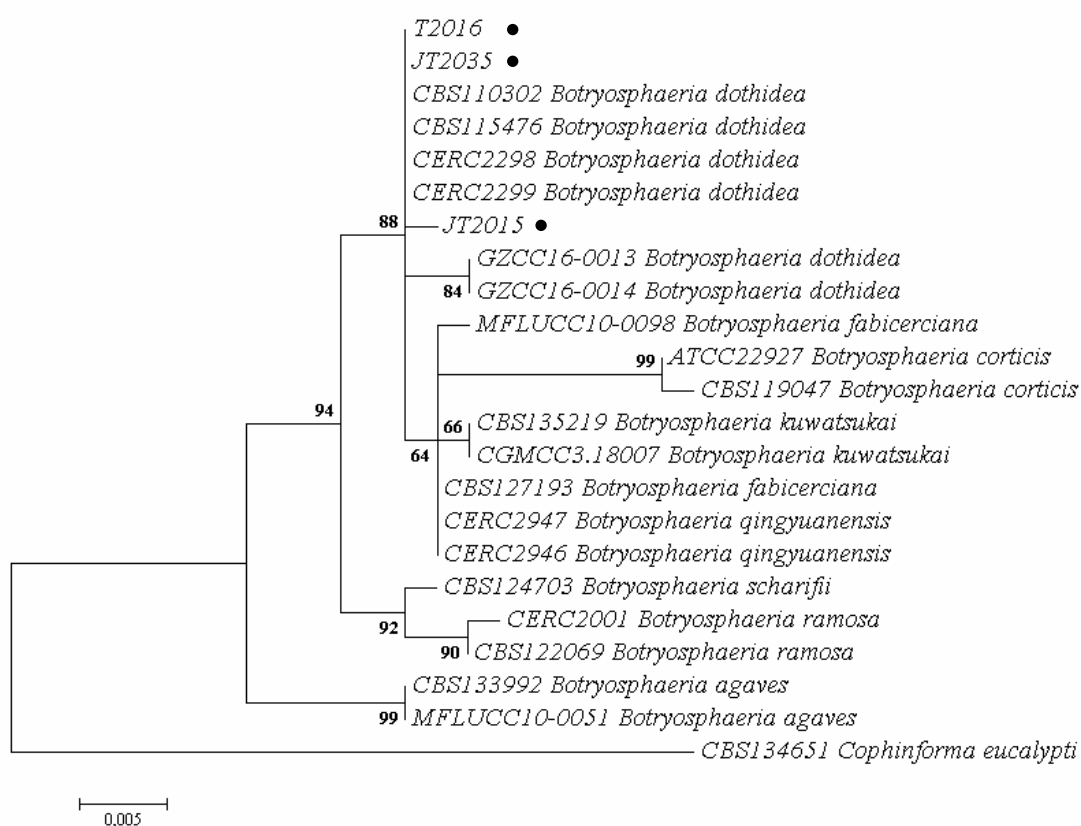
Jelmagyarázat: D=*Diaporthe* spp., B=*Botryosphaeria* spp., P=*Penicillium* spp., F=*Fusarium* spp., A=*Alternaria* spp. Az oszlopok felett található betűk a Mann-Whitney U teszt eredményeit jelentik. A hibasávok a standard hibát jelölik.

A skálaértékek és a nemzetségek közötti kapcsolatot is elemeztük (**9. ábra**), mely alapján elmondható, hogy a *Botryosphaeria* és a *Diaporthe* nemzetségek hozhatók leginkább összefüggésbe a tünetes termésekkel. Ezen túlmenően annak meghatározására, hogy a különböző nemzetségek milyen súlyos tünetekkel járó diókból származtak McKinney-indexet (Imc%) számoltunk (McKinney, 1923). Ennek alapján a *Diaporthe* (62%) és a *Botryosphaeria* (74%) fajok jelenléte állt kapcsolatban a súlyos tünetekkel (**6. táblázat**).

6. táblázat: Diótermésekből izolált nemzetségek és Imc értékeik

Nemzetség	Imc%
<i>Alternaria</i>	53%
<i>Botryosphaeria</i>	74%
<i>Diaporthe</i>	62%
<i>Fusarium</i>	38%
<i>Penicillium</i>	48%

A dióbelekből kitenyésztett kórokozó izolátumok egy részének ITS és *tefl* szekvenciáit amplifikáltuk és szekvenáltattuk (7. táblázat). A *Botryosphaeria* törzsek nukleotidsorrendjei 99%-os szekvenciaazonosságot mutattak a *B. dothidea* CBS110302 típustörzs ITS (AY259092) és *tefl* (AY573218) szekvenciáival, valamint ezen markerek kombinálásával készült törzsfá alapján is ebbe a fajba soroltuk őket (10. ábra). A *Diaporthe* izolátumaink szekvenciái 99-100%-ban azonosak voltak a CBS 138594 típustörzs ITS (OM698848) és *tefl* (OM752197) nukleotidsorrendjével, és utóbbi szekvenciáinak filogenetikai elemzése szerint a *D. eres* fajba tartoznak (11. ábra).

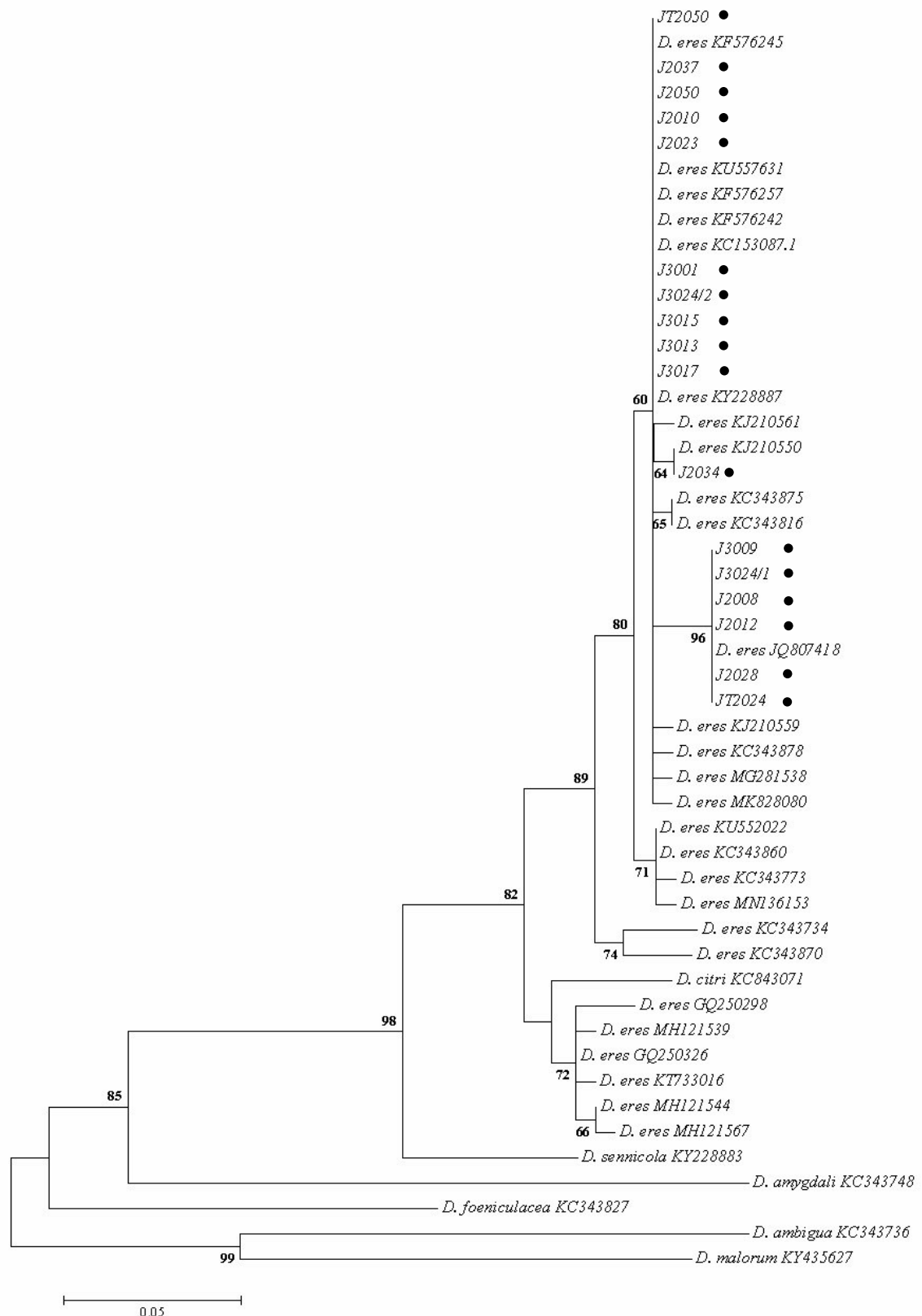


10. ábra: A kombinált ITS és *tefl* szekvencia-illesztés eredményeként Maximum likelihood módszerrel készült törzsfá. A diótermésekből kitenyésztett *Botryosphaeria dothidea* törzseinket (JT2015, JT2035 és T026), valamint Zhang és munkatársai (2021) tanulmányából származó törzseket tartalmaz. A fa gyökereztetéséhez egy *Cophinforma eucalypti* törzset alkalmaztunk.

Jelmagyarázat: A fekete pontok a saját *B. dothidea* izolátumokat jelölik

7. táblázat: A diófa különböző részeiből származó izolátumok és génbanki azonosítók

Faj	Izolátum	Növényi rész	Hely	ITS	TEF1
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	J2015	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	-	MT152102
	J2026	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	-	MT152106
	JT2015	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MN706192	MT152104
	JT2035	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111097	MT152105
	T2016	Tünetes dióbél	Tarpa	MT111096	MT152103
<i>Diaporthe eres</i>	J2008	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111104	MT152114
	J2010	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	-	MT152113
	J2012	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111099	MT152108
	J2023	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111101	MT152110
	J2028	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111105	MT152115
	J2034	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111103	MT152112
	J2037	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111106	MT152116
	J2050	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111100	MT152109
	JT2024	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111102	MT152111
	JT2050	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MT111098	MT152107
	JT2036	Tünetes dióbél	Jánkmajtis	MN706193	-
	J3001	Tünetmentes rügy	Jánkmajtis	MT111109	MT152118
	J3009	Tünetmentes rügy	Jánkmajtis	MT111112	MT152121
	J3013	Tünetmentes rügy	Jánkmajtis	MT111114	MT152123
	J3015	Tünetmentes rügy	Jánkmajtis	MT111110	MT152119
	J3017	Tünetmentes rügy	Jánkmajtis	MT111107	MT152117
	J3024/1	Tünetmentes rügy	Jánkmajtis	MT111115	MT152124
	J3024/2	Tünetmentes rügy	Jánkmajtis	MT111111	MT152120
	J3031	Tünetmentes rügy	Jánkmajtis	MT111113	MT152122

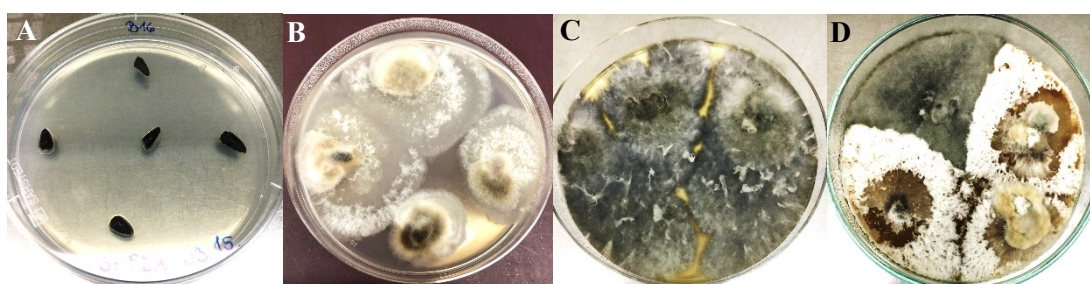


11. ábra: A *Diaporthe eres* fajkomplex *tef1* szekvenciát elemző Maximum likelihood filogenetikai törzsfája. A saját *D. eres* törzseket Hilário és munkatársai (2021) közleményében megtalálható törzsekkel vetettük össze. A törzsfát egy *Diaporthe malorum* törzs alkalmazásával gyökereztettük.

Jelmagyarázat: A fekete pontok a saját *D. eres* izolátumokat jelölik

4.3. A rügyek mikrobaközössége

A rügymintákat PDA táptalajra helyezve jól felismerhető telepek képződtek az inkubáció után (**12. ábra**). A kitenyésztés eredményeként a barkarügyekből legnagyobb arányban *Alternaria* és a *Diaporthe* nemzetségeket határoztunk meg (**8. táblázat**). A vizsgált tünetmentes rügyek 44%-ából a *Diaporthe* spp. voltak kitenyészthetők, míg *Botryosphaeria* spp. négy mintában voltak jelen. A termős rügyek esetén 40-40% volt a *Botryosphaeria* és a *Diaporthe* spp. aránya. A genetikai azonosítás eredményei a **7. táblázatban** találhatóak, mely alapján a *Diaporthe eres* fajkomplexbe sorolhatók a *Diaporthe* nemzetségbe sorolt törzsek.



12. ábra: A, Félbevágott porzós rügyek PDA táptalajon; B, Fehér színű *Diaporthe* tenyészet és sötétzöld *Alternaria* telep; C, Rügyből kitenyésztett *Botryosphaeria* tenyészet bőséges légmicéliummal; D, Szürkés *Alternaria* telep, mellette *Diaporthe* tenyészetek jellegzetes micéliumokkal.

Forrás: Saját felvétel

8. táblázat: A rügyekből izolált gomba nemzetégek aránya

Nemzetség	Barkarügy	Termésrügy
<i>Botryosphaeria</i> spp.	3%	40%
<i>Diaporthe</i> spp.	44%	40%
<i>Alternaria</i> spp.	59%	2%
<i>Epicoccum</i> spp.	3%	50%

4.4. Látens fertőzöttség meghatározása ONFIT technikával

Az ONFIT eljáráshoz júniusban gyűjtött 88 tünetes zölddió burkainak felszínén barna elváltozások és foltok voltak megfigyelhetők. A mintákat kettévágva láthatóvá vált, hogy több esetben az éretlen bél is elszíneződött (**13. ábra**).

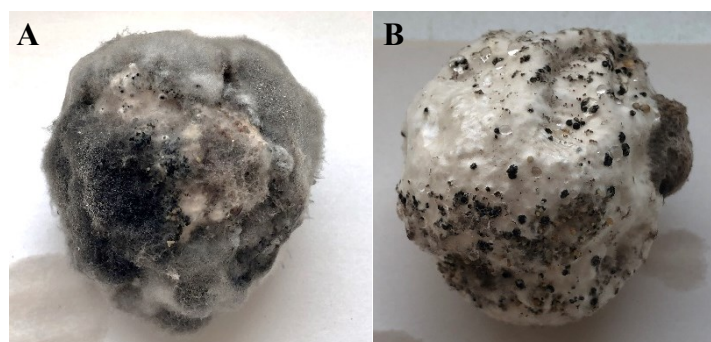


13. ábra: Megbarnult burok és belső szövetek

Forrás: Saját felvétel

Fagyasztás és inkubálás után kórokozó telepeket csak barna foltos és sérült diókon azonosítottunk. Az inkubációs idő eltelte után a fertőzött diókat gombatelepek borították. A *Diaporthe* gombával való fertőzöttség esetén jellegzetes fehér micélium jelent meg a burok felületén fekete piknídiumokkal, míg a *Botryosphaeria* spp. jelenlétére bőséges szürke micéliumokból következtethettünk (**14. ábra**).

A *Botryosphaeria* és *Diaporthe* nemzetség tagjait 59 zöld termésen azonosítottunk morfológiai jellemzőik alapján. A *Botryosphaeria* spp. 34 zöld burkon voltak megfigyelhetők, míg a *Diaporthe* fajokra jellemző kolóniák 50 mintán jelentek meg. Ugyanazon a termésen mindkét nemzetség tagjai 25 esetben jelentek meg.



14. ábra: A, *Botryosphaeria* spp. szürke bolyhos telepei éretlen dióburkon 14 napos inkubáció után; B, *Diaporthe* spp. által képzett fehér telep fekete piknídiumokkal

Forrás: Saját felvétel

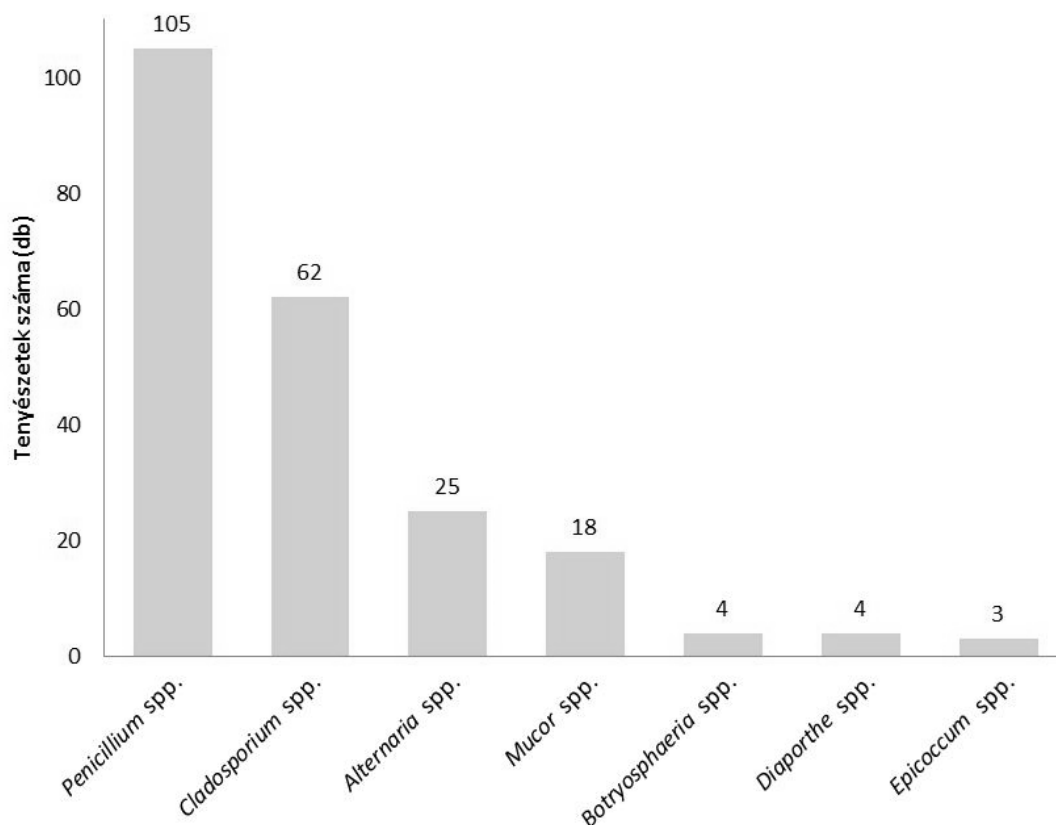
4.5. Diótermések gombaközösségének vizsgálata érett terméseken 2019-ben

Ebben az évben a mintázás során a három ültetvényből (Alsószentiván, Tarpa, Jánkmajtis) begyűjtött 135 diótermés általános állapota kedvezőbb volt az előző évben tapasztaltakhoz képest. A bélállományok szemrevételezése és osztályozása (6. ábra) során egy termést ítéltünk teljesen tünetmentesnek (0-s osztályzat), a minták nagy része (68,8%) enyhe tünetekkel, apró pöttyökkel rendelkezett (I. osztály). Elszíneződés és összeaszalódás a diók 18,5%-ánál volt megfigyelhető (II. osztály), a legsúlyosabb tüneteket jegyeztük fel a legkisebb arányban (12,5%) (III. osztály). Az két utóbbi osztályba sorolt terméseket fogyaszthatatlannak minősítettük, mely az alsószentiváni ültetvényből származó minták esetén 24% volt, míg a Kelet-Magyarországról gyűjtött termések 33%-át soroltuk ebbe a csoportba (9. táblázat).

9. táblázat: A 2019-ben gyűjtött diótermések csoportosítása a tünetek súlyossága szerint

Osztályzat	Alsószentiván (db)	Jánkmajtis (db)	Tarpa (db)
0	0	1	0
I	31	32	30
II	10	8	7
III	2	9	6

Morfológiai és molekuláris azonosítás során a tenyészeteket legnagyobb arányban *Cladosporium* és *Penicillium* nemzetségekbe soroltuk, de azonosítottunk *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Fusarium* és *Mucor* nemzetségekbe tartozó gombákat is (15. ábra). Számos esetben a termésekből egyszerre több nemzetségbe tartozó gombát tenyésztettünk ki. Nagyarányú előfordulásuk miatt a *Penicillium* spp. és a *Cladosporium* spp. kolonizálta a legtöbb, összesen 31 dió minta esetében együttesen a terméseket.



15. ábra: 2019 őszén gyűjtött diótermésekből izolált nemzetségekbe tartozó tenyészetek száma

A nemzetségek Imc-indexének (McKinney, 1923) meghatározásának eredményét az **10. táblázat** foglalja össze. A kisszámú kitenyésztés ellenére a *Botryosphaeria* és *Diaporthe* gombákkal fertőzött termések bizonyultak a legnagyobb mértékben károsodottnak.

10. táblázat: Diótermésekből izolált nemzetségek McKinney-indexe

Nemzetség	McKinney-index (%)
<i>Botryosphaeria</i> spp.	67
<i>Diaporthe</i> spp.	67
<i>Alternaria</i> spp.	51
<i>Penicillium</i> spp.	46
<i>Epicoccum</i> spp.	44
<i>Cladosporium</i> spp.	44
<i>Mucor</i> spp.	41

A mintavételi helyek között nagymértékű hasonlóság fedezhető fel a fő kitenyészett gomba nemzetség tekintetében, ugyanis a három ültetvényről gyűjtött 135 db diótermésben a *Penicillium* génusz fordult elő a legnagyobb arányban, 74%-ban (100 db termésben), az alószentivánról származó 42 db minta mindegyikében (**11. táblázat**). A *Cladosporium* fajok esetében eltérő képet kaptunk. Az alsószentiváni és a tarpai mintavételi helyen hasonló volt ezen nemzetések aránya (Alsószentiván: 58%, 25 db termés, Tarpa: 57%, 24 db termés), Jáankmajtis esetén csak a termések 24%-ából (12 db), volt kitenyészthető a nemzetség tagjai. *Diaporthe* nemzetségbe tartozó gombákat négy termésből izoláltunk, *Botryosphaeria* nemzetségbe tartozó gombát szintén négy dió esetében azonosítottunk, így együttesen a termések 6%-ában voltak jelen az általunk vizsgált diópatogén nemzetségek. Az *Alternaria* génuszba sorolható gombát a tarpai ültetvényből származó minták esetén detekáltunk a legnagyobb arányban, 36%-ban, 15 db termésben.

11. táblázat: A 2019-ben mintázott dióültetvényekből származó termések gombaközössége

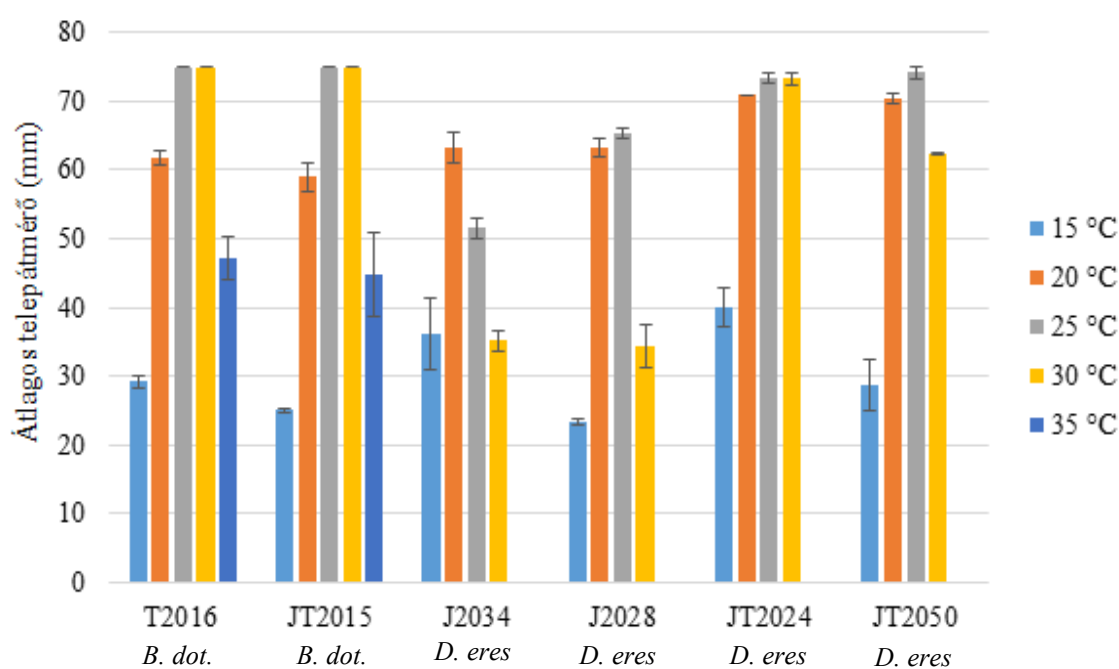
	Alsószentiván	Jáankmajtis	Tarpa
<i>Alternaria</i> spp.	14%	6%	36%
<i>Botryosphaeria</i> spp.	2%	6%	0%
<i>Cladosporium</i> spp.	58%	24%	57%
<i>Diaporthe</i> spp.	2%	2%	2%
<i>Penicillium</i> spp.	100%	81%	48%

A pontosabb filogenetikai azonosítás érdekében kilenc db *Penicillium* és három db *Cladosporium* génuszba sorolt izolátumot molekuláris vizsgálatnak vetettünk alá. Az ITS szekvenciák alapján mind a kilenc vizsgált *Penicillium* spp. izolátumok a *Penicillium crustorum*, *Penicillium commune* és *Penicillium expansum* fajokhoz álltak a legközelebb 99%-os szekvenciaegyezéssel. A három, *Cladosporium* nemzetségbe sorolt minták ITS lókuszaik szekvenciái pedig a *Cladosporium cladosporioides* és *Cladosporium pseudocladosporioides* fajok nuklotid sorrendjével egyezett a legnagyobb mértékben (100%).

4.6. Hőmérséklet hatása *Botryosphaeria* és *Diaporthe* izolátumok növekedésére

A teszt eredménye azt mutatta, hogy a hőmérséklet befolyásolta a micéliumnövekedést, különösen a 15 °C-os és a 35 °C-os inkubációs értékek esetén. A vizsgált patogén izolátumok növekedéshez szükséges optimális hőmérséklet eltérő volt, még nemzetségen belül is (16. ábra).

A JT2050 és JT2024 *Diaporthe eres* izolátumok minden hőmérsékleten hasonló növekedési ütemet mutattak, míg a másik kettő (J2034 és J2028) telepnövekedése lassabb volt, különösen 30 °C-on. A JT2015 és T2016 *Botryosphaeria dothidea* izolátumok telepképzése 30 °C-on gyorsabb volt a *D. eres* izolátumokhoz képest, valamint 35 °C-on csak ez a faj volt képes micéliumképzésre. Az egyre magasabb inkubációs hőmérséklet a *B. dothidea* izolátumok gyorsabb növekedésével járt, míg ez ellentétes hatást gyakorolt a *D. eres* izolátumokra.

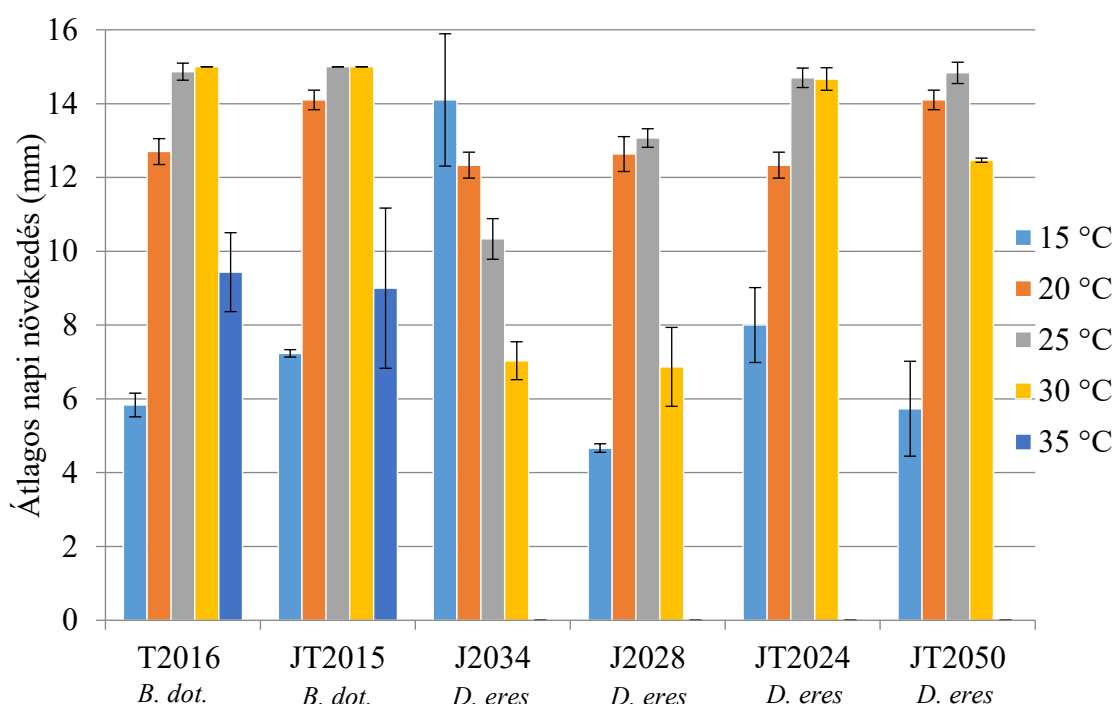


16. ábra: A *B. dothidea* és *D. eres* izolátumok telepnagysága különböző hőmérsékleteken történő hét nap inkubáció után

A hibasávok a standard hibát jelölik.

Jelentős különbségek voltak megfigyelhetők a nemzetségek és az izolátumok között a napi növekedésben különböző hőmérsékleteken (17. ábra). 15 °C-on két *Diaporthe eres* izolátum növekedése volt a leggyorsabb, azonban a másik két *D. eres* és a *B. dothidea* törzs hasonló ütemben növekedtek.

A JT2024-es *D. eres* izolátum napi növekedése a hőmérséklet emelkedésével 30 °C-ig folyamatosan nőtt, míg a másik három *Diaporthe* izolátum növekedési üteme 25 °C fölötti hőmérsékleten csökkent. A két *B. dothidea* izolátum a magasabb hőmérsékletet részesítette előnyben, ugyanis 35 °C-on nagyobb volt a növekedési sebességük, mint 15 °C-on.



17. ábra: A *Botryosphaeria dothidea* és *Diaporthe eres* izolátumok napi növekedése különböző hőmérsékleteken történő inkubáció esetében

A hibasávok a standard hibát jelölik.

4.7. Patogenitási teszt éretlen diótermésen

A diófa különböző részeiből izolált fajok tiszta tenyészetével végzett patogenitási vizsgálat során az *in vitro* mesterséges fertőzést követően három hét alatt teljesen elrothadt a zöld burok a minták 81%-ánál. Az összes vizsgált *Diaporthe eres* és *Diplodia seriata* izolátum nagy, sötét nektrózist okozott az eredetileg zöld dióburkon (18. ábra).



18. ábra: *D. eres* és *D. seriata* által okozott tünetek dióburkon (A) és bélállományon (B, C)

Forrás: Saját felvétel

A legtöbb dióbél esetén a tünetek enyhébb módon jelentek meg, mint a burokon, vagy kialakulásuk több időt igényelt volna. A tünetek azonban megjelentek a bélállományokon is fonalak, sötét foltok és nekrotikus részek formájában is három héttel a mesterséges fertőzést követően (18/B, C ábra).

Az ismételések során a kórokozók hasonló rothadásos tüneteket váltottak ki. A steril PDA koronggal inokulált kontroll terméseken az értékelés napjáig nem jelent meg elváltozás. A kórokozók által okozott tünetek súlyosságára vonatkozó számszerűsített fertőzési arányokat a **12. táblázat** foglalja össze.

12. táblázat: *D. eres* és *D. seriata* izolátumok éretlen dióburokra és bélállományra vonatkozó átlagos McKinney-indexe (Imc%).

	Imc% ± SD	
	<i>Diaporthe eres</i> Nitschke ^a	<i>Diplodia seriata</i> De Not. ^b
Burok	93 ± 16	87 ± 12
Bél	69 ± 16	50 ± 14

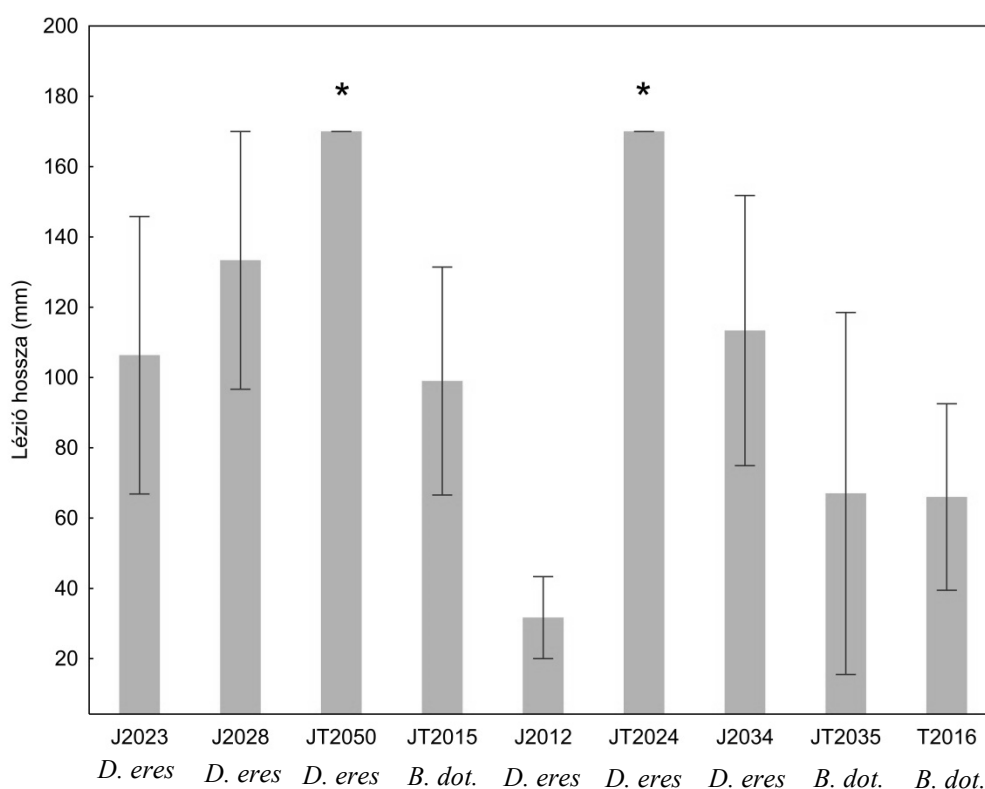
^aAz értékek az öt izolátum átlagát jelentik ± az átlagok szórása

^bAz értékek a három izolátum átlagát jelentik ± az átlagok szórása

Megfigyeltük, hogy a *D. eres* izolátumok mind a burokon, mind a beleken súlyosabb nekrosis tüneteket okoztak, vagy a betegség gyorsabban fejlődött kísérleti körülmények között, mint a *D. seriata* izolátumokkal történő megfertőzések esetében, bár mindkét faj előidézett teljes rothadást. A patogén gombák visszaizolálása sikeres volt a mesterségesen fertőzött mintákból, a kontrollok esetén nem volt kitenyészhető kórokozó.

4.8. Diófa ágak patogenitási tesztje tünetes diótermésekből izolált kórokozókkal

A diófa ágak *Diaporthe eres* és *Botryosphaeria dothidea* izolátumokkal történő inokulálása során az ágrészeken minden esetben léziók jelentek meg három hét elteltével (**19. ábra**). A *D. eres* gombákkal inokulált ágak esetén jelentős elváltozásokat figyeltünk meg hosszanti (**20. ábra/B**) és horizontális (**20. ábra/D**) keresztmetszet mentén is, míg a kontroll növényi részek esetében egészségesek maradtak a szövetek (**20. ábra/A, C**).



19. ábra: *Diaporthe eres* és *Botryosphaeria dothidea* izolátumokkal

inokulált ágakon keletkezett elváltozások mérete

A csillagokkal jelölt oszlopok értékei szignifikáns különbséget mutattak a kezelés hatására ($p < 0,05$)

A J2012-es izolátum kivételével jelentős kiterjedésű barna elváltozásokat okoztak az ágak belső szöveteiben. A JT2014-es és a JT2050-es törzsek az ág teljes hosszában nekrotikus léziókat váltottak ki. A szórás nagymértékű volt minden esetben, ahol nem teljes terjedelmében barnultak el az ágak szövetei (**17. ábra**). A steril PDA koronggal kezelt ágak tünetmentesek maradtak, és a visszaizolálás is a kórokozókkal inokulált minták esetén volt sikeres.



20. ábra: Hosszában (A, B) és horizontálisan (C, D) megmetszett kontroll (A, C) és *D. eres* izolátummal inokulált (B, D) diófa ágak három hét inkubációs idő után

Forrás: Saját felvétel

A három vizsgált *B. dothidea* izolátum által okozott léziók átlagos kiterjedése kisebb mértékű volt, mint a *D. eres* fajba tartozó törzsekkel történő megfertőzés esetén (a J2012-es izolátum kivételével), azonban az ismétlések közötti különbség nagymértékű volt. Mindhárom *B. dothidea* izolátum képes volt nagy kiterjedésű léziót okozni minden inokulált ágon, mely nem csak a kéreg alatti részen (**21. ábra/A**), hanem a belső szöveteken is megfigyelhető volt (**21. ábra B**).

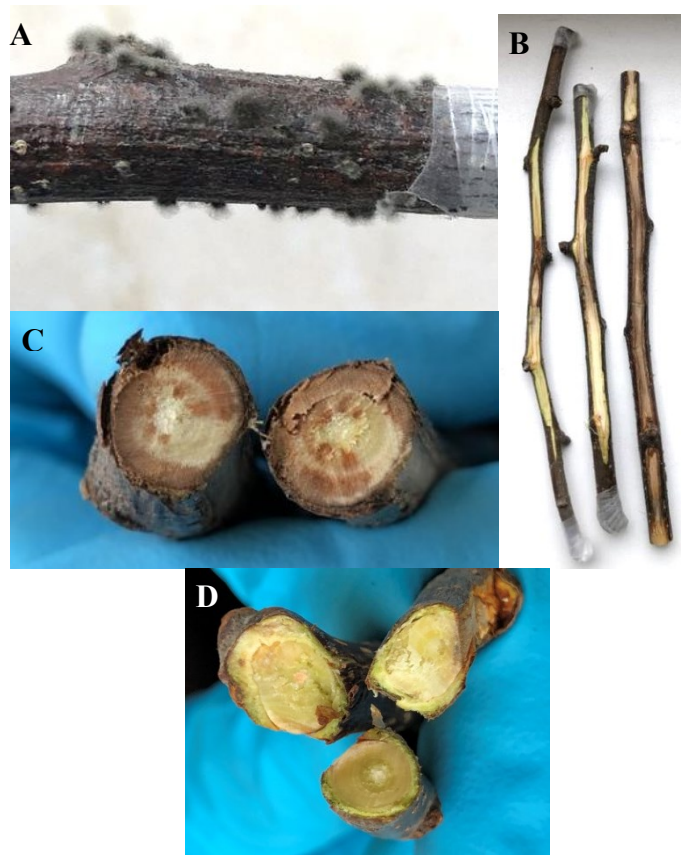


21. ábra: *B. dothidea* fajjal inokulált diófa ágak barna elváltozásai a kéreg alatti részen (A) és a belső szövetekben (B) három hét inkubációs idő után

Forrás: Saját felvétel

4.9. Almafa ágainak inokulálása tünetes diófa szövetekből izolált kórokozókkal

A *Botryosphaeria dothidea* izolátummal történő inokulációt követő harmadik hétre szabad szemmel is megfigyelhető hifák és konídiumtartók keletkeztek az ág felületén a mesterséges fertőzés környékén (**22. ábra/A**). Négy hét elteltével a minták hosszanti keresztbemetszését követően jól megfigyelhetők voltak a patogének terjedésének útjai a szállítószövetekben (**22. ábra/B**). A belső szövetek állapotának felmérésére során is súlyos nekrotikus elváltozásokat figyeltünk meg (**22. ábra/C**), melyek nem voltak jelen a kontroll ágaknál (**22. ábra/D**).



22. ábra: *B. dothidea* által okozott tünetek

Jelmagyarázat: A: két héttel; B, C: négy héttel az inokulálást követően; D: kontroll

Forrás: Saját felvétel

A dióágból izolált *Diplodia seriata* a szintén Botryosphaeriaceae családba tartozó *B. dothidea* izolátumhoz hasonló szimptómákat okozott. Már két héttel a fertőzést követően fekete elváltozások jelentek meg a sebzés mentén. Az utolsó vizsgálati időpontban a minták kergét lehántottuk (**23. ábra/A**), majd horizontális irányban is kettévágtuk (**23. ábra/B**), mely során barna léziókat figyeltünk meg a külső szöveteken kialakult tünetekhez képest nagy terjedelemben. Az ágak horizontális keresztmetszetének szemrevételezésekor megállapítottuk, hogy a patogén a mélyebb szövetekbe is bejutott.



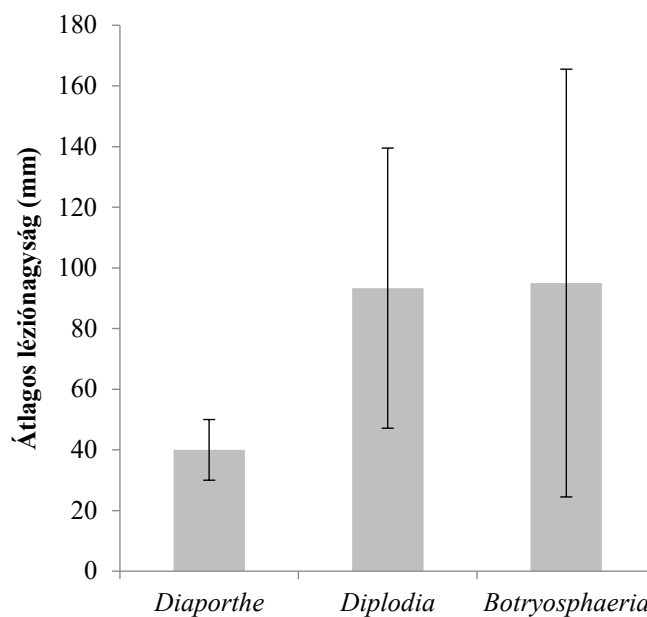
23. ábra: *D. seriata* gombával fertőzött almafa ágak
Jelmagyarázat: A: hossz-, B: keresztmetszetben, C: kontroll
Forrás: Saját felvétel

A mesterségesen megfertőzött ágakon tüneteket okozott a JT2036 *D. eres* törzs is. Az első vizsgálati időpontban a három ismétlésből csupán az egyik minta felületén volt megfigyelhető nagyobb terjedelmű barnulás. A külső kéreg eltávolításakor láthatóvá vált, hogy elindult a szövetek kolonizálása, de nem alakult ki nagy kiterjedésű barnulás (24. ábra/A). Az ágak keresztmetszetén láthatóvá vált négy hét inkubációt követően, hogy a legbelső szöveteket nem volt képes kolonizálni a gomba (24. ábra/B).



24. ábra: *D. eres* izolátummal megfertőzött ágak
Jelmagyarázat: A: hossz-, B: keresztmetszet
Forrás: Saját felvétel

Mind a két Botryosphaeriaceae családba tartozó törzs nagy kiterjedésű elhalást okozott, habár nagymértékű szórást tapasztaltunk az elváltozások méretét illetően. A *D. eres* esetén az ismétlések hasonló képet mutattak, és a léziók ezzel a gombával történő inkuláció esetén voltak a legkisebb kiterjedésűek (25. ábra).



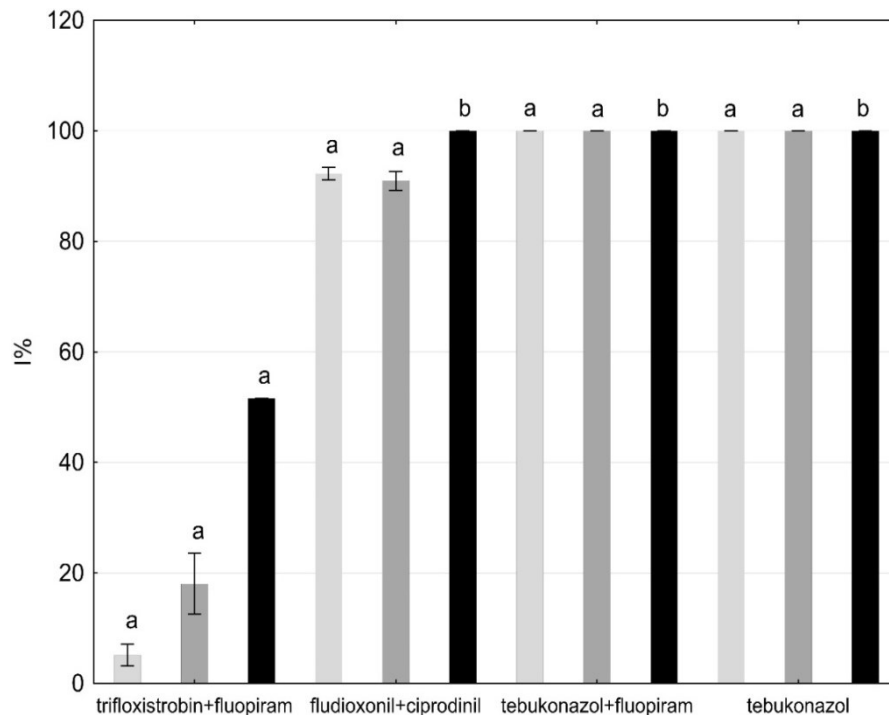
25. ábra: A patogén gombák által okozott barna elváltozások átlagos mérete

A hibásávok a szórást jelölik (SD)

4.10. Fungicidek hatása a dió terméskárosodását okozó gombákra

A mérgezett agaros teszt során a két *Diaporthe eres* és a *Botryosphaeria dothidea* izolátumokra hasonló módon hatottak a gombaölő szerek, a *B. dothidea* kismértékben érzékenyebbnek bizonyult (**26. ábra**).

Az izolátumok leoltása a legalacsonyabb üzemi koncentrációval kezelt táptalajra egyedül a fluopiram + trifloxistrobin alkalmazása mellett eredményezett számottevő telepképződést, az inhibíció ebben az esetben legalább 5% volt. A legnagyobb mértékben a *B. dothidea* izolátum növekedését gátolta ezen készítmény (Luna Sensation) (GI=51,6%) (**26. ábra**).



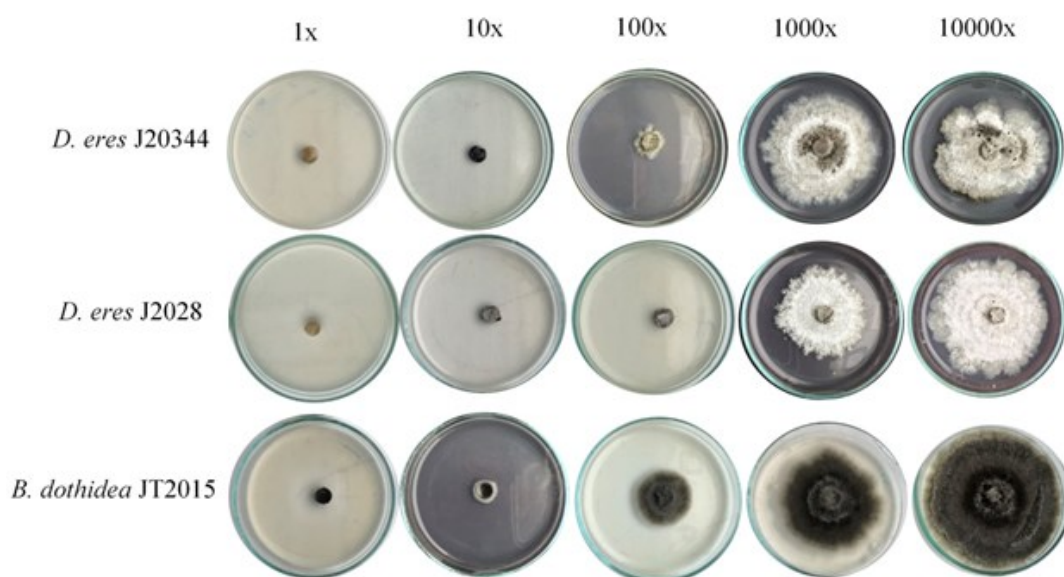
26. ábra: A különböző kémiai növényvédő szerek üzemi dózisban alkalmazott hatása a vizsgált törzsek micéliális növekedésére

Jelmagyarázat: *D. eres*: J2028, világosszürke oszlop; J2034, sötétszürke oszlop. *B. dothidea*: JT2015, fekete oszlop

A betűjelek a Mann-Whitney U teszt szerinti statisztikai csoportokat jelölik ($p < 0,05$).

4.11. A 25% tebukonazol-tartalmú készítmény EC50 értékének meghatározása

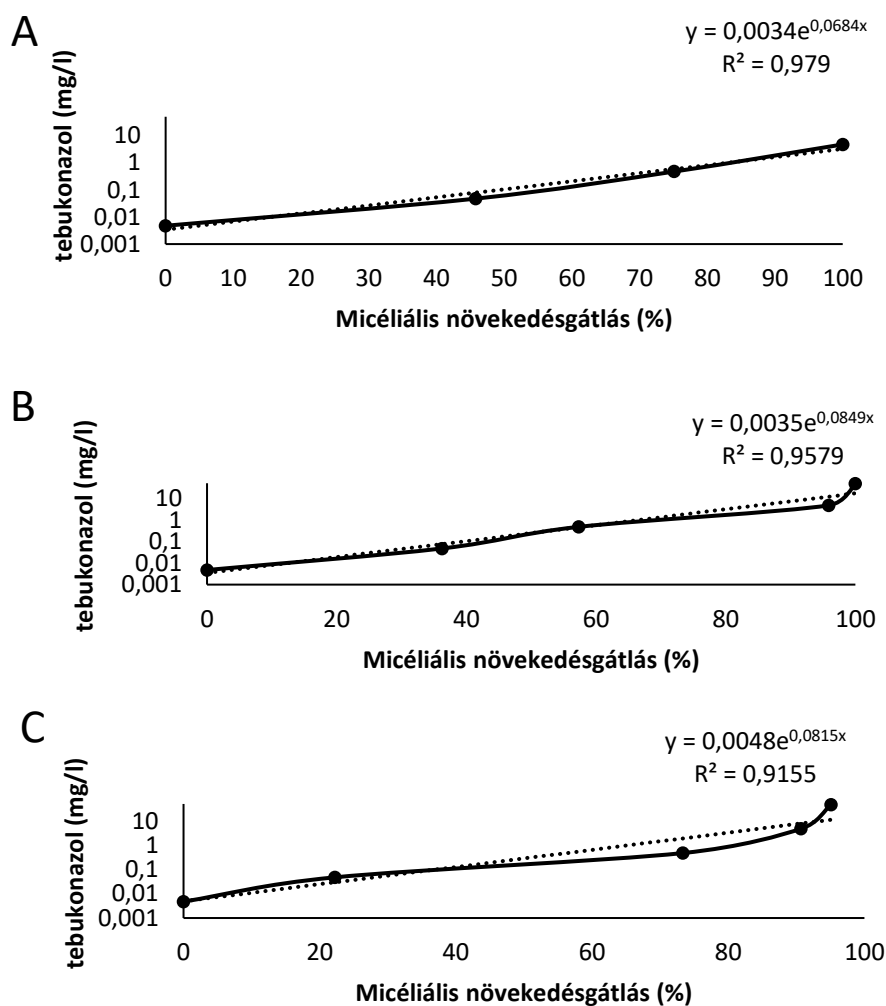
A tebukonazol tartalmú növényvédő szerrel kezelt táptalajra leoltott gombák közül a J2028-as *Diaporthe eres* izolátum volt a legérzékenyebb, ugyanis a legalacsonyabb üzemi koncentráció 1000-szeres hígításának alkalmazásakor volt csak képes telepkepzésre, míg a JT2015-ös, *Botryosphaeria dothidea* gomba esetén már az üzemi koncentráció 10-szeres hígítását tartalmazó mérgezett agarlemezeken növekedést tapasztaltunk. Összességében elmondható, hogy az 1000-szeres hígítástól számítva jelentősen csökkent a gátló hatás, ugyanis ezen dózis alkalmazását követően jelentősen csökkent a micéliális gátlás mind a három vizsgált izolátum esetében (**27. ábra**).



27. ábra: A vizsgált patogén gombák sorozathígításos mérgezett agarlemezeken, PDA táptalajon, 14 nap inkubációt követően.

Forrás: Saját felvétel

A növényvédő szer EC50 értékének kiszámításánál a lineáris regresszió-analízis készítésekor a legmagasabb tebukonazol koncentrációt nem vettük figyelembe a két *D. eres* izolátum esetében, mert a nagyon magas gátlási érték (nagyon kis telepátmérő) meghatározása már bizonytalan, nem volt arányos az eltérés a két legmagasabb koncentráció között (**28. ábra**).



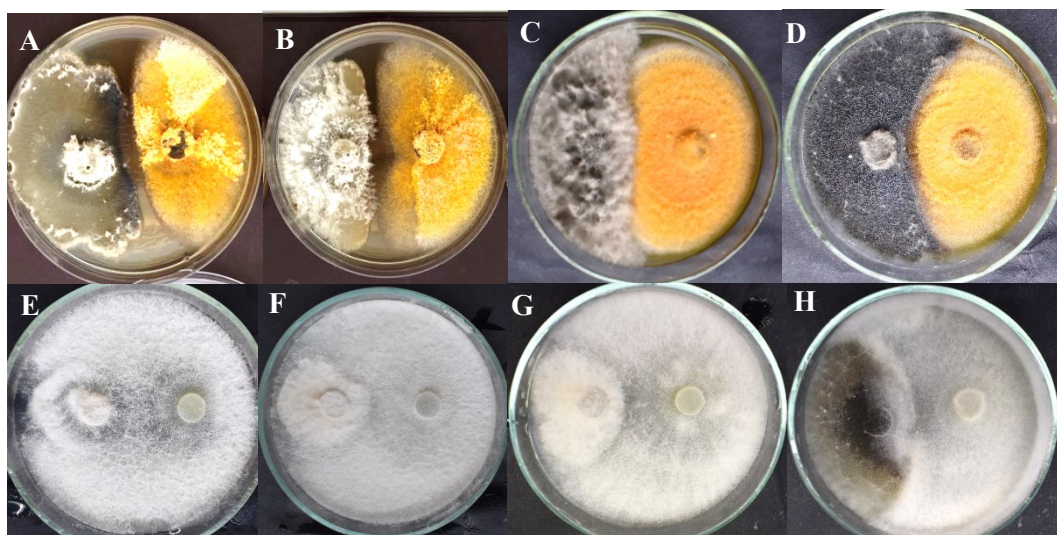
28. ábra: A tebukonazol különböző koncentrációinak hatása a vizsgált patogén gombák micélium növekedésére, a hozzájuk tartozó lineáris regressziós egyenesek, és az egyenlet alapján kiszámított EC50 érték

Jelmagyarázat: A: J2028 (*D. eres*); B: J2034 (*D. eres*); C: JT2015 (*B. dothidea*)

A kiszámított EC50 értékek összhangban állnak a tenyészetek értékelésekor megfigyelt információkkal, ugyanis ezek alapján a J2028-as *D. eres* törzs a legérzékenyebb a tebukonazzal szemben (EC=0,1 mg/l) amit a másik tesztelt *D. eres* követett (EC=0,24 mg/l). A legkevésbé érzékenynek a JT2015-ös *B. dothidea* bizonyult a felmérés során (EC=0,28/l).

4.12. Az *Epicoccum nigrum* és a *Trichoderma gamsii* antagonisták vizsgálata

A konfrontációs tesztben szereplő tünetes diótermésből és –ágból származó patogén gombákat gátolta a diórügyből izolált *Epicoccum nigrum* és a TR08-as *Trichoderma gamsii* egyaránt, azonban a két törzs gátlásának mértéke, azaz a BCI értéke és mechanizmusa jelentősen eltért (29. ábra, 13. táblázat).



29. ábra: *E. nigrum* és *T. gamsii* antagonizmus hatása direkt konfrontációban *D. eres*, *B. dothidea* és *D. seriata* izolátumokkal szemben

Jelmagyarázat: *E. nigrum*: A-D; *T. gamsii* E-H; *D. eres*: A, B, E, F; *B. dothidea*: C, G; *D. seriata*: D, H

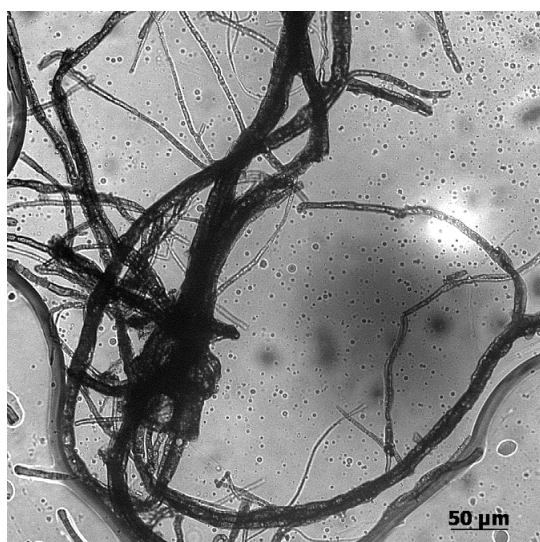
Forrás: Saját felvétel

Az *E. nigrum* gátolta a vizsgált diópatogének micéliális növekedését, azonban az antagonista nem volt képes ránőni a kórokozókra (29. ábra, A-D). A *D. eres* izolátumok esetén gátlási zóna kialakulását figyelhattuk meg (29. ábra, A, B). A Botryosphaeriaceae család vizsgált két tagjának növekedését kisebb mértékben gátolta (13. táblázat)

A *T. gamsii* Biokontroll Indexe 100% volt minden esetben (29. ábra, E-H; 13. táblázat), mivel az antagonista ránőtt a diópatogén gombák telepeire. A pusztító hatás jól tanulmányozható volt mikroszkópos megfigyeléssel, mely során a TR08-as hifái rátekeredtek a patogén izolátum fonalaira (30. ábra).

13. táblázat: A konfrontációs teszt eredményei alapján kapott gátlási indexek (átlag $\pm$ SE).

Faj	Izolátum	Gátlási index (%)	
		<i>E. nigrum</i>	<i>T. gamsii</i>
<i>Diaporthe eres</i>	J2034	53 $\pm$ 2,9	100
<i>Diaporthe eres</i>	J2028	52 $\pm$ 1,5	100
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	JT2015	49 $\pm$ 1,8	100
<i>Diplodia seriata</i>	D1011	47 $\pm$ 0,9	100



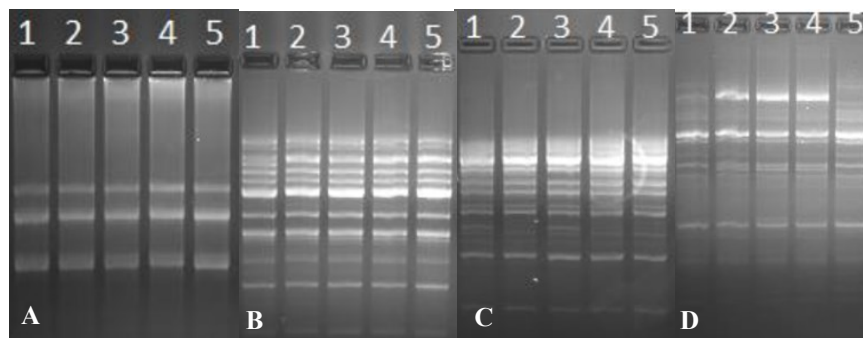
30. ábra: *T. gamsii* hajszálszerű fonalainak rátekeredése *D. seriata* tenyészetének vasatagabb hifáira

Forrás: Saját felvétel

4.13. A törzsek mikroszatellitjeinek vizsgálata

Az amplifikáció során alkalmazott primerek a legtöbb esetben megfelelő mennyiségű fragmenseket eredményeztek, egyedül az (ACAC)₅ primer használata esetén nem kaptunk tanulmányozható allélprofil a *Botryosphaeria dothidea* izolátumok analízisekor, ahol három fragmentumot eredményezett a futtatás, mely mind az öt izolátum esetén megtalálható volt (**31. ábra**).

Ugyanezen fajt vizsgálva az M15-ös primerrel felszaporított szakaszok bizonyultak a legpolimorfabbnak 15 terméket képezve, melyek közül négy termék nem jelent meg minden *Botryosphaeria* izolátum esetében (**31. ábra/D**). A (GGA)₇ primer 12 db termékéből (**31. ábra/B**) valamint a (GTG)₅ 10 db fragmentumot kapott mintázatából (**31. ábra/C**) is 1-1 termék nem jelent meg minden izolátumnál. A *Diaporthe eres* faj esetében állt rendelkezésünkre a legtöbb, összesen 25 db izolátum (**32, 33. ábra**).

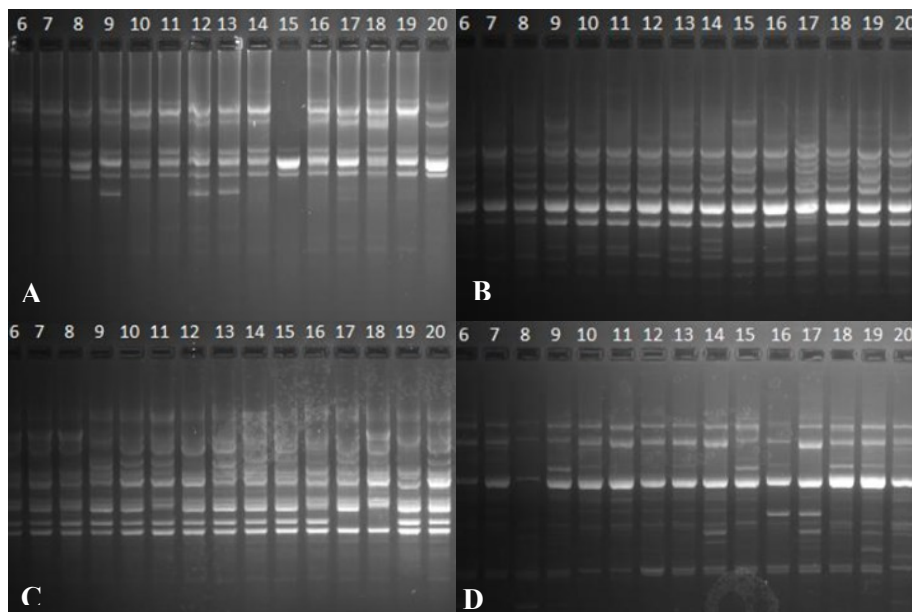


31. ábra: *Botryosphaeria dothidea* izolátumok mikroszatellitjei
Jelmagyarázat: A: (ACAC)₅; B: (GGA)₇; C: (GTG)₅; D: M15 primereket
alkalmazva

Az egyes sávok feletti számok az izolátumok megnevezéseit jelölik.

1: J2015; 2: T2016; 3: JT2015; 4: JT2035; 5: J2026

Forrás: Saját felvétel



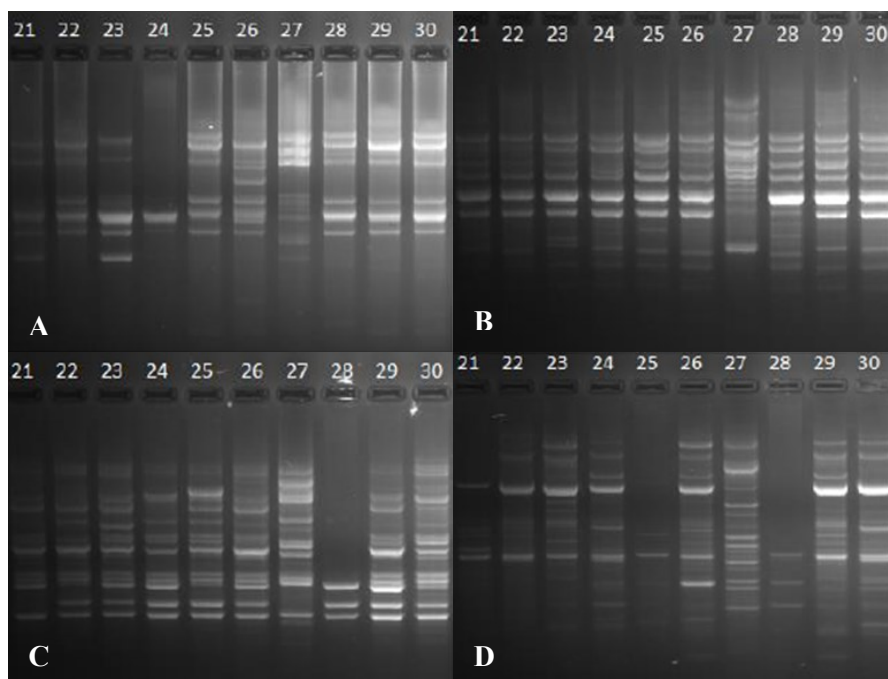
32. ábra: *Diaporthe eres* fajba tartozó izolátumok allélprofiljai

Jelmagyarázat: A: (ACAC)₅; B: (GGA)₇; C: (GTG)₅; D: M13 primerekkel
felszaporítva

6: JT2050; 7: J2012; 8: J2050; 9: J2023; 10: JT2024; 11: J2034-2; 12: J2010;
13: J2008; 14: J2028; 15: J2037; 16: J3017; 17: J3001; 18: J3015; 19: J3024;
20: J3009

Forrás: Saját felvétel

Ahogy a *Botryosphaeria* izolátumoknál is, ennél a nemzetségnél is az M13 kezdőszekvenciák alkalmazásával jött létre a legtöbb termék, azonban ebbe a fajba tartozó gombák esetén a 20 termékből egy jelent meg mind a 25 izolátum mintázatában (32. ábra/D, 33. ábra/D). Egy-egy fragmentum jelent meg mindegyik izolátum mintázatában az (ACAC)₅ és (GTG)₅ primerek használatakor is. Ezekben a reakciókban 13 allélt különítettünk el mindkét esetben (32. ábra/A, C; 33. ábra/A, C). A (GGA)₇ primer alkalmazása során három allél volt megfigyelhető mind a 25 db *D. eres* izolátumnál (32. ábra/C, 33. ábra/C).



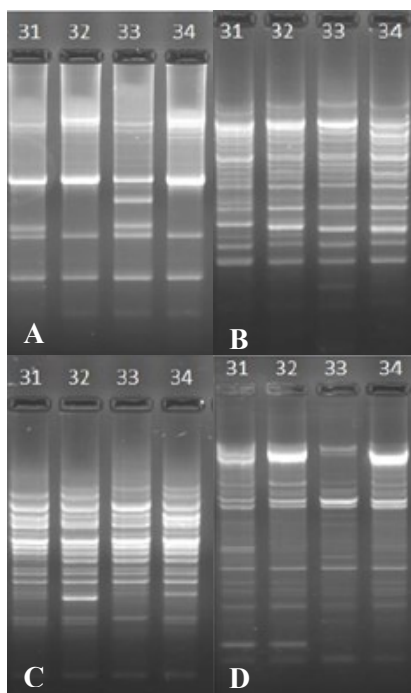
33. ábra: *D. eres* izolátumok mikrosztallit primerekkel felszaporított PCR termékei

Jelmagyarázat: A: (ACAC)₅; B: (GGA)₇; C: (GTG)₅; D: M13

21: J3031; 22: J3013; 23: J3024-1; 24: U1001; 25: U1003; 26: J1004; 27: J1005; 28: U1006; 29: U1008; 30: T1010

Forrás: Saját felvétel

A *Diplodia seriata* izolátumok DNS fragmenseinek gélen futtatása látványos fazon belüli eltéréseket tárt fel (**34. ábra**). Az (ACAC)₅ primer jelenlétében összesen csupán kilenc termékből álló profilt kaptunk, melyekből négy olyan allél volt, mely nem fordult elő mindegyik mintában (**34. ábra/A**). A legtöbb terméket, szemben a másik két vizsgált gombafajjal a (GGA)₇ (**34. ábra/B**) és (GTG)₅ (**34. ábra/C**) indítószekvenciák alkalmazása eredményezte, számszerint 19-et, melyből hét-hét allélnál találtunk különbözőségeket. Az M13 primer esetén a 16 létrejött termékből nyolc termék megjelenésében volt eltérés az izolátumok között (**34. ábra/D**).



34. ábra: *Diplodia seriata* izolátumok mikroszatellit primerekkel
felszaporított DNS termékeinek gélfotója

Jelmagyarázat: A: (ACAC)₅; B: (GGA)₇; C: (GTG)₅; D: M13

31: D1011; 32: D1012; 33: U1013; 34:U1014

Forrás: Saját felvétel

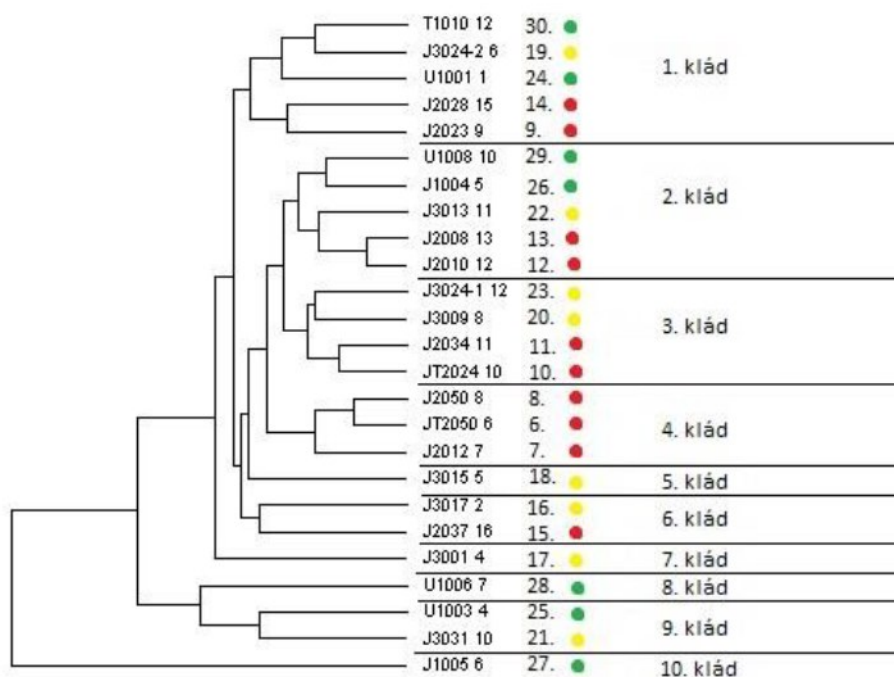
A PCR reakciók során 165 különböző allélt detektáltunk, melyből 67 db mérete 850-1500 bp volt, valamint ezekből 36 db termék az egyes fajok izolátumainak mindegyikénél megjelent. 49 db terméket 1500 bp fölöttinek értékeltünk, melyből 17 db tekinthető fajra jellemzőnek, 42 db-ot pedig 400-850 bp nagyságúnak azonosítottunk az elválasztás során kapott gélfotók és az alkalmazott létra alapján. Ezek közül 18 db azonosítható fő terméknek. Ennél kisebb méretű terméket csak hét esetben kaptunk, ahol 200-400 bp nagyságot mértünk, melynek nagy részét (öt db) közös allélnak azonosítottunk.

4.14. Mikroszatellitiek alapján készített törzsfák és elemzésük

Az UPGMA szoftverrel, mátrixok alkalmazásával létrehozott törzsfán a *Botryosphaeria dothidea* izolátumokat mikroszatellitjeik alapján két filogenetikai csoportra lehetett osztani. Megfigyelhető továbbá, hogy két izolátum (JT2035 és T2016) azonos a mikroszatellit mintázataik alapján (35. ábra).



35. ábra: *B. dothidea* izolátumok filogenetikai kapcsolatai mikroszatellitjeik alapján
Jelmagyarázat: A pöttyök színe az izolátum által kolonizált növényi szövetet jelöli, ahol a piros szín a termést jelenti.



36. ábra: *D. eres* izolátumok populációgenetikai elemzése céljából,
UPGMA szoftverrel készített dendrogram

Jelmagyarázat: A színes pöttyök jelentései: zöld: ág, sárga: rügy, piros: termés

A 25 db *Diaporthe eres* izolátum mikroszatellit mintázata alapján 10 genetikai kládot különítettünk el (36. ábra). Ennél a fajnál nem találtunk olyan mikroszatellit mintázatokat, amelyek azonosak lennének több izolátum esetén.

Megfigyelhető, hogy a törzsfa középső részére (3-7. klád) termésekből és rügyekből izolált törzsek kerültek, ezek közül a 4. genetikai csoportban csak terméseket kolonizáló gombákat találhatunk. A törzsfa alsó csoportjai ágakat és rügyeket fertőző törzseket tartalmaznak. A mintázás helyszínei szerint nem tudtunk feltárni genetikai összefüggést mikroszatellitek alapján.

A *Diplodia seriata* törzseket két csoportra osztotta a szoftver a törzsfa készítésekor (37. ábra). A négy izolátum között teljes profil azonosságot nem fedeztünk fel. Az egyik csoportban egyetlen izolátum található, mely Újfehértóról származik, valamint a törzsfa szerint a két Újfehértóról származó *D. seriata* áll a legtávolabb egymástól genetikailag.



37. ábra: *D. seriata* izolátumok mikroszatellitek alapján készített, genetikai hasonlóságait mutató törzsfa

Jelmagyarázat: A zöld pöttyök az diófa ágról történő izolálást mutatják

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A kutatásunk során célul tűztük ki a dió terméskárosodásában szerepet játszó fonalas gombák azonosítását és biológiájuk vizsgálatát, valamint a betegség etiológiájának tanulmányozását. Ehhez szükséges volt a diófák különböző részeiről származó gombapopulációk meghatározása, majd a potenciálisan betegséget kiváltó fajok és izolátumok további vizsgálata. Tanulmányoztuk a hőmérséklet és különböző kémiai fungicidek *Botryosphaeria dothidea* és *Diaporthe eres* fajokra gyakorolt hatását, valamint potenciális biokontroll ágensként az *Epicoccum nigrum* és a *Trichoderma gamsii* ezen patogénekkal szembeni antagonisztikus képességét. A betegség terjedése és a lehetséges fertőzési útvonalak feltárása érdekében patogenitási teszteket végeztünk éretlen diótermések, diófa ágak és almafa ágak inokulálásával. A különböző mintavételezési helyszínekről és az eltérő növényi részekből származó fajok izolátumainak genetikai variabilitását mikroszatellit markerekkel tanulmányoztuk.

5.1. A diófa ágainak, rügyeinek és terméseinek fonalas gomba populációja a kora nyári időszakban

A korábbi években tapasztalt jelentős termés kiesést elszenvedett ültetvényekben az első felmérés során azt tapasztaltuk, hogy a diófák jó általános állapota mellett barna elváltozásokat mutató fiatal ágak is jelen voltak a nyár eleji időszakban. Növényi kórokozó *Diaporthe* és *Diplodia* nemzetségbe tartozó gombákat izoláltunk tünetes ágakból és termésből, valamint tünetmentes rügyből. A 40 vizsgált diófa több mint egyharmada (35%) volt fertőzött ezen kórokozók bármelyikével, melyeket fiatal szövetekből izoláltunk. Ezek alapján e nemzetségek opportunistá viselkedését feltételezhetjük, ennek kijelentéséhez azonban további, ebbe az irányba kiterjesztett vizsgálatokra van szükség.

Egyes izolátumokat kiválasztottunk további genetikai azonosításra. Az ITS és *tefl* markerszekvenciák alapján arra következtettünk, hogy vizsgálataink során az északkelet-magyarországi diófákból izolált törzsek a *Diplodia seriata* és *Diaporthe eres* fajokhoz tartoztak. Ezen fajok világszerte elterjedt kórokozók, melyek számos fás szárú gazdaszerveztet képesek kolonizálni, köztük a diót is (Phillips et al., 2007; Gomes et al., 2013; Abramczyk et al., 2018; Fan et al., 2018). Mindkét fajt izolálták már korábban szőlőből (Kovács et al., 2014; 2017), azonban elsőként jelen tanulmányban azonosítottuk molekuláris markerek segítségével is hazai diófákról. *Diplodia seriata* okozta fertőzést több esetben észleltek héjas gyümölcsfák fás részein mediterrán

éghajlattal rendelkező területeken (Chen et al., 2014; Sohrabi et al., 2020), valamint az utóbbi években Közép-Európában is (Eichmeier et al., 2020). Olaszországban a *Botryosphaeria dothidea* okozott megbetegedéseket a dióültetvényekben (Gusella et al., 2020).

A *Diaporthe* fajok is kolonizálhatják a diófákat. A nemzetség több tagját azonosították a növényben Chilében (Luna et al., 2022), Kaliforniában (Agustí-Brisach et al., 2019), Spanyolországban (López-Moral et al., 2020) és Kínában (Fan et al., 2018) is. A *D. eres* faj súlyos terméskárosodást okozott mogyoróültetvényekben (Battilani et al., 2018; Eichmeier et al., 2020).

A diófa ágainak fertőződése megtörténhet metszési sebeken keresztül, melyek a diófa esetén októberben és februárban a műveletet követően legalább négy hónapig fogékonyak maradnak a fertőzéssel szemben (Michailides et al., 2012).

A megfelelő növényvédelmi stratégia kialakítása nehéz feladat a Botryosphaeriaceae család és a *Diaporthe* nemzetségek etiológiája miatt. A piknídiumok, a pszeudotéciumok és a spórák a héjasok bármely növényi részének szöveteiben képesek áttelelni, a földön maradt növényi maradványokban is (López-Moral et al., 2020). A fákon a növekedés miatt létrejövő repedéseken át, vagy a metszés, kártevők és az időjárási viszonyok okozta sebeken keresztül bejuthatnak a gombák a gazdaszervezetbe. Az esős időjárás fokozza a gomba spórák fejlődését és terjedését, ami a fitopatogének nagyarányú elszaporodását idézheti elő (Moral et al., 2019; López-Moral et al., 2020). A magasabb hőmérséklet is elősegíti a gombák fejlődését és szaporodását, így a tünetek gyakran csak késő tavasszal jelentkeznek a fákon (Moral et al., 2019).

5.2. Diótermések fonalas gombaközössége 2018-ban

2018 őszén 200 termést gyűjtöttünk be, melyek 68%-a fogyaszthatatlan állapotú volt, a tüneteket mutató termékek aránya pedig hasonló volta három mintázott helyszín tekintetében. A termésekben számottevő volt az *Alternaria* spp., a *Botryosphaeria* spp., a *Diaporthe* spp., a *Fusarium* spp. és a *Penicillium* spp. aránya. Kaliforniában is hasonló mikrobiomot tenyésztettek ki dióbélből (Michailides et al., 2012). A nemzetségek McKinney-indexe a *Botryosphaeria* (74%) és *Diaporthe* (62%) nemzetségek esetén volt a legmagasabb, mely számszerűen utal a rothadt termékek és a két patogén nemzetség közötti kapcsolatra. Az átlagos skálaértékek is ezen nemzetségeknél voltak a legnagyobbak, mind önmagukban vizsgálva, mind az

együttesen történő kitenyésztés során. További vizsgálatok javasoltak a két faj esetleges szinergista kölcsönhatásának jellemzésére.

Az ITS és *tefl* markerek szekvenciaelemzése során a *Botryosphaeria dothidea* és *Diaporthe eres* fajokba soroltuk az izolátumainkat. Kínai dióültetvényekben a *B. dothidea* 20%-50%-os (Li et al., 2023), Kaliforniában pedig 50%-ot meghaladó termésvesztést okozott a pisztácia termesztőknek (Moral et al., 2019). Horvátország északi részén rothadó szelídgesztenye termésekből izolálták a két fajt (Ivić–Novak, 2018).

5.3. A rügyek mikrobaközössége

A nyugalmi időszak végén monitorozott barkarügyek 44%-ában megtalálható volt a *Diaporthe* spp. patogén gombák, a *Botryosphaeria* nemzetségbe tartozó kórokozók pedig négy rügyből voltak kitenyészthetők. Tíz termésrügyet (csúcsrüggy) is mintáztunk, melyek 40-40%-ában jelen voltak a két nemzetségbe tartozó gombák. Ezek alapján elmondható, hogy a módszer (BUDMON) alkalmazható a diófa hím- és nőivarú virágkezdeményei fertőzöttségének megállapításához. Ez az információ támpontot gyűjthet a szakembereknek a fennálló növényvédelmi kockázatok becslésében, és a szükséges kezelések típusának és idejének meghatározásában.

A barkarügyek patogén gombák általi kolonizáltsága magában rejti a beporzáskor történő fertőződést, a termésrügyek esetén pedig látenszen beteg, tünetes termések létrejöttét. Michailides és Morgan (2004) hasonlót tapasztalt a pisztácia *Botryosphaeria dothidea* által okozott betegségének tanulmányozása során, melyet azzal magyaráztak, hogy a termőtestek ágakon történő áttelelése lehet az eredménye a rügyek fertőzöttségének, ugyanis a spórák a csapadékkal eljuthatnak az újonnan képződő növényi részekre. A fertőzött rügyek és a betakarításkor tapasztalt elrothadt pisztácia termések aránya lineárisan korrelált egymással. A két kutató a *Botryosphaeria* mentes ültetvényekben is javasolja a módszer alkalmazását. Ugyan a technika alkalmas lehet az ültetvények fertőzöttségének becslésére, nem veszi figyelembe a rügyfakadás utáni időjárási viszonyokat (Morgan et al., 2009).

5.4. Látens fertőzöttség meghatározása ONFIT technikával

A zöld diók júniusban végzett ONFIT vizsgálata során a tünetmentes terméseken csekély mértékű telepképzést tapasztaltunk, és az izolált mikroorganizmusok nem a *Botryosphaeria* és a *Diaporthe* nemzetségekbe tartoztak. A barna foltokkal és apró

pöttyökkel rendelkező termések esetében azonban számottevő arányban jelentek meg a két nemzetségbe tartozó gombák, ugyanis a tünetes termések 49%-ából sikeres volt a potenciálisan terméskárosodást okozó gombák valamelyikének kitenyésztése. A *Botryosphaeria* nemzetségbe tartozó kórokozókat 34 zöld termés epikarpiumán figyeltünk meg, a *Diaporthe* fajokra jellemző kolóniák 50 mintán jelentek meg, míg 25 termésen mind a két nemzetség előfordult.

A tünetek tehát igen korán, a termésfejlődés alatt jelentkeztek. Látens megbetegedést nem azonosítottunk a kísérlet során. Mivel a *Botryosphaeria* és a *Diaporthe* gombákkal kapcsolatba hozható tünetek már június elején megfigyelhetők, így javasolt az ONFIT korábbi időpontban történő alkalmazása, amikor még inaktív formában vannak jelen az esetleges kórokozók a termésben.

Az USA dél-nyugati részén és Északkelet-Mexikóban őshonos nyugati dióburok-fúrólégy (*Rhagoletis completa*) a dió egyik fő kártevője, amely nemcsak Magyarországon, hanem Európa-szerte is jelentős gazdasági károkat okoz, ahol először Svájcban detektálták (Duso, 1991; Verheggen et al., 2017). A zöld dió károsodását ez a kártevő is kiválthatja, melyet Magyarországon először Kőszegen azonosítottak (Voigt–Tóth, 2013). A *R. completa* tápnövényei közé tartoznak különféle *Juglans* fajok, melyek burokjába helyezik a nőtény legyek a petéiket. A lárvák kikelése több mint két hónapig is eltarthat. A lárvák a zöld burok szöveteivel történő táplálkozását barna elszíneződés jelzi (Guillén et al., 2011). A fő problémát azonban az jelenti, hogy a kártevő által okozott mechanikai sérülésen keresztül a kórokozók könnyedén bejuthatnak akár a bélállományba is (Duso–Lago, 2006). A bejutott kórokozók lesznek így a jelentős termésveszteségért felelősek az általuk kiváltott gyümölcsaszalódás és -rothadás következtében. A kezeletlen gyümölcsösök 74–91%-án bekövetkezhet a terméskárosodás, a gazdasági veszteség pedig elérheti az 50%-ot (Duso–Lago 2006; Voigt–Tóth, 2013).

A dióburok-fúrólégy lárvái elleni védekezés kihívás a szakemberek számára, ugyanis nehézséget jelent rovarölő szerekkel elérni őket a termés belsejében, valamint fontos az időzítés is, mivel a lárvákat csak a puha burokba képes behelyezni a nőtény rovar, ami a július elejétől szeptember közepéig tartó időszak (Nickel–Wong 1966). További problémát jelent a védekezésben a diófák nagy kiterjedésű lombkoronája, mely miatt a permetezéssel kijuttatás nem tekintendő praktikusnak, így az utóbbi évtizedben egyre több esetben alkalmaznak törzsinjektálást (Fettig et al., 2013; Kiss et al., 2021)

5.5. Diótermések gombaközösségének vizsgálata érett terméseken 2019-ben

2019 őszén a megelőző évi betakarításkor mintázott terméseinek állapotához képest egészen más eredményt kaptunk, ugyanis a fogyaszthatatlan termések aránya, a mindkét évben mintázott területeket figyelembe véve (Tarpa, Jánkmajtis) 33% volt, míg az előző évben 61% volt. A különbség megmutatkozott a kitenyészített nemzetségek tekintetében is. A vizsgált *Botryosphaeria* és *Diaporthe* diópatogén nemzetségek jelenléte 6%, míg 2018-ban 64% volt. 2019-ben a termések fogyaszthatatlanná válásáért elsősorban a *Penicillium* fajok voltak a felelősek, amelyek legnagyobb mennyiségben voltak kitenyészhetők II-es és III-as osztályba sorolt, azaz részben aszalódott vagy súlyosan rothadt diókból, de gyakran voltak jelen I-es osztályba regisztrált termésekben is, melynek köszönhetően 46% volt a nemzetség McKinney-indexe. A 2018-as évhez hasonlóan a *Botryosphaeria* és a *Diaporthe* nemzetségek Imc értéke volt a legmagasabb (67-67%).

A jánkmajtisi dióültetvényben 2019-ben kiterjesztett növényvédelmi kezelést alkalmaztak, mely hatékonynak bizonyult a betegség megfékezésében, ugyanis a fogyaszthatatlan termések aránya 77%-ról 33%-ra csökkent, a diópatogén *Botryosphaeria* és *Diaporthe* nemzetségek pedig a termések 6%-ából voltak kitenyészhetők, míg az előző évben ez az érték 77% volt.

Az általunk részletesen vizsgált *Botryosphaeria* és *Diaporthe* nemzetségbe tartozó gombák jelenléte minimalizálódott a 2019-es évben, azonban az ehetetlen termések aránya nem követte teljes mértékben ezt a trendet, ami a *Penicillium* fajok nagymértékű jelenlétével hozható kapcsolatba. A nemzetség dióban való nagyarányú jelenléte miatt fontos megemlíteni az általuk potenciálisan termelt mikotoxinok egészségügyi veszélyeit (Fung–Clark, 2004). A mi vizsgálataink során is beazonosított *Penicillium crustosum* Új-Zélandon mikotoxikózist okozott egy kutyánál, aki fertőzött, öt hónapja földön heverő diót fogyasztott el (Eriksen et al., 2010). Így mindenképpen szükséges a nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxin termelésének további vizsgálata, például folyadékkromatográfia-tömegspektrometriás módszerrel (Rundberget–Wilkins, 2002).

A *Penicillium* és *Cladosporium* nemzetségbe sorolt izolátumok ITS alapján történő faj szintű azonosításának eredményei alapján más markerszekvenciák tanulmányozása is szükséges a pontosabb besoroláshoz.

5.6. Hőmérséklet hatása *Botryosphaeria* és *Diaporthe* izolátumok növekedésére

A rügyek vizsgálata során felmerült a kérdés, hogy a barkarügyekből kitenyésztett *Botryosphaeria* spp. kisebb aránya vajon a tavaszi időjárási viszonyok és az eltérő életsiklus eredménye-e. Ennek megválaszolására két *Botryosphaeria dothidea* és négy *Diaporthe eres* izolátumot inkubáltunk 15, 20, 25, 30 és 35 °C-on. A feltevésünk részben beigazolódott, mivel a két *B. dothidea* izolátum bár nem szignifikánsan, de a *D. eres* tenyészetekhez képest lassabb telepképzést produkált 20 °C alatt, ahogyan azt Sánchez et al. (2003) is tapasztalták. Ezen kívül a *B. dothidea* hőtűrése is egyezett az általunk tapasztaltakkal, mely szintén fontos adat a kórokozó igényeinek ismeretéhez. A *Botryosphaeria* izolátumok átlagos napi növekedése jelentősen alulmaradt a Sánchez et al. (2003) által közölt adatokhoz viszonyítva, ahol optimális hőmérsékleten a 25 mm-t is meghaladta ez az érték. A mi vizsgálataink során a leggyorsabb napi telepképzés 15 mm volt, 30 °C-os inkubáció mellett.

A *D. eres* izolátumokat a 35 °C-os inkubációs hőmérséklet gátolta a növekedésben, de a vegetatív túlélés valószínűsíthető Abramczyk et al., (2020) kutatási eredményei alapján, mely során a 35 °C-os (valamint -20 °C-os és 0 °C-os) inkubációs körülményeket 25 °C-ra módosítva telepképzést tapasztaltak. Az emelkedő hőmérséklettel szembeni érzékenység eltérő volt a *D. eres* törzseknél, ami hozzájárulhat a tünetek súlyosbodásához, mivel a gazdanövény így szélesebb hőmérsékleti tartományban van kitéve optimális körülmények mellett szaporodó és kolonizáló kórokozóknak. A fás szárú növényeket károsító Botryosphaeriaceae és *Diaporthe* spp. gombák emelkedett hőmérséklethez történő adaptációját több kutató is megfigyelte (Michailides–Hasey, 2010; Agustí-Brisach et al., 2019). Összességében elmondható, hogy a vizsgált *Diaporthe eres* és *Botryosphaeria dothidea* izolátumok optimális növekedési körülményei megegyeznek a dió termésfejlődése idején megszokott 20-35 °C-os hőmérséklettel.

5.7. Patogenitási teszt éretlen diótermésen

A zöld termések augusztusban történő ágból, rügyből és termésből származó *Diaporthe eres* és *Diplodia seriata* gombákkal történő *in vitro* megfertőzése során a termések 81%-ánál elrothadt a zöld burok három hét után. A *D. eres* izolátumok McKinney-indexe magasabb volt a *D. seriata* izolátumokhoz képest a zöld burokra és a bélállományra vonatkozóan is. A bélállományokon a 89%-os tünetmegjelenés és a belekből történő sikeres kórokozó visszaizolálás arra enged következtetni, hogy az

inokulum bejutott a belső szövetekbe a kemény maghéjon át. Ez az információ azért fontos, mert ennek alapján lehetséges a termések késői fertőződése és károsodása. Mivel a bélállományokban a kezdeti elváltozások már három hét inkubáció után megjelentek, a kórokozók gondot okozhatnak szeptemberig, hiszen ha ekkor történik a kolonizáció, annak hatása már megmutatkozik a leszüretelt termésen.

López-Moral és munkatársai (2020) az általunk megfertőzött termésekhez képest éretlenebb fázisban, a kemény héj kifejlődése előtt végeztek *in vitro* mesterséges fertőzést számos gombafajt bevonva a tesztelésbe, mely során egészen eltérő eredményt kaptak. Ebben a vizsgálatban a zöld burkon jelentősen kisebb mértékű tünetet váltottak ki a *Diplodia seriata* és a *Diaporthe* spp. izolátumok. A fejlődésben lévő bélállományok középső részében barnulás volt megfigyelhető. A *Botryosphaeria dothidea* ennél súlyosabb elváltozásokat okozott, a termések 70%-án léziók keletkeztek, míg ez az érték a *D. seriata* és a *Diaporthe* törzsek esetén 30-40% volt.

5.8. Diófa ágak patogenitási tesztje tünetes diótermésekből izolált kórokozókkal

A rothadt termésekből izolált *Botryosphaeria dothidea* és *Diaporthe eres* törzsek diófa ágakra történő inokulálásának eredménye bizonyította a patogenitásukat. A léziók kiterjedése alapján változó virulenciával rendelkeznek, fajon belül is, ugyanis a legkisebb (32 mm, J2012) és a legnagyobb (170 mm, JT2024 és JT2050) átlagos lézió nagyságot is a *D. eres* esetén detektáltunk. Vizsgálatunkban a *D. eres* okozta a legnagyobb elváltozásokat. A *B. dothidea* által okozott legnagyobb átlagos lézió nagyság 99 mm volt, így ezen faj fertőzőképessége a dió fás szöveteit tekintve közepesnek mondható. Ezek az eredmények eltérnek a szakirodalomban leírtaktól, de más kutatásokban is kimutatták ezen nemzetségek diófát fertőző tulajdonságát.

López-Moral et al. (2020) spanyolországi dióültetvényeket vizsgáltak, mely keretein belül az *in vitro* mesterséges fertőzések során a *B. dothidea* (130 mm) fajt virulensebbnek tapasztalták a *Diaporthe* törzsekhez képest (23 mm). Kaliforniában egy *in vivo* patogenitási teszt szintén azt mutatta, hogy a *B. dothidea* virulensebb (35 mm), mint a *D. eres* (17 mm) (Chen et al., 2014). Török kutatók a *B. dothidea* vizsgálata esetén négy hét inkubációt követően kisebb lézió nagyságot mértek (26 mm), habár két éves volt a gazdanövény (Yildiz et al., 2022). A *D. eres* virulenciája az ágakban és széles hőmérséklet-tartományon történő jelentős telepképzése hozzájárulhat a rügyek és termések fertőződéséhez akár a növény belső szövetein keresztül, akár a külső kérgen képződő spórák terjedésével.

5.9. Almafa ágainak inokulálása tünetes diófa szövetekből izolált kórokozókkal

A klímaváltozás hatására a fitopatogén gombák számára kedvező környezeti feltételek következtében új gazdaszervezet-kórokozó kapcsolatok jelenhetnek meg. Tanulmányoztuk a *Botryosphaeria dothidea*, *Diaporthe eres* és *Diplodia seriata* dióból származó fajok virulenciáját, amelyeket főként melegebb éghajlatú országokban izoláltak almafa fás szöveiből (Shay–Sitterly, 1954; Sutton, 1991; Smit et al., 1996; Cloete et al., 2011; Abdollahzadeh, 2015; Sessa et al., 2017). A mesterséges fertőzést követően a patogén izolátumok nemcsak kolonizálták az almafa ágak szöveit, hanem elváltozásokat is okoztak. A két Botryosphaeriaceae családba tartozó izolátum hasonló tüneteket okozott, ezeknél enyhébb elváltozásokat váltott ki a *D. eres*.

A patogenitási teszt eredménye alapján tehát a vizsgált dióból származó fajok hazánkban új potenciális gazdaszervezet-kórokozó kölcsönhatásnak tekinthetők, amelyek később pusztító betegségekhez vezethetnek, mely alátámasztja a szomszédos növénykultúrák tüneteinek monitorozásának fontosságát az esetleges keresztfertőzések miatt.

A *B. dothidea* az almatermés károsításával járó fehér rothadás nevű betegség kórokozója, mely az alma pre- és posztharvest rothadását okozza. Európában nem elterjedt ez a betegség, de detektálták már Szerbiában (Vasić et al., 2013), valamint múlt évben ugyanitt hasonló tüneteket okozott a *B. dothidea* és a *D. eres* együttes fertőzése (Vučković et al., 2022). Urbez-Torres és munkatársai 2016-ban közöltek egy tanulmányt, melyben több, az almafa csúcsharagadásának kiváltásában szerepet játszó *Diplodia* faj virulenciáját vizsgálták. A patogenitási teszt során két éves 'Ambrosia' fákat fertőztek a patogénekkal *in vivo*, mely eredményét hat hónappal később értékelték ki. A *D. seriata* átlagosan 28 mm hosszú elváltozást okozott az ágakon ez idő alatt, mely kismértékűnek tekinthető a mi eredményünkhöz képest (négy hét után 93 mm). A kapott értékek különbözősége más kísérleti körülményekből és a gazdanövények eltérő korából és fajtájából is fakadhat. Az általunk *in vitro* megfertőzött ágak 10 év feletti 'Gála' fákról származtak, de mindenképp felhívja a figyelmet a fiatalabb egyedek betegséggel szembeni esetleges fogékonyságára. Ezen kívül a *D. seriata* az utóbbi évtizedben is számos almaültetvényben okozott gyümölcskárosodást is (Hanifeh et al., 2014; Cáceres et al., 2016; Kim et al., 2016; Crespo et al., 2018).

A *D. eres* fajt a közelmúltban izolálták Kanada dél-keleti részén súlyos nekrotikus tünetekkel rendelkező fiatal almafák fás szöveiből. Az *in vivo* patogenitási teszt során

a gombafaj bejutott a belső szövetekbe, és négy hét után ágelhaláshoz vezetett a megfertőzött egy éves alanyokon (Ali et al., 2020), tehát a mi kísérletünk során tapasztalt átlagos 40 mm-es lézióhoz képest komolyabb tüneteket váltott ki. Következésképpen a tünetek kialakulásában kulcsfontosságú szerepet játszhat a növény kora.

5.10. Fungicidek hatása a dió terméskárosodását okozó gombákra

A dió termésrothadását előidéző kórokozók elleni védekezés elkerülhetetlen része a kémiai növényvédő szerek alkalmazása, így célul tűztük ki az alkalmazható fungicidek, továbbá a gombák ezekkel szembeni érzékenységének meghatározását. A legalacsonyabb üzemi koncentrációval mérgezett agaros teszt során alkalmazott négy készítmény közül három szinte teljes mértékben gátolta a *Botryosphaeria dothidea* és a *Diaporthe eres* izolátumok növekedését (ciprodinil 37,5% + fludioxonil 25%, fluopiram 17,7% + tebukonazol 17,7%, tebukonazol 25%).

A hatékony szerek közül a tebukonazol hatóanyagú készítményt vizsgáltuk tovább az izolátumok érzékenységének, az EC₅₀ értékeknek a meghatározására. A kapott EC₅₀ értékek (0,11-0,29 mg/l) az engedélyokiratban szereplő értéknél (46,88 mg/l) jelentősen alacsonyabbak voltak. A *D. eres* izolátumokra vonatkozó EC₅₀ értékekhez (0,11-0,24 mg/l) hasonló, 0,12 mg/l (Tao et al., 2020), egyéb tanulmányozott *Diaporthe* fajok esetében <0,001 – 1,18 mg/l értékeket kaptak a kutatók a tebukonazol hatóanyagra (Gonzalo et al., 2017; Akgül–Nawaz Awan, 2022). A *B. dothidea* esetében számított EC₅₀ érték (0,29 mg/l) is közel állt más kutatások keretein belül meghatározott értékekhez (0,011-1,925 mg/l) (Fan et al., 2022).

A kutatásunkba bevont növényvédő szerek alkalmazása segítheti a *B. dothidea* és *D. eres* kórokozók elleni eredményes védekezést, és az általuk okozott termésrothadás mértékének csökkentését. Azonban a gátló hatás eltérő lehet a környezeti körülmények függvényében, így további laboratóriumi és szabadföldi vizsgálatok szükségesek a hatékony gyakorlati kezelés kidolgozásához.

4.12. Az *Epicoccum nigrum* és a *Trichoderma gamsii* antagonisták vizsgálata

Az integrált növényvédelem gyakorlata során amennyiben szükséges, alacsonyabb kockázati besorolású szintetikus növényvédő szereket javasolt alkalmazni a célzott védekezéshez, megfelelő mennyiségben és időben. Megoldást jelenthet a biokontroll szerek alkalmazása, valamint a szigorú növényvédő szer szabályozások bevezetése és

betartatása (FAO, 2011). Ezen szerek kijutatott mennyisége csökkenthető, vagy magas hatékonyság esetén ki is váltható a biológiai megoldások alkalmazásával.

A kutatásunk során egy diórügyből izolált *Epicoccum nigrum*, valamint Kovács és munkatársai (2021) által szőlőből izolált TR08-as *Trichoderma gamsii* antagonista képességét diópatogén *Botryosphaeria dothidea*, *Diaporthe eres* és *Diplodia seriata* izolátumokkal szemben konfrontációs tesztben vizsgáltuk. Az *E. nigrum* mind a négy, a vizsgálatba bevont patogén törzs növekedését (BCI=47-53%) gátolta. Azonban a növekedésgátlás mellett az *E. nigrum* nem volt képes ránőni a patogén gombák tenyészetekre, csak a telepek szélei érintkeztek a *B. dothidea* és a *D. seriata* törzsszel történő konfrontáció esetén is. A két *D. eres* izolátummal szemben történő beállítás során gátlási zóna jelent meg. A biokontroll hatás mértéke tehát nem megfelelő az *E. nigrum* hatékony alkalmazásához az *in vivo* körülmények között a tanulmányba bevont diópatogénekkal szemben.

Silva-Valderrama et al. (2021) vizsgálataiban a *B. dothidea* fajhoz hasonlóan a Botryosphaeriaceae család tagjai közé tartozó *D. seriata* és *Neofusicoccum parvum* fajok micéliális növekedésére nem volt hatással az *E. nigrum*. Más tanulmányban *Phomopsis* spp. vizsgáltak, melyek a *Diaporthe* nemzetség anamorf alakjai. Ezekben a kísérletekben az *Epicoccum purpurascens* fajt alkalmazták antagonistaként, és jelentősebb gátlóhatást figyeltek meg a mi eredményeinkhez képest (Machowicz-Stefaniak, 2009).

A *T. gamsii* hatékonyabb potenciális biokontroll szervezetnek bizonyult a vizsgálat során, ugyanis 100% volt minden esetben a BCI-értéke. Az antagonista ránőtt a diópatogén gombák telepeire, megállítva a növekedésüket. A *T. gamsii* hiperparazita hatását mikroszkóppal tanulmányoztuk, mely során a TR08-as hifáinak a patogén izolátum fonalaira történő rátekeredését figyeltük meg. A teszt alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált *T. gamsii* törzs *in vitro* körülmények között alkalmas a diópatogén *B. dothidea*, *D. eres* és *D. seriata* fajok megfékezésére, azonban elengedhetetlen a biokontroll tesztelésének szabadföldi beállítása.

5.11. A törzsek mikroszatellitjeinek vizsgálata

A dióból kitenyésztett gombák közül a *Botryosphaeria dothidea*, a *Diaporthe eres* és a *Diplodia seriata* kórokozó fajok genetikai polimorfizmusát is tanulmányoztuk. Több mikroszatellit primert alkalmazva sikeresen elkülönítettük őket, valamint fajon belüli eltéréseket is detektáltunk a felszaporított 165 mikroszatellit sáv eltérő mintázata

segítségével. Közülük 33 db a *B. dothidea*, 6 db a *D. eres* és 37 db kizárólag a *D. seriata* fajoknál fordult elő. Az M13 primer eredményezte a legtöbb (51 db) fragmentumot, ezt követte a (GGA)₇ (47 db), (GTG)₅ (42 db), majd az (ACAC)₅ primer, mellyel 25 terméket kaptunk az amplifikációt követően. A fragmentumok nagy része a 850-1500 bp hosszúságú volt.

A kapott allélprofilok alapján készült filogenetikai fák elemzése szerint a diótermésből, rügyből és ágból kitenyészített, a vizsgálatba bevont 25 db *D. eres* izolátumokat tekintve bizonyos genotípusok csak a növény egyes részein voltak megtalálhatók, ugyanis az egyik (4.) klád csak termésből kitenyészített izolátumokat tartalmazott. A 2. klaszterben található, genetikailag hasonló törzsek különböző növényi részekről származtak, mely közül egy ágból és két termésből izolált törzset ugyanabban az évben és ültetvényben gyűjtöttünk be. Ez jelezheti, hogy a fertőzés az ágak felől is kiindulhatott az ültetvényben.

A földrajzi hely és a kolonizált növényi szövetek között nem figyeltünk meg összefüggést. A nagyon hasonló genetikai profillal rendelkező termésről és rügyről izolált törzsek megerősítik azt a hipotézist, hogy a barkarügyekről származó kórokozó kolonizálhatja a termővirágokat és a termést, messzemenő következtetést azonban további vizsgálatokat követően vonhatunk le.

A *B. dothidea* izolátumok között előfordult allélprofil azonosság alapján ezen fajba tartozó törzsek közelebb álltak egymáshoz, mint a *D. eres* tagjai. A négy vizsgált *D. seriata* izolátum közül egy külön kládba került.

Összességében a mintavétel alá vetett ültetvények patogén gombáinak genetikai variabilitása nagymértékű volt, alacsony genetikai távolságok mellett.

Ma és Michailides (2002) a *B. dothidea* fajba tartozó, 86 db, pisztáciából és dióból származó izolátum genetikai variabilitását vizsgálták többek között M13 primerrel, amely 12 polimorfikus fragmentumot eredményezett, igen alacsony változékonysággal. Az általunk kivitelezett PCR több terméket, 15 db-ot adott öt izolátumot bevonva a vizsgálatba, a legtöbbet az összes vizsgált primer közül. Az általunk vizsgált *B. dothidea* izolátumok genetikai variabilitása alacsonyabb szintű volt a másik két tanulmányozott fajhoz képest, ahogyan azt Ma és Michailides (2002) is tapasztalták, és a kórokozó új megjelenésével magyarázták. A *B. dothidea* alacsony genetikai diverzitásása abból kifolyólag is lehetséges, hogy a monokultúrából származó kórokozók populációját gyakran egy vagy néhány genotípus uralja (Garrett et al., 1999; Zhu et al., 2000).

Diogo et al. (2010) az általunk is alkalmazott indítószekvenciákat alkalmazta az M13 kivételével mandulából kitenyésztett *Diaporthe* izolátumok vizsgálatára, mely eredményeként genetikai eltérésekben gazdag klasztereket hoztak létre, és különböző fajokat is azonosítottak.

Mind a *Diplodia* nemzetség, mind a Botryosphaeriaceae családon belül vita tárgyát képezi a fajok pontos elkülönítése. A *D. eres* és a *B. dothidea* esetében is egyes szerzők a genetikai variabilitás ellenére egy fajnak tekintenek mások által külön fajba sorolt törzseket. Eredményeink alapján nem indokolt a *D. eres* és a *B. dothidea* fajcsoport további fajokra bontása, hiszen dióról egyazon évben mi is izoláltunk hasonló morfológiai megjelenésű, és tüneteket kiváltó, egymástól a vizsgált genetikai marker szekvenciák alapján kismértékben különböző törzseket.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A hazai dióültetvényekben jelen vannak a *Diplodia seriata*, *Diaporthe eres* és *Botryosphaeria dothidea* fajok, melyek jelen tanulmányban kerültek izolálásra és azonosításra ITS és *tefl* molekuláris markerszekvenciák segítségével, közülük a *B. dothidea* és a *D. eres* elsőként került kitenyésztésre Magyarországon kórokozóként diótermésekben.
2. A betakarított termésekben a McKinney-index alapján a *Botryosphaeria* (Imc=74%) és a *Diaporthe* (Imc=62%) nemzetségekbe tartozó gombák okozzák a legsúlyosabb károsodást önmagukban, valamint együttesen történő jelenlétük esetében.
3. A barkarügyekben és termésrügyekben jelen vannak a később terméskárosító *Diaporthe* és *Botryosphaeria* fajok. Az éretlen, tünetmentes termésekben nincsenek jelen a gombák (nincs látens fertőzés), azonban a tüneteket mutató minták 49%-ában jelen voltak *Botryosphaeria* és *Diaporthe* fajok. Tehát a két nemzetségbe tartozó gombák által okozott tünetek már a termésfejlődés közepén kialakulhatnak.
4. A magyarországi diótermésekből izolált *B. dothidea* törzsek melegkedvelők, 35 °C-on is növekednek, 30 °C-on pedig gyors (15 mm/nap) micéliális növekedéssel jellemezhetők. A *D. eres* fajba tartozó izolátumok hőmérséklettel szembeni érzékenysége eltérő volt, ami hozzájárulhat a betegség súlyosságához, mivel a növény így szélesebb hőmérsékleti tartományban van kitéve optimális körülmények mellett szaporodó és kolonizáló *D. eres* kórokozóknak.
5. A tünetes termésekből származó *B. dothidea* és *D. eres* a dió fás szöveteiben is tüneteket okoznak. A *D. eres* súlyosabb tüneteket okozott (170 mm átlagos lézió hossz), mint *B. dothidea* (99 mm átlagos lézió hossz).
6. A *D. eres* és *D. seriata* kiválthatja a termések késői fertőződését és károsodását, melyek a fertőzött ágból, rügyből és termésből sebzéseken keresztül bejutva a zöld burok rothadását, a dióbél elváltozását okozzák.

7. A dióból származó *B. dothidea*, *D. eres* és *D. seriata* fajba sorolt izolátumok képesek kolonizálni és elváltozásokat okozni az alma fás szöveteiben.
8. A *T. gamsii* TR08-as törzse hatékony antagonistája (100%-os Biokontroll Index) a diópatogén *B. dothidea*, *D. eres* és *D. seriata* törzseknek.

7. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

1. A *Botryosphaeria* és a *Diaporthe* fajok jelentős terméskárosodást okoznak az érett, betakarított dióban.
2. A termés károsodását okozó gombák (*Diaporthe* és *Botryosphaeria* fajok) már a fertőzött rügyekből is elindíthatják a fertőzést. Ezért javasolt a rügyfertőzöttség felmérésére a BUDMON alkalmazása a jelen lévő kórokozó gombák korai azonosításához és a növényvédelmi kockázatok becsléséhez.
3. A *Botryosphaeria* és *Diaporthe* fajok már az éretlen termésekből is kimutathatók. Az éretlen termések ONFIT vizsgálatával felmérhető az ültetvény termésfejlődés alatti gombás fertőzöttsége.
4. A *Penicillium* fajok általi fertőzöttség jelentős a magyarországi ültetvényekben, tünetmentes termések esetén is.
5. Az endofita *Trichoderma* törzsek (pl. *T. gamsii* TR08-as) alkalmazása javasolt a diópatogén *B. dothidea*, *D. eres* és *D. seriata* elleni védekezésben.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Hazánk legkedveltebb és legnagyobb területen termesztett héjas termésű fája a diófa. Az árugyümölcsösök területe évről-évre nő, a dió exportja jelentős, a betakarított mennyiség mégis csökkenő tendenciát mutat (FAOSTAT, 2021). Ennek oka lehet, hogy a magyar gazdálkodóknak új kártevőkkel és kórokozókkal, és eddig nem tapasztalt minőségű és mértékű tünetekkel kellett szembeszállniuk az elmúlt 10 évben, különösen a diótermést tekintve (Voigt-Tóth, 2013; Kovács et al., 2018). A diófa gombás megbetegedése egy komplex kór, mely a *Diaporthe* nemzetséghez köthető, termést és kérget érintő megjelenését már 20 éve is tapasztalták Magyarországon (Kadlicskó et al., 2003). Az utóbbi évtizedben a probléma világszerte súlyossá vált, jelentős termés kiesést okozva héjas ültetvényekben (Chen et al., 2014; Meng et al., 2018; Moral et al., 2019).

A kutatás elsődleges célja a diófa különböző részeiben jelen lévő gombák kitenyésztése és a kórokozók azonosítása morfológiai és molekuláris marker szekvenciák segítségével. Elsőként tünetes és tünetmentes ágak, éretlen termések és rügyek kora nyári vizsgálatát végeztük el. A minták feldolgozása során hét-hét tenyészetet *Diaporthe* és *Diplodia* nemzetségbe soroltunk. A minták 25%-ában, valamint a mintázott fák 35%-ában megtalálható volt valamely általunk vizsgált patogén gomba, melyeket döntően tünetes növényi szövetekből izoláltunk. Látens fertőzés tehát nem volt jellemző a vizsgált növényi szövetekben ebben az időszakban. Az ITS és *tefl* markerszekvenciák alapján a diófákból izolált törzsek a *Diplodia seriata* és *Diaporthe eres* fajokhoz tartoztak, melyeket elsőként izoláltuk és azonosítottuk molekuláris markerek segítségével is hazai diófákról. Az ágkárosodást okozó gombák könnyedén fertőznek metszési sebeken, kocsányon vagy atkák okozta sérüléseken keresztül, így már ebben az időszakban javasolt az ültetvények monitorozása, hiszen ezek inokulum forrásként szolgálhatnak később a termések kolonizációjakor (Moral et al., 2019).

Következő lépésként a betakarítás során érett, látszólag ép és tünetesnek vélt, héjára rászáradt fekete burokkal rendelkező terméseket gyűjtöttünk három ültetvényből (Hajdúdorog, Tárpa, Jánkmajtis). A bélállományok csaknem háromnegyedét (67,5%) fogyaszthatatlannak minősítettük, melynek 19,5%-a teljesen rothadt állapotú volt. A termésekből *Alternaria* (31%), *Diaporthe* (26%), *Penicillium* (22%), *Botryosphaeria* (13%) és *Fusarium* (9%) nemzetségbe tartozó gombákat tenyésztettünk ki. Számos minta esetében egy mintából több nemzetségbe sorolható gombát tudtunk azonosítani.

A nyári eleji felméréssel ellentétben *Diplodia* nemzetséget nem tenyésztettünk ki, a *Botryosphaeria* spp. megjelenését azonban ebben a vizsgálatban tapasztaltuk először. A molekuláris biológiai vizsgálatok alapján *Botryosphaeria dothidea* fajként azonosítottuk a nemzetségbe tartozó izolátumokat. Tudomásunk szerint elsőként azonosítottuk genetikai módszerrel ezen a gazdanövényen Magyarországon. A *Diaporthe* nemzetségbe tartozó tenyészeteket a *Diaprothe eres* fajba soroltuk.

A diók állapota és a belőlük kitenyésztett izolátumok kapcsolatát McKinney-index értékekkel jellemeztük, mely képet adott a súlyos tüneteket kiváltó kórokozókról. Ez az érték a *Botryosphaeria* (74%) és a *Diaporthe* (62%) fajok esetén volt a legmagasabb, tehát e két gombacsoport játszik a legnagyobb szerepet a tünetek kialakulásában. Az diótermésekhez tartozó átlagos skálaértékek is ezen fajok önmagukban, valamint együttesen történő kitenyésztése esetén voltak a legnagyobbak.

Következő évben tél végén, a nyugalmi időszak bezártával az előző évben legsúlyosabb terméskárosodást elszenvedett ültetvényben (Jánkmajtis) monitorozott barkarügyek 44%-ában megtalálható volt a *Diaporthe* spp. patogén gomba, melyek a DNS-alapú vizsgálatok alapján *D. eres* fajba voltak sorolhatók. A *Botryosphaeria* nemzetségbe tartozó kórokozókat csupán négy barkarügyből izoláltunk. A begyűjtött termésrügyek 40-40%-ában mindkét gombacsoport jelen volt.

Ezek alapján elmondható, hogy a módszer (BUDMON) alkalmazható a hazánkban jelen lévő gombás dióbetegség korai monitorozásához és a növényvédelmi kockázatok becsléséhez a hím- és nőivarú rügyek fertőzöttségének megállapításával. Ugyanezen ültetvényből származó, valamint a tarpai és a kutatásba újonnan bevont alsószentiváni árugyümölcsösökből gyűjtött éretlen termések ONFIT vizsgálata során arra az eredményre jutottunk, hogy látens fertőzés nincs jelen a diótermésekben június elején, azonban a tünetes minták 49%-ában jelen volt a *Botryosphaeria* és *Diaporthe* nemzetségbe sorolható gombák, tehát már a termésfejlődés közepén kialakulhatnak a két nemzetség tagjai által okozott tünetek a dióburok-fúrólégy esetleges kártétele előtt. A BUDMON és ONFIT alkalmazhatóságát jelen tanulmányban teszteltük először hazánkban a diót veszélyeztető betegségkomplex vizsgálatára.

Eredményeink hatására nem kísérleti körülmények között a jánkmajtisi dióültetvényben 2019-ben kiterjesztett növényvédelmi kezelést alkalmaztak, mely hatékonynak bizonyult a betegség megfékezésében. A tebukanozol tartalmú szer korábban, a tavasz második felében, és ismétlésben történő alkalmazása hozzájárulhat a dió gombás betegségkomplexének kontrollálásához. A fogyaszthatatlan termések

aránya 77%-ról 33%-ra csökkent. A diópatogén *Botryosphaeria* és *Diaporthe* nemzetségek a termések 6%-ából volt kitenyészthető. Azonban a fogyasztásra alkalmatlan termések aránya nem követte teljes mértékben ezt a trendet, ami a *Penicillium* spp. nagyarányú jelenlétével hozható kapcsolatba és további élelmiszerbiztonsági kockázatokat rejthet magában.

Az optimális növekedési hőmérséklet megállapításakor a tesztelt két *B. dothidea* vizsgálatakor bebizonyosodott a hőtűrésük, valamint 30 °C-on produkált 15 mm-es napi növekmény szintén alátámasztja a faj melegkedvelő voltát. A *D. eres* fajba tartozó izolátumok nem bizonyultak hőtűrőnek, azonban az emelkedő hőmérséklettel szembeni érzékenyséjük eltérő volt, ami hozzájárulhat a betegség súlyosságához, mivel a növény így szélesebb hőmérsékleti tartományban van kitéve optimális körülmények mellett szaporodó és kolonizáló *D. eres* kórokozóknak.

A zöld diók ágból, rügyből és termésből származó *D. eres* és *D. seriata* gombákkal történő *in vitro* fertőzése során a termések 81%-ánál elrothadt a zöld burok három hét után. A *D. eres* izolátumok súlyosabb tüneteket váltottak ki a *D. seriata* izolátumokhoz képest. A bélállományokon detektált 89%-os tünetmegjelenés és a sikeres kórokozó visszaizolálás alapján az inokulum bejutott a belső szövetekbe is, tehát fennállhat a termések késői fertőződése és károsodása, a kórokozók megjelenése pedig szeptemberig gondot okozhat.

A tünetes termésekből izolált *B. dothidea* és *D. eres* törzsek diófa ágakra történő inokulálásának eredményei bizonyította a patogenitásukat. A *D. eres* okozta a legnagyobb elváltozásokat. A *B. dothidea* által kiváltott legnagyobb átlagos lézió hossza 99 mm volt, így ezen faj fertőzőképessége a dió fás szöveteit tekintve közepesnek mondható. A *D. eres* jelentős virulenciája az ágakban és a megfelelő növekedéshez szükséges széles hőmérsékleti tartománya hozzájárulhat a rügyek és termések fertőződéséhez akár a növény belső szövetein keresztül, akár a külső kérgen képződő spórák terjedésével.

Tanulmányoztuk a *B. dothidea*, *D. eres* és *D. seriata* fajba sorolt, diófa szöveteiből származó izolátumok virulenciáját almafa ágakon, mely során nem csak kolonizálták a szöveteket, hanem elváltozásokat is okoztak. A két *Botryosphaeriaceae* családba tartozó izolátum hasonló tüneteket okozott. Ezeknél enyhébb elváltozásokat váltott ki a *D. eres*. Tehát a dióbetegségben szerepet játszó fajok a hazánkban új potenciális gazdaszervezet-kórokozó kölcsönhatásokat létesíthetnek, amely később pusztító betegségekhez vezethet, ismerve a fertőzőképességüket, mely alátámasztja a szomszédos

növénykultúrák tüneteinek monitorozásának fontosságát az esetleges keresztfertőzések időben történő észlelése érdekében.

Célul tűztük ki az alkalmazható fungicidek meghatározását. A mérgezett agaros teszt során alkalmazott négy készítmény közül három szinte teljes mértékben gátolta a *B. dothidea* és *D. eres* izolátumok növekedését (ciprodinil 37,5% + fludioxonil 25%, fluopiram 17,7% + tebukonazol 17,7%, tebukonazol 25%). Ezek közül a tebukonazol hatóanyaggal rendelkező Folicur Solo készítményt vizsgáltuk tovább az EC50 értékek meghatározására. A kapott értékek (0,11-0,29 mg/l) az engedélyokiratban szereplő értéknél (46,88 mg/l) jelentősen alacsonyabbak voltak. A kutatásunkba bevont növényvédő szerek alkalmazása segítheti a *B. dothidea* és *D. eres* kórokozók elleni eredményes védekezést, és az általuk okozott termésrothadás mértékének csökkentését.

Az *Epicoccum nigrum* Biokontroll Indexe mind a négy, a vizsgálatba bevont patogén törzzsel szemben közepes mértékű volt (47-53%), azonban az antagonista nem volt képes ránni a patogén gombák tenyészeire. A gátló hatás mértéke tehát nem megfelelő az *E. nigrum* hatékony alkalmazásához a dió gombás megbetegedése ellen. A TR08-as *Trichoderma gamsii* 100%-os Biokontroll Indexe azonban ígéretes lehetőségeket rejthet magában a dió terméskárosodásával járó gombás fertőzések megfékezésében.

A dióból kitenyésztett gombák közül a *B. dothidea*, a *D. eres* és a *D. seriata* kórokozó fajokba sorolt törzseinket genetikai polimorfizmusaik alapján sikeresen elkülönítettük, valamint fajon belüli eltéréseket is detektáltunk. A kapott allélprofilok alapján készült filogenetikai fák elemzése szerint a *D. eres* izolátumokat tekintve bizonyos genotípusok csak a növény egyes részeit kolonizálták. Több esetben a klaszterekben található törzsek különböző növényi részekről származtak, mely azt jelezheti, hogy a fertőzés néhány forrásból indulhatott ki az ültetvényben. Földrajzi hely és a kolonizált növényi szövetek között nem volt összefüggés megfigyelhető. A nagyon hasonló genetikai profillal rendelkező termésről és rügyről izolált törzsek megerősítik azt a hipotézist, hogy a barkarügyekről induló kórokozó kolonizálhatja a termővirágokat és a termést, messzemenő következtetést azonban további vizsgálatokat követően vonhatunk le. A vizsgált patogén gombák genetikai variabilitása nagymértékű volt, alacsony genetikai távolságok mellett.

9. SUMMARY

Walnut is the most popular and most widely cultivated nut tree in Hungary. The area of walnut orchards is growing year by year, the export of walnuts is significant, but the harvested amount shows a decreasing trend (FAOSTAT, 2021). This may be due to the appearance of new pests, pathogens and the unprecedented low kernel quality in the last 10 years in Hungary (Voigt-Tóth, 2013; Kovács et al., 2018). The fungal infection of walnut trees is a complex disease. The presence of *Diaporthe* genus on diseased walnut and walnut tree bark tissues was reported in Hungary 20 years ago (Kadlicskó et al., 2003). In the last decade, walnut rot has become serious worldwide, causing significant yield loss in nut plantations (Chen et al., 2014; Meng et al., 2018; Moral et al., 2019).

The primary goal of the research was the isolation of fungi from different parts of the walnut tree and the identification of pathogens with morphological characteristics and molecular marker sequences. First, we performed an early summer study of symptomatic and asymptomatic branches, immature fruits and buds. Seven-seven cultures of isolated fungi were classified into the genera *Diaporthe* and *Diplodia*. In 25% of the samples, as well as in 35% of the sampled trees, one of these pathogenic fungi were found, which were mostly isolated from symptomatic plant tissues. Latent infection was therefore not typical in the investigated plant tissues during this period. Based on the ITS and *tefl* marker sequences, the strains isolated from walnut trees belonged to the species *Diplodia seriata* and *Diaporthe eres*, which were the first ones to be isolated and identified using molecular markers from Hungarian walnut trees. These fungi may colonize and damage branches, and they can easily infect the trees through pruning wounds, pedicles or damage caused by mites, so it is recommended to monitor the plantations onset of vegetation (Moral et al., 2019).

As a next step, apparently healthy and symptomatic walnuts were collected from three plantations (Hajdúdorog, Tarpa, Jánkmajtis), during the harvest. Almost three-quarters (67,5%) of the kernels were classified as not edible, of which 19,5% were completely rotted. Fungi belonging to the genera *Alternaria* (31%), *Diaporthe* (26%), *Penicillium* (22%), *Botryosphaeria* (13%) and *Fusarium* (9%) were grown from the nuts. Usually, more than one fungi were identified from one nut. In contrary to the early summer survey, the genus *Diplodia* was not cultured, however, *Botryosphaeria* spp., were detected, for the first time in this study. Based on the molecular phylogenetic analysis, it was identified as *Botryosphaeria dothidea*. To the best of our knowledge, it

was the first reliable detection in Hungary from walnut. *Diaporthe* isolates were classified as *D. eres*.

The relationship between the condition of the walnuts and their fungal populations was characterized by McKinney-index (Imc%) values to quantify the severity of the symptoms. This value was the highest for the infection with *Botryosphaeria* (74%) and *Diaporthe* (62%) genera, indicating their importance in walnut rot. The Imc% values of kernels were the highest, either when these genera were grown alone or together from the rotten nuts.

The following year, at the end of winter and dormancy, *Diaporthe* spp. was found in 44% of the monitored catkins in the plantation that suffered the most severe crop damage at the previous year (Jánkmajtis). Isolates were classified as *D. eres* based on genetic methods. Pathogens belonging to the genus *Botryosphaeria* were isolated from only four buds. Both groups of fungi were present in 40-40% of the collected compound buds. Based on these results, the method (BUDMON) can be used for early monitoring of the fungal walnut disease and for estimation of plant protection risks in Hungary. The ONFIT analysis of the immature fruits from Jánkmajtis, Tarpa and Alsószentiván excluded the latent infection at the beginning of June in. However, *Botryosphaeria* and *Diaporthe* species were present in 49% of the symptomatic samples, consequently the symptoms caused by these two genera may develop already in the middle of fruit development, before the damage of walnut husk fly. In this study, BUDMON and ONFIT successfully tested for the first time in Hungary to survey the walnuts threatening disease complex.

As a result of our data, fungicide treatment with tested, effective fungicide was used in extended time span in the walnut plantation under non-experimental conditions in Jánkmajtis in 2019. The technology was proved to be effective in controlling the disease. The proportion of inedible kernels decreased from 77% to 33%, and the walnut pathogenic *Botryosphaeria* and *Diaporthe* genera were cultured from 6% of the fruits. The early application of tebuconazole, in the second half of spring, and repeatedly could contribute to the control of the fungal disease complex of walnuts. However, the proportion of fruits unsuitable for consumption remains higher, than the infection with those two genera. *Penicillium* spp. were present in the diseased nuts in high proportion, indicating additional food safety risks.f

During determining the optimal growth temperature, the heat tolerance of the two tested *B. dothidea* was verified, and the 15 mm daily growth at 30 °C also supports the

higher temperature preference of the species. The *D. eres* isolates did not tolerate high temperature, but their sensitivity to rising temperatures was different. This characteristic may contribute to the effective growth and colonization of the walnut tree by the *D. ere* at wide temperature range

When green fruits were inoculated *in vitro* with *D. eres* and *D. seriata* fungi from branches, buds and fruits, 81% of the husk of the fruits rotted after three weeks. *D. eres* isolates caused more severe symptoms compared to *D. seriata* isolates. Based on the symptomatic kernels (89%) and the successful re-isolation of the pathogens, the inoculum also entered the internal tissues, so late infection may result damaged fruits, and the appearance of pathogens may cause problems until September.

The inoculation of *B. dothidea* and *D. eres* strains isolated from symptomatic nuts on walnut tree branches proved their pathogenicity. *D. eres* caused the largest lesions (170 mm). The length of the largest lesion caused by *B. dothidea* was 99 mm, so the infection potential of this species was considered to be medium on the woody tissues of walnut. The significant virulence of *D. eres* on the branches and the wide range of optimal temperature for growing may contribute to the infection of the buds and fruits either through the internal tissues of the plant or by the spread of spores formed on the outer bark.

The virulence of *B. dothidea*, *D. eres* and *D. seriata* walnut pathogens were studied on apple tree twigs. They colonized the tissues and lesions were also detected. The two isolates belonging to the Botryosphaeriaceae family caused similar, medium serious symptoms, while *D. eres* caused milder lesions. So, the species involved in this walnut disease in Hungary can establish new potential host-pathogen interactions, which later may cause devastating diseases, based on their infectiousness. This supports the importance of monitoring the symptoms of neighbouring plant cultures to detect potential cross-infections in time.

We aimed to determine the effective fungicides against the isolated pathogens. Three of the four formulation used during the poisoned plates almost completely inhibited the growth of *B. dothidea* and *D. eres* isolates (cyprodinil 37.5% + fludioxonil 25%, fluopyram 17.7% + tebuconazole 17.7%, tebuconazole 25%). Among these, the product with the active ingredient tebuconazole was further investigated to determine the EC50 values. The obtained concentrations (0.11-0.29 mg/l) were significantly lower than the recommended one in the license document (46.88 mg/l). These fungicides can control *B. dothidea* and *D. eres* and reduce the percentage of fruit rot caused by them.

The Biocontrol-Index of *Epicoccum nigrum* was moderate (47-53%), however, the antagonist was not able to grow on the cultures of the pathogenic fungi. This inhibitory potential is not adequate for the effective use of *E. nigrum* against fungal diseases of walnuts. However, the 100% Biocontrol-Index of *T. gamsii* TR08 indicating promising alternatives to fungicides in the control of fungal infections associated with nut damage.

Our strains classified as pathogenic species *B. dothidea*, *D. eres* and *D. seriata* were successfully separated based on their genetic polymorphisms, and intra-species differences were also detected. According to the analysis of the phylogenetic trees based on the obtained microsatellite allelic profiles, certain genotypes colonized only certain parts of the plant in terms of *D. eres* isolates. In several cases, the strains found in the clusters came from different plant parts, which may indicate that the infection could have originated from several sources in the plantation. No correlation was observed between geographical location and colonized plant tissues. The strains isolated from nuts and buds with a very similar genetic profile confirm the hypothesis that the infection may originate from the catkins, fungi can colonize the flowers and the fruits, but a far-reaching conclusion can be drawn after further investigations. The genetic variability of the tested pathogenic fungi was high, with low genetic distances.

10. IRODALOM

1. Abdollahzadeh J.: 2015. *Diplodia bulgarica*, as a new pathogen and potential threat to the apple industry in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*. 54. 128–132.
2. Abramczyk B. A.–Dorota E.–Król D. E.–Zalewska E. D.–Zimowska B.: 2020. Influence of temperature and fungal community on growth and sporulation of *Diaporthe* from fruit plants. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 19. 71–79.
3. Abramczyk B. A.–Król E. D.–Zalwska E. D.–Zimowska B.: 2018. Morphological characteristics and pathogenicity of *Diaporthe eres* isolates to the fruit tree shots. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 17. 125–133.
4. Agrios G. N.: 2005. Plant pathology. (5th ed.). Elsevier Academic Press. San Diego. 386-390.
5. Agustí-Brisach C.–Moral J.–Felts D.–Trapero A.–Michailides T. J.: 2019. Interaction between *Diaporthe rhusicola* and *Neofusicoccum mediterraneum* causing branch dieback and fruit blight of English walnut in California, and effect of pruning wounds to the infection. *Plant Disease*. 103. 1196-1205.
6. Ahimera N.–Gisler S.–Morgan D.–Michailides T. J.: 2004. Effects of Single-Drop Impactions and Natural and Simulated Rains on the Dispersal of *Botryosphaeria dothidea* Conidia. *Phytopathology*. 94. 1189–1197.
7. Akgül D. S.–Nawaz Awan Q.: 2022. Characterization of *Diaporthe ampelina* isolates and their sensitivity to hot-water treatments and fungicides in in vitro. *Journal of Agriculture and Nature*. 25. 1378-1389.
8. Ali S.–Renderos W.–Bevis E.–Hebb J.–Abbasi P. A.: 2020. *Diaporthe eres* causes stem cankers and death of young apple rootstocks in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 42. 218-227.
9. Amaral J. S.–Casal S.–Pereira J.–Seabra R.–Oliveira B.: 2003. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51. 7698-7702.
10. Amaral J. S.–Cunha S.–Alves M. R.–Pereira J. A.–Seabra R. M.–Oliveira M. B. P. P.: 2004. Triacylglycerols composition of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars: characterization by HPLC/ELSD and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52. 7664-7969.

11. Amselem J.–Cuomo C. A.–Van Kan J. A.–Viaud M.–Benito E. P.–Couloux A.–Coutinho P. M.–De Vries R. P.–Dyer P. S.–Fillinger S.–Fournier E.–Gout L.–Hahn M.–Kohn L. M.–Lapalu N.–Plummer K. M.–Pradier J.–Quévillon E.–Sharon A.–Dickman M.: 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*. 7. e1002230.
12. Andersen B.–Krøger E.–Roberts R. G.: 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*. 106. 2. 170–182.
13. Andersen G. L.–Frisch A. S.–Kellogg C. A.–Levetin E.–Lighthart B.–Paterno D.: 2009. Aeromicrobiology/air quality. [In: *Schaechter M.* (ed.) *Encyclopedia of microbiology*, 3rd edition.]. Academic Press. Amsterdam, 11-26.
14. Andersen K. F.–Morris L.–Derksen R. C.–Madden L. V.–Paul P. A.: 2014. Rainfastness of prothioconazole + tebuconazole for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol management in soft red winter wheat. *Plant Disease*. 98. 1398–1406.
15. Anderson K. J.–Teuber S. S.–Gobeille A.–Cremin P.–Waterhouse A. L.–Steinberg F. M.: 2001. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *The Journal of Nutrition*. 131. 2837-2842.
16. Araujo F. D.–Favaro L. C.–Araujo W. L.–De Oliveira F. L.–Aparicio R.–Marsaioli A. J.: 2012. Epicolactone–Natural product isolated from the sugarcane endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *European Journal of Organic Chemistry*. 27. 5225-5230.
17. Arciuolo R.–Leggieri M. C.–Chiusa G.–Castello G.–Genova G.–Spigolon N.–Battilani P.: 2021. Ecology of *Diaporthe eres*, the causal agent of hazelnut defects. *PLoS One*. 16. e0247563.
18. Ash G. J.–Stodart B.–Sakuanrungrasirikul S.–Anschaw E.–Crump N.–Hailstones D.–Harper J. D. I.: 2010. Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. *Mycologia*. 102. 54–61.
19. Augusto J.–Brenneman T. B.–Culbreath A. K.–Sumner P.: 2010. Night spraying peanut fungicides I. Extended fungicide residual and integrated disease management. *Plant Disease*. 4. 676–682.
20. Bagy H. M. K.–Hassan E. A.–Nafady N. A.–Dawood M. F.: 2019. Efficacy of arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic strain *Epicoccum nigrum* ASU11 as biocontrol agents against blackleg disease of potato caused by bacterial strain

- Pectobacterium carotovora* subsp. *atrosepticum* PHY7. *Biological Control*. 134. 103–113.
21. Bai Q.–Zhai L.–Chen X.–Hóng N.–Xú W.–Wang G.: 2015. Biological and Molecular Characterization of Five *Phomopsis* Species Associated with Pear Shoot Canker in China. *Plant Disease*. 99. 1704–1712.
 22. Balci I.–Balta F.–Kazankaya A.–Sen S. M.: 2001. Promising native walnut genotypes (*Juglans regia* L.) of the east Black Sea region of Turkey. *Journal American Pomological Society*. 55. 204–208.
 23. Battilani P.–Chiusa G.–Arciuolo R.–Somenzi M.–Fontana M.–Castello G.–Spigolon N.: 2018. *Diaporthe* as the main cause of hazelnut defects in the Caucasus region. *Phytopathologia Mediterranea*. 57. 320–333.
 24. Beasley D. R.–Joyce D. C.–Coates L. M.–Wearing A. H.: 2001. Saprophytic microorganisms with potential for biological control of *Botrytis cinerea* on Geraldton waxflower flowers. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 41. 693–703.
 25. Bega R. J.–Smith R. S.–Matinez A. P.–Davis C. J.: 1978. Severe damage to *Pinus radiata* and *Pinus pinaster* by *Diplodia pinea* and *Lophodermium* spp. on Molakai and Lunai in Hawaii. *Plant Disease Reporter*. 62. 329–331.
 26. Belisario A.–Forti E.–Balmas V.–Valier A.–Corazza L.: 1999. La fusariosi del frutto di noce comune. *L'Informatore Agrario*. 21. 51–52
 27. Belisario A.–Maccaroni M. –Coramusi A. –Corazza L. –Figuli P.–Pryor B. M.: 2004. First report of *Alternaria* species groups involved in disease complexes of hazelnut and walnut fruit. *Plant Disease*. 88. 404.
 28. Berbee M. L.–Taylor J. W.: 2007. Rhynie chert: a window into a lost world of complex plant–fungus interactions. *New Phytologist*. 174. 475–479.
 29. Bian J. Y.–Fang Y. L.–Song Q.–Sun M. L.–Yang J. Y. –Ju Y. W.–Li D. W.–Huang L.: 2020. The fungal endophyte *Epicoccum dendrobii* as a potential biocontrol agent against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*. 111. 293–303.
 30. Birren B.–Fink G.–Lander E.: 2003. Fungal genome initiative: white paper developed by the fungal research community. Whitehead Institute Center for Genome Research. MA, Cambridge.
 31. Boddy L.–Griffith G. S.: 1989. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. *Sydowia*. 41. 41–73.

32. Boriss H.–Brunke H.–Kreith M.: 2006. Commodity Profile: English Walnuts. Agricultural Issues Center. University of California, Davis.
33. Bostock R. M.–Pye M. F.–Roubtsova T. V.: 2014. Exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annual Review of Phytopathology*. 52. 517–549.
34. Botella L.–Diez J. J.: 2011. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*. 47. 9–18.
35. Braga R. M.–Padilla G.–Araújo–W. L.: 2018. The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: Diversity of secondary metabolites. *Critical Reviews in Microbiology*. 44. 759–778.
36. Bräse S.–Encinas A.–Keck J.–Nising C. F.: 2009. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*. 109. 3903–3990.
37. Brasier C. M.: 1996. Phytophthora cinnamomi and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annals of Forest Science*. 53. 347–358.
38. Brent K. J.–Atkin R. K.: 1987. Rational Pesticide Use. *Cambridge University Press*.
39. Brown E. A.–Britton K. O.: 1986. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southeastern United States. *Plant Disease*. 70. 480–484.
40. Brown J. F.: 1997. Survival and dispersal of plant parasites: general concepts. [In: *Brown J. F.–Ogle H. J. (eds.) Plant Pathogens and Plant Diseases.*]. Rockvale Publication, Armidale. 196–199.
41. Brown-Rytlewski D. E.–McManus P. S.: 2000. Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on apple and management of stem cankers with fungicides. *Plant Disease*. 84. 1031–1037.
42. Brózik S.–Kállayné M. E.: 2001. Csonthéjas és héjas fajták. Gyümölcsfajták 2. Mezőgazda Kiadó. Budapest.
43. Burgess T. I.–Barber P. A.–Hardy G. E. St. J.: 2005. *Botryosphaeria* spp. associated with eucalypts in Western Australia including description of *Fusicoccum macroclavatum* sp. nov. *Australasian Plant Pathology*. 34. 557–567.
44. Burgess T. I.–Sakalidis M.–Hardy G. E. St. J.: 2006. Gene flow of the canker pathogen *Botryosphaeria australis* between *Eucalyptus globulus* plantations and native eucalypt forests in Western Australia. *Austral Ecology*. 31. 559–566.
45. Büntgen U.–Krusic P. J.–Piermattei A.–Coomes D. A.–Esper J. Myglan V. S.–Kirdyanov A. V.–Camarero J. J.–Crivellaro A.–Körner C.: 2019. Limited capacity

- of tree growth to mitigate the global greenhouse effect under predicted warming. *Nature Communications*. 10. 2171.
46. Cáceres M.–Lolas M.–Gutierrez M.–Ferrada E.–Díaz G. A.: 2016. Severe Outbreak of Black Rot in Apple Fruit cv. Fuji Caused by *Diplodia seriata* During Pre-Harvest in Maule Region. *Chile Plant Disease*. 100. 2333-2333.
 47. Caffi T.–Rossi V.: 2018. Fungicide models are key components of multiple modelling approaches for decision-making in crop protection. *Phytopathologia Mediterranea*. 57. 153–169.
 48. Çağlarirmak N.: 2003. Biochemical and physical properties of some walnut genotypes (*Juglans regia* L.). *Nahrung/Food*. 47. 28-32.
 49. Carbone I.–Kohn L. M.: 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91. 3. 553–556.
 50. Carroll G. C.: 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials.[In: Fokkema N. J.–Heuvel J van den (eds.) *Microbiology of the phyllosphere*.]. Cambridge University Press. Cambridge. 205–222.
 51. Castlebury L. A.–Mengistu A.: 2006. Phylogenetic distinction of *Diaporthe/Phomopsis* isolates from soybeans. *Systematic Mycology and Microbiology*. 57. 1-13.
 52. Cesati V.–De Notaris G.: 1863. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri oiu' o meno appartenenti al genera *Sphaeria* nell'antico significato attribuitoglide. Persoon. *Commentario della Società Crittogamologica Italiana*. 1. 177–240.
 53. Chakraborty S.–Newton A. C.: 2011. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology*. 60. 2–14.
 54. Chaloner T. M.–Gurr S. J.–Bebber D. P.: 2021. Plant pathogen infection risk tracks global crop yields under climate change. *Nature Climate Change*. 11. 710–715.
 55. Chen S. F.–Morgan D. P.–Hasey J. K.–Anderson K.–Michailides T. J.: 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California. *Plant Disease*. 98. 636–652.
 56. Cloete M.–Fourie P. H.–Damm U.–Crous P. W.–Mostert L.: 2011. Fungi associated with die-back symptoms of apple and pear trees, a possible inoculum source of grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. 50. 176–190.

57. Coakley S. M.–Scherm H.–Chakraborty S.: 1999. Climate change and plant disease management. *Annual Review of Phytopathology*. 37. 399-426.
58. Costa J. H.–Wassano C. I.–Angolini C. F. F.–Scherlach K.–Hertweck C.–Pacheco F. T.: 2019. Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Scientific Reports*. 9. 18647.
59. Costello A.–Abbas M.–Allen A.–Ball S.–Bell S.–Bellamy R.–Friel S.–Groce N.–Johnson A.–Kett M.: 2009. Managing the health effects of climate change. *The Lancet Commisions*. 373. 1693–1733.
60. Crespo M.–Moral J.–Michailides T. J.–Trouillas F. P.: 2018. First Report of Black Rot on Apple Fruit Caused by *Diplodia seriata* in California. *Plant Disease*. 102. 4.
61. Crous P. W.–Slippers B.–Wingfield M. J.–Rheeder J.–Marasas W. F. O.–A.J.L. Philips A. J. L.–Alves A.–Burgess T.–Barber P.–Groenewald J. Z.: 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology*. 55. 235-253.
62. D'Costa V. M.–King C.–Kalan L.–Morar M.–Sung W. W. L.–Schwarz C.–Froese D. G.–Zazula G. D.–Calmels F.–Debruyne R.–Golding G.–B Poinar H. N.–Wright G. D.: 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 477. 457–461.
63. Daub M. E.–Chung K. R.: 2009. Photoactivated perylenequinone toxins in plant pathogenesis. *Plant Relationships*. 5. 201-219.
64. Davis L.–Stonehouse W.–Loots D. T.–Mukuddem–Petersen J.–van der Westhuizen F.–Hanekom S. J.–Jerling J. C.: 2007. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. *European Journal of Nutrition*. 46. 155-164.
65. Davis M. B.–Shaw R. G.: 2001. Range Shifts and Adaptive Responses to Quaternary Climate Change. *Science*. 292. 673–679.
66. De Bary A.: 1866. Morphologie and Physiologie der Pilze, Flechten and Myxomyceten, Holfmeister's Handbook of Physiological Botany. W. Engelmann. Leipzig
67. de Wet J.–Burguss T.–Slippers B.–Preisig O.–Wingfield B. D.–Wingfield M. J.: 2003. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research*. 107. 557-566.
68. Denman S.–Crous P. W.–Groenewald J. Z. E.–Slippers B.–Wingfield B. D.–Wingfield M. J.: 2003. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with

- Proteaceae* based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia*. 95. 294-307.
69. Denman S.–Crous P. W.–Taylor J. E.–Kang J. C.–Pascoe I.–Wingfield M. J.: 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*. 45. 129-140.
 70. Desprez-Loustau M. L.–Marcais B.–Nageleisen L. M.–Piou D. Vannini A.: 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science*. 63. 597–612.
 71. Diogo E. L. F.–Santos J. M.–Phillips A. J. L.: 2010. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity*. 44. 107–115.
 72. Dissanayake A. J.–Phillips A. J. L.–Hyde K. D.–Yan J. Y.–Li X. H.: 2017. The current status of species in *Diaporthe*. *Mycosphere*. 8. 1106–1156.
 73. Doehlemann G.–Ökmen B.–Zhu W.–Sharon A.: 2017. Plant pathogenic fungi. *Microbiology Spectrum*. 5.
 74. Drăganescu E.–Nedelea G.–Mihut E.–Blidariu A.: 2001. Researches concerning the germplasm variability of walnut (*Juglans regia*) existing in Banat Romania. *Acta Horticulturae*. 544. 133-140.
 75. Duso C.: 1991. Sulla comparsa in Italia di un Tefritide neartico del nocce: *Rhagoletis completa* Cresson (Diptera: Tephritidae). *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*. 23. 203–209
 76. Duso C.–Lago G. D.: 2006. Life cycle, phenology and economic importance of the walnut husk fly *Rhagoletis completa* Cresson (Diptera: Tephritidae) in northern Italy. *Annales de la Société entomologique de France*. 42. 245–254.
 77. Ebbole D. J.: 2007. Magnaporthe as a model for understanding Host-Pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 45. 437–456.
 78. Eichmeier A.–Pecenka J.–Spetik M.–Necas T.–Ondrasek I.–Armengol J.–León M.–Berlanas C.–Gramaje D.: 2020. Fungal trunk pathogens associated with *Juglans regia* in the Czech Republic. *Plant Disease*. 104. 761–771.
 79. Eke I.: 1997. In: Soltész M. (szerk.) Integrált Gyümölcsstermesztés. Mezőgazda Kiadó. Budapest.

80. Eriksen G. S.–Jäderlund K. H.–Moldes-Anaya A.–Schönheit J.–Bernhoft A.–Jaeger G.–Rundberget T.–Skaar I.: 2010. Poisoning of dogs with tremorgenic *Penicillium* toxins. *Medical Mycology*. 48. 188–196.
81. Evans E.: 1977. Efficient use of systemic fungicides. [In: (Marsh R. W. (ed.) *Systemic Fungicides*.]. Longman. London. 199–239.
82. Fan K.–Fu L.–Liu H.–Qu J.–Zhang G.–Zhang S.–Qiao K.: 2022. Reduced sensitivity to tebuconazole in *Botryosphaeria dothidea* isolates collected from major apple production areas of China. *Plant Disease*. 106. 2817–2822.
83. Fan X. L.–Yang Q.–Tian C. M.–Bezerra D. P. J.–Alvarez V. L.: 2018. *Diaporthe* from walnut tree (*Juglans regia*) in China, with insight of the *Diaporthe* eres complex. *Mycological Progress*. 17. 841–853.
84. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations.: 2011. Save and Grow. Food and agriculture organization. www.fao.org/docrep/014/i2215e/i2215e.pdf. (Letöltve: 2022. 11. 16.)
85. Faostat.: 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Data and statistics for walnut. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Letöltve: 2023. 03.28).
86. Farr D. F.–Castlebury L. A.–Rossman A. Y.–Putnam M. L.: 2002. A new species of *Phomopsis* causing twig dieback of *Vaccinium vitis-idaea* (lingonberry). *Mycological Research*. 106. 745–752.
87. Favaro L. C.–Sebastianes F. L.–Araujo W. L.: 2012. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS One*. 7. e36826.
88. Fettig C. J.–Grosman D. M.–Munson A. S.: 2013. Efficacy of abamectin and tebuconazole injections to protect lodgepole pine from mortality attributed to mountain pine beetle (Coleoptera: Curculionidae) attack and progression of blue stain fungi. *Journal of Entomological Science*. 48. 270–278.
89. Filizola P. R. B.–Luna M. A. C.–de Souza A. F.–Coelho I. L.–Laranjeira D.–Campos-Takaki G. M.: 2019. Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. *Microbial Cell Factories*. 18. 89.
90. Fisher P. J.–Petrini O.–Sutton B. C.: 1993. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus nitens* in Australia and England. *Sydowia*. 45. 338–345.

91. Flowers J.–Nuckles E.–Hartman J.–Vaillancourt L.: 2001. Latent infection of Austrian and Scots pine tissues by *Sphaeropsis sapinea*. *Plant Disease*. 85. 1107-1112.
92. Friesen T. L.–Zhang Z. C.–Solomon P. S.–Oliver R. P.–Faris J. D.: 2008. Characterization of the interaction of a novel *Stagonospora nodorum* host-selective toxin with a wheat susceptibility gene. *Plant Physiology*. 146. 682-693.
93. Fung F.–Clark R. F.: 2004. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology*. 42. 217-234.
94. Garcia J. F.–Lawrence D. P.–Morales-Cruz A.–Travadon R.–Minio A.–Hernandez-Martinez R.–Rolshausen P.E.–Baumgartner K.–Cantu D.: 2021. Phylogenomics of plant-associated *Botryosphaeriaceae* species. *Frontiers in Microbiology*. 18. 652802.
95. Garcia-Reyne A.–López– Medrano F.–Morales J. M.–García Esteban C.–Martín I.–Eraña I.–Meije Y.–Lalueza A.–Alastruey– Izquierdo A.–Rodríguez– Tudela J. L.–Aguado J. M.: 2011. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transplant Infectious Disease*. 13. 204-207.
96. Garrett K. A.–Mundt C. C.: 1999. Epidemiology in mixed host populations. *Phytopathology*. 89. 984-990.
97. Gaskin R. E.–Steele K. D.: 2009. A comparison of sticker adjuvants for their effects on retention and rainfastening of fungicide sprays. *New Zealand Plant Protection*. 62. 339-342.
98. Ghorbanpour M.–Omidvari M.–Abbaszadeh-Dahaji P.–Omidvar R.–Kariman K.: 2018. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*. 117. 147-157.
99. Gil E.–Llorens J.–Landers A. J.–Llop J.–Giralt L.: 2011. Field validation of dosaviña, a decision support system to determine the optimal volume rate for pesticide application in vineyards. *European Journal of Agronomy*. 35. 33-46.
100. Gomes R. R.–Glienke C.–Videira S. I. R.–Lombard L.–Groenewald J. Z.–Crous P. W.: 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*. 31. 1-41.
101. Gonzalo A. D.–Bernardo A.–Juan P.: 2017. Identification and characterization of *Diaporthe ambigua*, *D. australafricana*, *D. novem*, and *D. rudis* causing a postharvest fruit rot in kiwifruit. *Plant Disease*. 101. 1402-1410.

102. Goulson D.: 2013. REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*. 50. 977–987.
103. Gourgues M.–Simon A.–Lebrun M.–Levis C.: 2003. The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology*. 51. 619–629.
104. Guillén L.–Aluja M.–Rull J.–Höhn H.–Schwizer T.–Samietz J.: 2011. Influence of walnut cultivar on infestation by *Rhagoletis completa*: behavioural and management implications. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 140. 207–217.
105. Gusella G.–Giambra S.–Conigliaro G.–Burruano S.–Polizzi G.: 2020. Botryosphaeriaceae species causing canker and dieback of English walnut (*Juglans regia*) in Italy. *Forest Pathology*. 51. 12661.
106. Hanifeh S.–Ghosa Y.–Abbasi S.: 2014. First report of *Diplodia seriata*, the causal agent of canker disease of apple trees in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 50. 2.
107. Haueisen J.–Moller M.–Eschenbrenner C. J.–Grandaubert J.–Seybold H.–Adamiak H.–Stukenbrock E. H.: 2018. Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecology and Evolution*. 9. 275–294.
108. Hickler T.–Vohland K.–Feehan J.–Miller PA.–Smith B Costa L.–Giesecke T.–Fronzek S.–Carter, T. R. Cramer W.–Kühn I.–Sykes–M. T.: 2012. Projecting the future distribution of European potential natural vegetation zones with a generalized, tree species-based dynamic vegetation model. *Global Ecology and Biogeography*. 21. 50–63.
109. Hilário S.–Gonçalves M. F. M.–Alves A.: 2021: Using Genealogical Concordance and Coalescent-Based Species Delimitation to Assess Species Boundaries in the *Diaporthe* Complex. *Journal of Fungi*. 7. 507.
110. Hirsch A. M.–Kapulnik Y.: 1998. Signal Transduction Pathways in Mycorrhizal Associations: Comparisons with the Rhizobium-Legume Symbiosis. *Fungal Genetics and Biology*. 23. 205-212.
111. Hislop E. C.: 1966. The redistribution of fungicides on plants. Long Ashton Agricultural and Horticultural Research Station. *Annals of Applied Biology*. 184-188.
112. Hoeberg E. P.–Brooks D. R.: 2015. Evolution in action: climate change, biodiversity dynamics and emerging infectious disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 370. 1665.

113. Holb I.: 2002. A dió kórokozói. [In: Radócz L. (szerk.) A héjasok növényvédelme.]. Szaktudás Kiadó Ház. Budapest. 28-48.
114. Horsfall J. G.: 1945. Fungicides and their action. *Chronica Botanica*. USA. Waltham.
115. Howard R. J.–Ferrari M. A.–Roach D. H.–Money N. P.: 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88. 11281–11284.
116. Huber L.–Gillespie T. J.: 1992: Modeling Leaf Wetness in Relation to Plant Disease Epidemiology. *Annual Review of Phytopathology*. 30. 553–577.
117. Hunsche M.–Alexeenko A.–Damerow L.–Noga G.: 2011. Rain-induced removal of copper from apple leaves: Influence of rain properties and tank-mix adjuvants on deposit characteristics at the micro scale. *Crop Protection*. 30. 495–501.
118. Inderbitzin P.–Bostock R. M.–Trouillas F. P.–Michailides T. J.: 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. *Mycologia*. 102. 1350-1368.
119. Iváncsics J.: 2002. Integrált almatermesztés. NYME MTK. Mosonmagyaróvár.
120. Ivić D.–Novak A.: 2018. Fungi associated with nut rot in sweet chestnut, with the first record of *Gnomoniopsis smithogilvyi* in Croatia. *Pomologia Croatica*. 22. 13–22.
121. Jacobs K. A.–Rehner S. A.: 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa, *Mycologia*. 90. 4. 601-610.
122. Jaroszuk-Ścisł J.–Tyśkiewicz R.–Nowak A.–Ozimek E.–Majewska M.–Hanaka, A.–Tyśkiewicz K.–Pawlik A.–Janusz G.: 2019. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences*. 20. 4923.
123. Jiang L.–Jeong J. C.–Lee J. S.–Park J. M.–Yang J. W.–Lee M. H.–Choi S. H.–Kim C. Y.–Kim D.–Kim S. W.–Lee J.: 2019. Potential of *Pantoea dispersa* as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato. *Scientific Reports*. 9. 16354.
124. Johnson G. I.–Mead A. J. –Cooke A. W. –Dean J. R.: 1992. Mango stem end rot pathogens - Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology*. 120. 225-234.

125. Jones J. D. G.–Dangl J. L.: 2006. The plant immune system. *Nature*. 444. 323–329.
126. Kadlicskó S.–Pintér Cs.–Fischl G.–Voigt E.–Makó Sz.: 2003. A dió védelme. *Növényvédelem*. 39. 545-560.
127. Kim K. W.–Park E. W. –Kim K. S.: 2004. Glyoxysomal nature of microbodies complexed with lipid globules in *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology*. 94. 970-977.
128. Kim K. W.–Park E. W.–Ahn K. K.: 1999. Pre-penetration behavior of *Botryosphaeria dothidea* on apple fruits. *Plant Pathology Journal*. 15. 223-227.
129. Kim K. W.–Park E. W.–Kim Y. H.–K.–Ahn K.–Kim P. G.–K.S. Kim K. S.: 2001. Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology*. 91. 165-172.
130. Kim Y. K.–Kwak J. H.–Aguilar C. G.–Xiao C. L.: 2016. First Report of Black Rot on Apple Fruit Caused by *Diplodia seriata* in Washington State. *Plant Disease*. 100. 7.
131. Kiss M.–Hachoumi I.–Nagy V.–Ladányi M.–Gutermuth Á.–Szabó Á.–Sörös Cs.: 2021. Preliminary results about the efficacy of abamectin trunk injection against the walnut husk fly (*Rhagoletis completa*). *Journal of Plant Diseases and Protection*. 128. 333–338.
132. Koutb M.–Ali E. H.: 2010. Potential of *Epicoccum purpurascens* strain 5615 AUMC as a biocontrol agent of *Pythium irregulare* root rot in three leguminous plants. *Mycobiology*. 38. 286–294.
133. Kovács C.–Balling P.–Bihari Z.–Nagy A.–Sándor E.: 2017. Incidence of grapevine trunk diseases is influenced by soil, topology and vineyard age, but not by *Diplodia seriata* infection rate in the Tokaj Wine Region, Hungary. *Phytoparasitica*. 45. 21–32.
134. Kovács C.–Csótó A.–Pál K.–Nagy A.–Fekete E.–Karaffa L.–Kubicek C. P.–Sándor E.: 2021. The Biocontrol Potential of Endophytic *Trichoderma* Fungi Isolated from Hungarian Grapevines. Part I. Isolation, Identification and *In Vitro* Studies. *Pathogens*. 10. 1612.
135. Kovács C.–Peles F.–Bihari Z.–Sándor E.: 2014. Endophytic fungi associated with Grapevine Trunk Diseases, from Tokaj wine region, Hungary. *Növényvédelem*. 50. 153–159.

136. Kovács C.–Peles F.–Bihari Z.–Sándor E.: 2014. Endophytic fungi associated with Grapevine Trunk Diseases, from Tokaj wine region, Hungary. *Növényvédelem*. 50. 153–159.
137. Kovács C.–Takács F.–Zabiák A.–Karaffa E.: 2018. Identification of pathogenic fungi in rotten walnut fruits from different plantations in Hungary. *Journal Of Plant Pathology*. 100. 631.
138. Kozłowski T. T.–Pallardy S. G.: 1997. Growth control in woody plants. Academic Press, San Diego
139. Központi Statisztikai Hivatal.: 2017
https://www.ksh.hu/elemzesek/gyumolcs2017_elozetes/index.html (Letöltve: 2023. április 5.)
140. Központi Statisztikai Hivatal.: 2021
https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0025.html (Letöltve: 2023. április 5.)
141. Kudsk P.–Mathiassen S.K.–Kirknel E.: 1991. Influence of formulations and adjuvants on the rain fastness of maneb and mancozeb on pea and potato. *Pesticide Science*. 33. 57–71
142. Kumar S.–Steche G.–Tamura K. MEGA7: 2016. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33. 1870–1874.
143. Kybartaitė J.–Šernaitė, L.–Rasiukeviciute N.–Valiuškaite A.: 2020. Plants and fungal pathogens under climate change, a review. *Optimization of ornamental and garden plant assortment, technologies and environmen. Scientific articles*. 11. 37–45.
144. Lahlali R.–Hijri M.: 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology Letters*. 311. 152–159.
145. Larena I.–Torres R.–De Cal A.–Liñán M.–Melgarejo P.–Domenichini P.–Bellini A.–Mandrin J. F.–Lichou J.–de Eribe X. O.–Usual J.: 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control*. 32. 305–310.
146. Larkin M. A.–Blackshields G.–Brown N. P.–Chenna R.–McGettigan P. A.–McWilliam H.–Valentin F.–Wallace I. M.–Wilm A.–Lopez R.–Thompson J. D.–Gibson T. J.–Higgins D. G.: 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*. 23. 2947–2948.

147. León M.–Berbegal M.–Rodríguez-Reina J.–Elena G.–Abad-Campos P.–Ramón-Albalat A.–Olmo D.–Vincent A.–Luque J.–Miarnau X. Agustí-Brisach, C.–Trapero, A.–Capote, N.–Arroyo, F. T.–Avilés, M.–Gramaje, D.–Andrés-Sodupe, M.–Armengol, J.: 2020. Identification and characterization of *Diaporthe* spp. associated with twig cankers and shoot blight of almonds in Spain. *Agronomy*. 10. 1062.
148. Li C.–Zhang M.–Wei S.–Yang Z.–Pan X.: 2023. Study of Walnut brown rot caused by *Botryosphaeria dothidea* in the Guizhou Province of China. *Crop Protection*. 163. 106118.
149. Li L.–Tsao R.–Yang R.–Liu C. M.–H. H. Zhu H. H.–Young J. C.: 2006. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. 8033-8040.
150. Li Y.–Xia L. Q.–Wang Y. N.–Liu X. Y.–Zhang C. H.–Hu T. L.–Cao K. Q.: 2013. The inhibitory effect of *Epicoccum nigrum* strain XF1 against *Phytophthora infestans*. *Biological Control*. 67. 462–468.
151. Lin S.– Taylor N. J.– Hand F. P.: 2018. Identification and characterization of fungal pathogens causing fruit rot of deciduous Holly. *Plant Disease*. 102. 2430–2445.
152. Lindner K.–Burth U.–Stachewick H.–Gutsche V.: 1995. Beurteilung von Wirkung Komponenten neuer *Phytophthora*-fungizide auf der Basis von Modelluntersuchungen. *Nachrichtenblatt Deutsche Pflanzenschutzd.* 47. 297–303.
153. Lindner M.–Fitzgerald J. B.–Zimmermann N. E.–Reyer C.–Delzon S. Van Der Maaten–E.–Schelhaas M.–Lasch P.–Eggers J.–Van Der Maaten-Theunissen M.–Suckow F.–Psomas, A.–Poulter, B.–Hanewinkel, M.: 2014. Climate change and European forests: what do we know, what are the uncertainties, and what are the implications for forest management? *Journal of Environmental Management*. 146. 69–83.
154. Liu–P. Q.–Wei M. Y.–Zhu L.–Wang R. B.–Li B. J.–Weng Q. Y.–Chen Q. H.: 2018. First report of leaf spot on taro caused by *Epicoccum sorghinum* in China. *Plant Disease*. 102. 682–682.
155. Livermore D. M.: 2009. Has the era of untreatable infections arrived? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64. 29–36.

156. Lo Presti L.–Lanver D.–Schweizer G.–Tanaka S.–Liang L.–Tollot M.–Zuccaro A.–Reißmann S.–Kahmann R.: 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*. 66. 513–545.
157. Lombard L.–van Leeuwen G. C. M.–Guarnaccia V.–Polizzi G.–van Rijswijk P. C. J.–Rosendahl C. H. M.–Gabler J.–Crous P. W.: 2014. *Diaporthe* species associated with *Vaccinium*, with specific reference to Europe. *Phytopathologia Mediterranea*. 53. 287–299.
158. López-Moral A.–Lovera M.–Raya M. D.–Cortés-Cosano N.–Arquero O.–Trapero A.–Agustí-Brisach C.: 2020. Etiology of Branch Dieback and Shoot Blight of English Walnut Caused by Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* Species in Southern Spain. *Plant Disease*. 104 533–550.
159. Lukens R. J.: 1971. Chemistry of Fungicidal Action. Springer-Verlag. Berlin.
160. Luna I. J.–Besoin X.–Saa S.–Peach-Fine E.–Morales F. C.–Riquelme N.–Larach A.–Morales J.–Ezcurra E.–Ashworth V. E.–Rolshausen P. E.: 2022. Identity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from *Juglans regia* in Chile. *Phytopathologia Mediterranea*. 61. 79–94.
161. Ma Z.–Michailides T. J.: 2002. Characterization of Botryosphaeria dothidea isolates collected from pistachio and other plant hosts in California. *Phytopathology*. 92. 519–526.
162. Ma Z.–Morgan D. P.–Michailides T. J.: 2001. Effects of water stress on Botryosphaeria blight of pistachio caused by Botryosphaeria dothidea. *Plant Disease*. 85. 745–749.
163. Machowicz-Stefaniak Z.: 2009. The occurrence and biotic activity of *Phomopsis diachenii* Sacc. *Acta Agrobotanica*. 62. 125–135.
164. Madrigal C.–Tadeo J. L.–Melgarejo P.: 1991. Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. *Mycological Research*. 95. 1375–1381.
165. Maheshwari R.–Hildebrandt A. C.: 1967. Directional Growth of the Urediospore Germ Tubes and Stomatal Penetration. *Nature*. 214. 1145–1146.
166. Maresi G.–Luchi N.–Pinzani P.–Pazzagli M.–Capretti P.: 2007. Detection of *Diplodia pinea* in asymptomatic pine shoots and its relation to the normalized isolation index. *Forest Pathology*. 37. 272–280.
167. Marsberg A.–Kemler M.–Jami F.–Nagel J. H.–Postma-Smidt A.–Naidoo S.–Wingfield M. J.–Crous P. W.–Spatafora J. W.–Hesse C.–Robbertse B.–Slippers B.:

2016. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology*. 18. 477–488.
168. Martínez-Medina A.–Alguacil M. D. M.–Pascual J.A.–Van Wees S. C. M.: 2014. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *Journal of Chemical Ecology*. 40. 804–815.
 169. McKinney H. H.: 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*. 26. 195–218.
 170. Mendgen K.–Deising H.: 1993. Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*. 124. 193-213.
 171. Mendgen K.–Hahn M.: 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*. 7. 352–356.
 172. Mendgen K.–Hahn M.–Deising H.: 1996. Mechanisms and morphogenesis of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 34. 367-386.
 173. Meng L.–Yu C.–Wang C.–Li G.: 2018. First Report of *Diaporthe amygdali* Causing walnut twig canker in Shandong Province of China. *Plant Disease*. 102. 1859.
 174. Mengiste T.: 2012. Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology*. 50. 267–294.
 175. Michailides T. J.: 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology*. 81. 566-573.
 176. Michailides T. J.–Chen S. F.–Coates B.–Morgan D.–Puckett R.–Hasey J.–Anderson K.–Buchner R.–DeBuse C.–Fichtner E.–Bentley W.: 2012. Managing anthracnose blight and *Botryosphaeria* and *Phomopsis* cankers of walnut. Part1: *Botryosphaeria* and *Phomopsis* of walnut Walnut Research Reports. California Walnut Board. Folson. 367-388.
 177. Michailides T. J.–Hasey J.: 2010. *Botryosphaeria* and *Phomopsis* cankers of walnuts in California. Walnut Husk Fly Field Meeting. Cooperative Extension. University of California.
 178. Michailides T. J.–Inderbitzin P.–Connell J. H.–Luo Y. G.–Morgan D. P.–Puckett R. D.: 2018. Understanding band canker of almond caused by *Botryosphaeriaceae*

- fungi and attempts to control the disease in California. *Acta Horticulturae*. 1219. 303-310
179. Michailides T. J.–Morgan D. P.: 2004. Panicle and shoot blight of pistachio: A major threat to the California pistachio industry. *APSnet Features*. Online. doi: 10.1094/APSnetFeature-2004-0104
 180. Michailides T. J.–Morgan D. P.–Felts D.: 2000. Detection and significance of symptomless latent infection of *Monilinia fructicola* in California stone fruits. *Phytopathology* 90. 53.
 181. Michailides T. J.–Morgan D. P.–Felts D.–Hasey J.–Puckett R. D.–Luo Y.–Nouri M. T.–Luna M.–Anderson K.–Buchener R.–Fichtner E.–Coates W.: 2014. Managing *Botryosphaeria/Phomopsis* canker and blight and anthracnose blight of walnut in California. Walnut Research Reports. California Walnut Board. Folsom. 299-317.
 182. Michailides T. J.–Morgan D. P.–Luo Y.: 2010. Epidemiological Assessments and Postharvest Disease Incidence. *Postharvest Pathology*. 2. 69-88.
 183. Milholland R. D.: 1972. Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stems. *Phytopathology*. 62. 654-660.
 184. Mohácsy M.–Porpáczy A.: 1951. Dió, mandula, mogyoró, gesztenye. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
 185. Mónus B.: 2002. A dió integrált biotermesztésének kézikönyve. Szaktudás Kiadóház. Budapest.
 186. Moral J.–Morgan D.–Trapero A.–Michailides T.J.: 2019. Ecology and epidemiology of diseases of nut crops and olives diseases caused by *Botryosphaeriaceae* fungi in California and Spain. *Plant Disease*. 103. 1809–1827.
 187. Morgan D. P.–Driever G. F.–Felts D.–Krueger W. H.–Michailides T. J.: 2009. Evaluation of two disease-warning systems for *Botryosphaeria* panicle and shoot blight of California pistachio and efficient control based on early-season sprays. *Plant Disease*. 93. 1181.
 188. Mostert L.–Crous P. W.–Kang J. C.–Phillips A. J. L.: 2001. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia*. 93. 146–167.
 189. Murali T. S.–Suryanarayanan T. S.–Geeta R.: 2006. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. *Canadian Journal of Microbiology*. 52. 673-680.

190. Nébih, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal.:
<https://novenyvedoszer.nebih.gov.hu/Engedelykereso/Kereso> (Letöltve: 2023. 12. 06.)
191. Nicaise V.–Roux M.–Zipfel C.: 2009. Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm. *Plant Physiology*. 150. 1638–1647.
192. Nicholas K. B.–Nicholas H. B.–Deerfield D. W.: 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *Embnnet News*. 4. 1–4.
193. Nickel J. L.–Wong T. T.: 1966. Control of the walnut husk fly, *Rhagoletis completa* Cresson, with systemic insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 59. 1079–1082.
194. Nitschke T.: 1870. *Pyrenomyces germanici*. Verlag von Eduard Trewendt, Breslau. 320.
195. Oliver R. P.–Solomon P. S.: 2010. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Current Opinion in Plant Biology*. 13. 415–419.
196. Palmer M. A.–McRoberts R. E.–Nicholls T. H.: 1988. Sources of inoculum of *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries. *Phytopathology*. 78. 831–835.
197. Palocsay R. –Veress I. –Antal D. –Mózes P. –Keszi-Harmath E.: 1957. Héjasok és bogyósgyümölcsűek termesztése és nemesítése. Mezőgazdasági és Erdészeti Állami Könyvkiadó. Bukarest.
198. Pandey D. K.–Tripathi N. N.–Tripathi R. D.–Dixit S. N.: 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 89. 344–349.
199. Parker, K. C.–Sutton T. B.: 1993. Susceptibility of apple fruit to *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation. *Plant Disease*. 77. 385–389.
200. Pasche J. S.–Wharam C. M.–Gudmestad N. C.: 2004. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* to QoI fungicides. *Plant Disease*. 88. 181–187.
201. Pavlic, D.–Slippers, B.–Coutinho, T. A.–Gryzenhout, M.–Wingfield, M. J.: 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology*. 50. 313–322.
202. Paź-Dyderska S.–Jagodziński A. M.–Dyderski M. K.: 2021. Possible changes in spatial distribution of walnut (*Juglans regia* L.) in Europe under warming climate. *Regional Environmental Change*. 21. 18.

203. *Pereira J. L.–Mapother H. R.–Cooke B. K.–Grifths E.*: 1973. Redistribution of fungicides in coffee trees. *Experimental Agriculture*. 9. 209–218.
204. *Perez C. A.–Wingfield M. J.–Slippers B.–Altier N. A.–Blanchette R. A.*: 2010. Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Diversity*. 17. 53–69.
205. *Pérez-Rodríguez P.–Paradelo Pérez M.–Soto-Gómez D.–Fernandez-Calvino D.–López Periago J. E.*: 2015. Modeling losses of copper-based fungicide foliar sprays in wash-of under simulated rain. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 12. 661–672.
206. *Petesné H. A.*: 2008. Hogyan hajtsuk végre a növényvédelmi munkákat a legkörülmekintőbb módon. Nemzeti Szakképzési és Felnőttképzési Intézet. Budapest.
207. *Pezet R.–Viret O.–Perret C.–Tabacchi R.*: 2003. Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould. *Journal of Phytopathology*. 151. 208–14.
208. *Phillips A. J. L.–Alves A.–Abdollahzadeh J.–Slippers B.–Wingfield M. J. Groenewald J. Z.–Crous P. W.*: 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76. 51–167.
209. *Phillips A. J. L.–Alves A.–Correia A.–Luque J.*: 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*. 97. 513–529.
210. *Phillips A. J. L.–Crous, P. W.–Alves A.*: 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusa*. *Fungal Diversity*. 25. 141–155.
211. *Porpáczy A.*: 1962. A korszerű gyümölcstermesztés elméleti kérdései. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
212. *Radócz L.*: 2002. A héjasok növényvédelme. Szaktudás Kiadó Ház. Budapest.
213. *Radócz L.*: 2010. Korszerű növényvédelem I. (Növényvédelmi módszerek, prognosztika, abiotikus károsítók). Nagyvárad Eötvös Kiadója. Debrecen-Szalárd.
214. *Rapaics R.*: 1940. A magyar gyümölcs. Királyi Magyar Természettudományi Társulat, Budapest.

215. Rehner S. A.–Uecker F. A.: 1994. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany*. 72. 1666–1674.
216. Reiter R. J.–Manchester L. C.–Dun-Xian Tan M. D.: 2005. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*. 21. 920-924.
217. Rossi V.–Caffi T.–Salinari F.: 2012. Helping farmers face the increasing complexity of decisionmaking for crop protection. *Phytopathologia Mediterranea*. 51. 457–479.
218. Rouskas D.–Zakynthinos G.: 2001. Preliminary evaluation of seventy walnut (*Juglans regia* L.) seedlings selections in Greece. *Acta Horticulturae*. 544. 61-72.
219. Ruggeri S. - Cappelloni L. - Gambelli S. - Carnovale E.: 1998. Chemical composition and nutritive value of nuts grown in Italy. *Italian Journal of Food Science*. 10. 243-252.
220. Rundberget T–Wilkins A. L.: 2002. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 964. 189-197.
221. Russell P. E.: 2005. A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science*. 143. 11–25.
222. Saijo Y.–Loo E. P.: 2020. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist*. 225. 87-104.
223. Sánchez M. E.–Venegas J.–Romero M. A.–Phillips A. J. L.–Trapero A.: 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease*. 87. 1515-1521.
224. Santos J. M.–Correia V. G.–Phillips A. J. L.: 2010. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*. 114. 255–270.
225. Santos J. M.–Vrandečić K.–Cosić J.–Duvnjak T.–Phillips A. J.: 2011. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia*. 27. 9-19.
226. Santos J.–Phillips A.: 2009. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity*. 34. 111–125.

227. Savage G. P.–Dutta P. C.–McNeil D. L.: 1999: Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76. 1059-1063.
228. Schardl C. L.–An Z.: 1993. Molecular biology and genetics of protective fungal endophytes of grasses. *Genetic Engineering*. 15. 191-212
229. Schoch C.–Shoemaker R. A.–Seifert K. A.–Hambleton S.–Spatafora J. W.–Crous P. W.: 2006. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. *Mycologia*. 98. 1041-1052.
230. Schoeneweiss D. F.: 1981. The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease*. 65. 308-314.
231. Sebastianes F. L.–Lacava P. T.–Fávaro L. C.–Rodrigues M. B.–Araújo W. L.–Azevedo J. L. - Pizzirani-Kleiner A. A.: 2012. Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, an endophytic fungus found in mangrove forests, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Genetics*. 58. 21-33.
232. Selosse M. A.–Baudoin E.–Vandenkoornhuyse P.: 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*. 327. 639–648.
233. Sessa L.–Abreo E.–Bettucci L.–Lupo S.: 2017. Diversity and virulence of *Diaporthe* species associated with wood disease symptoms in deciduous fruit trees in Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea*. 56. 431–444.
234. Shay J. R.–Sitterly W. R.: 1954. *Botryosphaeria* canker of apple. *Phytopathology*. 44. 505.
235. Sibbet G. S.–Coates W. W.–Edstrom J.: 1998. Orchard Planning, Design, and Planting. [In: Ramos D. E. (szerk.) Walnut production manual.]. University of California, USA. 90-98.
236. Silva-Valderrama I.–Toapanta D.–Miccono M. L. A.–Lolas M.–Díaz G. A.–Cantu D.–Castro A.: 2021. Biocontrol Potential of Grapevine Endophytic and Rhizospheric Fungi Against Trunk Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 11. 614620.
237. Slippers B.–Crous P. W.–Denman S.–Coutinho T. A.–Wingfield B. D.–Wingfield M. J.: 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*. 96. 83-101.

238. Smit W. A.–Viljoen C. D.–Wingfield B. D.–Wingfield M. J.–Calitz F. J.: 1996. A new canker disease of apple, pear, and plum rootstocks caused by *Diaporthe ambigua* in South Africa. *Plant Disease*. 80. 1331–1335.
239. Smith H.–Crous P. W.–Wingfield M. J.–Coutinho T. A.–B.D. Wingfield B. D.: 2001. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on Eucalyptus in South Africa. *Mycologia*. 93. 277–285.
240. Smith H.–Wingfield M. J.–Petrini O.: 1996a. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Forest Ecology and Management*. 89. 189–195.
241. Smith H.–Wingfield M. J.–Crous P. W.–Coutinho T. A.: 1996b. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany*. 62. 86–88.
242. Sohrabi, M.–Mohammadi, H.–León, M.–Armengol, J.–Banihashemi Z.: 2020. Fungal pathogens associated with branch and trunk cankers of nut crops in Iran. *European Journal of Plant Pathology*. 157. 327–351.
243. Solar A.: 1990. Phenological and pomological characteristics of walnut cultivars in northeastern Slovenia. *Acta Horticulturae*. 284. 167–174.
244. Spellberg B.–Guidos R.–Gilbert D. N.–Bradley J. S.–Boucher H. W.–Scheld W. M.–Bartlett J. G.–Edwards J. E.: 2008. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 46. 155–164.
245. Stanosz G. R.–Blodgett J. T.–Smith D. R.–Kruge E. L.: 2001. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytologist*. 149. 531–538.
246. Stanosz G. R.–Smith D. R.–Albers J. S.: 2005. Surveys for asymptomatic persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in stems of red pine seedlings from seven Great Lakes region nurseries. *Forest Pathology*. 35. 233–244.
247. Stepniewska Z.–Kuzniar A.: 2013. Endophytic microorganisms-promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97. 9589–9596.
248. Summerell A. B.–Salleh B.–Leslie J. F.: 2003. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease*. 87. 2. 117–128.
249. Sutton T. B.: 1991. White Rot. [In: Jones A. L.–Aldwinckle H. (eds). *Compendium of Apple and Pear Diseases*.] American Phytopathological Society, St. Paul. 16–18.

250. Swart L.–Crous P. W.–Petrini O.–Taylor J. E.: 2000. Fungal endophytes of *proteaceae*, with particular emphasis on *Botryosphaeria proteae*. *Mycoscience*. 41. 123-127.
251. Szabó T.: 2004. Az integrált növényvédelem. Mezőgazda Kiadó. Budapest.
252. Szekeres A.–Leitgeb B.–Kredics L.–Manczinger L.–Vágvolgyi C.: 2006. A novel, image analysis-based method for the evaluation of *in vitro* antagonism. *The Journal of Microbiological Methods*. 65. 619–622.
253. Szentiványi P.: 1976. Dió. [In: Szentiványi P.–Pejovics B.–Horn E. (szerk.) Dió, Mandula, Mogoró, Gesztenye.]. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 9-83.
254. Szentiványi P.: 1978 A gesztenye- és diótermesztés Délnyugat-Dunántúlon, a fital gesztenye- és dióültetvények agrotechnikája. [In: Vig P. (szerk.) Újabb kutatási eredmények a gyümölcsstermesztésben.]. Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató Intézet, Budapest
255. Szentiványi P.: 1980. A héjas gyümölcsstermesztés fajtaellátásának helyzete. *Agrártudományi Közlemények*. 39. 425–433.
256. Szentiványi P.: 2001. Dió [In Brózik S.–Kállay T.-né (szerk.) Csonthéjas és héjas gyümölcsfajták.] Mezőgazda Kiadó. Budapest. 108-113.
257. Szentiványi P.–Kállay, T.-né.: 2006. Dió. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 62-72.
258. Taguiam J. D. W.–Evallo E. S.–Bengoa J. C.–Maghirang R. G.–Balendres M. A. O.: 2020. Pathogenicity of *Epicoccum sorghinum* to dragon fruits (*Hylocereus* species) and *in vitro* evaluation of chemicals with antifungal activity. *Journal of Phytopathology*. 168. 303–310.
259. Talbot N. J.: 2003. On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*. 57. 177–202.
260. Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9. 678-687.
261. Tang W.–Ding Z.–Zhou Z. Q.–Wang, Y. Z.–Gou, L. Y.: 2011. Phylogenetic and Pathogenic Analyses Show That the Causal Agent of Apple Ring Rot in China Is *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*. 96. 486-496.
262. Tao H.–Wang, H. –Huang S. X.–Zhang Y.–Zhang Z. H.–Liu W.–Shi N. X.–Zhu F.–Ji Z. L.–Chen X. R. 2020: Identification and characterization of *Diaporthe eres* causing leaf blight disease on the medicinal herb *Polygonatum sibiricum*. *Journal of General Plant Pathology*. 86. 468–476.

263. Tapsell L.–Gillen L. J.–Patch C. S.–Batterham M.–Owen A.–Baré M.–Kennedy M.: 2004. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 27. 2777-2783.
264. Taylor J. W.–Jacobson D. J.–Kroken S.–Kasuga T.–Geiser D. M.–Hibbett D. S.–Fisher M. C.: 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31. 21-32.
265. Taylor T. N.–Remy W.–Hass H.: 1992. Parasitism in a 400-million-year-old green alga. *Nature*. 357. 493-494.
266. Thomidis T.–Michailides T. J.: 2009. Studies on *Diaporthe eres* as a New Pathogen of Peach Trees in Greece. *Plant Disease*. 93. 1293–1297.
267. Thompson S. M.–Tan Y. P.–Young A. J.–Neate S. M.–Aitken E. A.–Shivas R. G.: 2011. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. *Persoonia*. 27. 80-89.
268. Thurm E. A.–Hernandez L.–Baltensweiler A.–Ayan S.–Rasztovits E.–Bielak K.–Zlatanov T. M.–Hladnik D.–Balic B.–Freudenschuss A.–Büchsenmeister R.–Falk W.: 2018. Alternative tree species under climate warming in managed European forests. *Forest Ecology and Management*. 430. 485–497.
269. Tomás D. F.: 1990. Selection of Spanish Walnuts (*Juglans regia* L.) *Acta Horticulturae*. 284. 111-124.
270. Turóczy Gy.: 1999. Biológiai védekezés növényi kórokozókkal szemben. [In: Polgár A. L. (szerk.) A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon.]. OMBF. Budapest. 100-151.
271. Udayanga D.–Castlebury L. A.–Rossman A. Y.–Chukeatirote E.–Hyde K. D.: 2014. Insights into the genus *Diaporthe*: Phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Diversity*. 67. 203–229.
272. Udayanga D.–Liu, X. Z.–McKenzie E. H. C.–Chukeatirote E.–Bahkali A. H. A.–Hyde K. D.: 2011. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*. 50. 189–225.
273. Udayanga D.–Xingzhong L.–Crous P. W.–McKenzie E. H. C.–Chukeatirote E.–Hyde K. D.: 2012. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity*. 56. 157–171.
274. Uecker F. A.: 1988. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycological Memoirs*. 13. 1–231.

275. Ughini V.–Roversi A.: 1990. Preliminary investigation on leaf mineral composition of 6 walnut varieties. *Acta Horticulturae*. 284. 267–272.
276. Úrbez-Torres J. R.–Boulé J.–O’Gorman D. T.: 2016. First Report of *Diplodia seriata* and *D. mutila* Causing Apple Dieback in British Columbia. *Plant Disease*. 100. .
277. Vajna L.–Schwarczinger I.: 1998. Fungi causing branch dieback of giant sequoia (*Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz) in Hungary. *Növényvédelem*. 34. 133–136.
278. Valent B.: 1990. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*. 80. 33–36.
279. van Niekerk J. M.–Crous P. W.–Groenewald J. Z. E.–Fourie P. H.–Halleen F.: 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*. 96. 781–798.
280. van Rensburg J. C.–Lamprecht S. C.–Groenewald J. Z.–Castlebury L. A.–Crous P. W.: 2006. Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Studies in Mycology*. 55. 65–74.
281. Varjas V.–Lakatos T.–Tóth T.–Kovács C.: 2021. First Report of *Colletotrichum godetiae* Causing Anthracnose and Twig Blight on Persian Walnut in Hungary. *Plant Disease*. 105. 702.
282. Vasić M.–Duduk N.–Vico I.–Ivanović M. S.: 2013. First Report of *Botryosphaeria dothidea* Causing White Rot of Apple Fruit in Serbia. *Plant Disease*. 97. 1659–1659.
283. Vavilov N.: 1928. Geographische Genzentren unserer Kulturpflanzen. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*. 1. 342–369
284. Verheggen F.–Verhaeghe A.–Giordanengo P.–Tassus X–Escobar-Gutiérrez A.: 2017. Walnut husk fly, *Rhagoletis completa* (Diptera: Tephritidae), invades Europe: invasion potential and control strategies. *Applied Entomology and Zoology*. 52. 1–7.
285. Vicent A.–Armengol J.–Garcia-Jimenez J.: 2007. Rain fastness and persistence of fungicides for control of *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Disease*. 91. 393–399.
286. Visagie C. M.–Houbraken J.–Frisvad J. C.–Hong S. B.–Klaassen C. H. W.–Perrone G.–Seifert K. A.–Varga J.–Yaguchi T.–Samson R. A.: 2014 Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. 78. 343–371.

287. Voigt E.–Tóth M.: 2013. Spread of the walnut husk fly in Hungary by spring of 2013. *Növényvédelem*. 49. 341–346.
288. von Arx J. A.: 1987. Plant pathogenic fungi. [In: von Arx J. A. (ed.) *Behefte zur Nova Hedwigia*.]. 87. 1-288.
289. Vrandečić K.–Jurković D.–Ćosić J.–Poštić J.–Riccioni L.: 2011. First Report of Cane Blight on Blackberry Caused by *Diaporthe eres* in Croatia. *Plant Disease*. 95. 612.
290. Vučković N.–Vico I.–Duduk B.–Duduk N.: 2022. Diversity of Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* Species Associated with Postharvest Apple Fruit Decay in Serbia. *Phytopathology*. 112. 929-943.
291. Walas Ł.–Sobierajska K.–Ok T.–Dönmez A. A.–Kanoğlu S. S.–Dagher-Kharrat M. B.–Douaihy B.–Romo, A.–Stephan J.–Jasińska A. K.–Boratyński A.: 2019. Past, present, and future geographic range of an oro-Mediterranean Tertiary relict: the *Juniperus drupacea* case study. *Regional Environmental Change*. 19. 1507–1520.
292. Webber J.–Gibbs J. N.: 1984. Colonization of elm bark by *Phomopsis oblonga*. *Transactions of the British Mycological Society*. 82. 348–352.
293. Wehmeyer L. E.: 1933. The British species of the genus *Diaporthe* Nits. and its segregates. *Transactions of the British Mycological Society*. 17. 237–295.
294. White T. J.–Bruns T.–Lee S.–Taylor J. W.: 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press*. New York. 482.
295. Wolpert T. J.–Dunkle L. D.–Ciuffetti L. M.: 2002. Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annual Review of Phytopathology*. 40. 251–285.
296. Yan Z.–Xiong C.–Liu H.–Singh B. K.: 2022. Sustainable agricultural practices contribute significantly to One Health. *The Journal of Sustainable Agriculture and Environment*. 1. 165-176.
297. Yildiz A.–Benlioglu S.–Benlioglu K.–Korkom Y.: 2022. Occurrence of twig blight and branch dieback of walnut caused by Botryosphaeriaceae species in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 129. 687–693.
298. Yu L.–She X. M.–Lan G. B.–Tang Y. F.–Li Z. G.–Deng M. G.–He Z. F.: 2019. First report of leaf spot caused by *Epicoccum sorghinum* on chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) in China. *Plant Disease*. 103. 2966.

299. Zabiák A.–Kovács C.–Takács F.–Pál K.–Peles F.–Fekete E.–Karaffa L.–Mihály K.–Flippin M.–Sándor E.: 2023: *Diaporthe* and *Diplodia* Species Associated with Walnut (*Juglans regia* L.) in Hungarian Orchards. *Horticulturae*. 9. 205.
300. Zahov T.: 1943. Orechite v Kasanlaskia i Zlotiskija rajoni. Különlenomiat a Boglár Mezőgazdasági Kutató és Kísérleti Intézetek évkönyvéből. Szófia.
301. Zhang A. W.–Ricconi L.–Pedersen W. L.–Kollipara K. P.–Hartman G. L.: 1998. Molecular Identification and Phylogenetic Grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* Isolates from Soybean. *Phytopathology*. 88. 1306-1314.
302. Zhang W.–Groenewald J. Z.–Lombard L.–Schumacher R. K.–Phillips A. J. L.–Crous P.W.: 2021. Evaluating species in Botryosphaeriales. *Persoonia*. 46. 63–115.
303. Zhou T.–Reeleder R. D.: 1989. Application of *Epicoccum purpurascens* spores to control white mold of snap bean. *Plant Disease*. 73. 639–642.
304. Zhu Y.–Chen H.–Fan J.–Wang Y.–Li Y.–Chen J.–Fan J.–Yang S.–Hu L.–Leung H.–Mew T. W.–Teng P. S.–Wang Z.–Mundt C. C.: 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*. 406. 718-722.
305. Zipfel C.: 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*. 35. 345–351.
306. Zuccaro A.–Lahrmann U.–Langen G.: 2014. Broad compatibility in fungal root symbioses. *Current Opinion in Plant Biology*. 20. 135-145.

11. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/442/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Zabiák Andrea
Doktori Iskola: Kerpely Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10069429

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

1. **Zabiák, A.**, Csótó, A., Takács, F., Karaffa, E. M.: A dió terméskárosodásának etiológiája és a védekezés lehetőségei.
Növényvédelem. 84 (5), 193-200, 2023. ISSN: 0133-0829.

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

2. **Zabiák, A.**, Csótó, A., Tóth, B., Takács, F., Pál, K., Karaffa, E. M.: Identification of Botryosphaeria dothidea and Diaporthe eres from Rotted Walnut Fruits and Other Plant Parts in Different Phenological Stages.
Acta Phytopathol. Entomol. Hung. "Accepted by Publisher" (-), 1-20, 2023. ISSN: 0238-1249.
3. **Zabiák, A.**, Károlyi, G. M., Karaffa, E. M.: Investigation of host-specificity of phytopathogenic fungi isolated from woody plants.
Agrártud. Közl. 2020 (1), 155-160, 2020. ISSN: 1587-1282.
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/actaagrar/1/3721>

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

4. **Zabiák, A.**, Kovács, C., Takács, F., Pál, K., Peles, F., Fekete, E., Karaffa, L., Mihály, K., Flippi, M., Karaffa, E. M.: Diaporthe and Diplodia species associated with walnut (Juglans regia L.) in Hungarian orchards.
Horticulturae. 9 (2), 1-15, 2023. EISSN: 2311-7524.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/horticulturae9020205>
IF: 3.1 (2022)

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (3)

5. **Zabiák, A.**, Károlyi, G. M., Karaffa, E. M.: Dióból izolált Botryosphaeriaceae fajok patogenitása az almafa fás szöveteiben.
In: 66. Növényvédelmi Tudományos Napok 2020. Szerk.: Haltrich Attila, Varga Ákos, Magyar Növényvédelmi Társaság, Budapest, 97, 2020.





6. **Zabiák, A.**, Takács, F., Karaffa, E. M.: Diótermések endofiton gombapopulációjának meghatározása.
In: Magyar Táplálkozástudományi Társaság XLIV. Vándorgyűlése programja és az előadások összefoglalói. Szerk.: Antal Emese, Biró Lajos, Gelencsér Éva, Lugasi Andrea, Rurik Imre, Magyar Táplálkozástudományi Társaság, Budapest, 57, 2019. ISBN: 9786155606090
7. **Zabiák, A.**, Karaffa, E. M.: Diótermések endofiton gombapopulációjának vizsgálata és a fertőzöttség mértékének meghatározása.
In: 65. Növényvédelmi Tudományos Napok: Absztrakt és poszter kötet. Szerk.: Haltrich Attila, Varga Ákos, Magyar Növényvédelmi Társaság, Budapest, 66, 2019.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (2)

8. **Zabiák, A.**, Takács, F., Karaffa, E. M.: Fungal population of rotted walnuts and their antifungal sensitivity.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. Suppl., 209, 2019. ISSN: 1217-8950.
9. **Zabiák, A.**, Takács, F., Karaffa, E. M.: Walnut blight causing by endophytic fungi during different phenological phases of the host.
J. Plant Pathol. 101, 847, 2019. ISSN: 1125-4653.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s42161-019-00394-4>

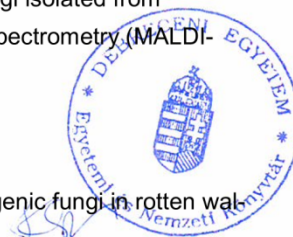
További közlemények

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (1)

10. **Zabiák, A.**, Kovács, C., Karaffa, E. M.: Szőlő tökeelhalás tüneteit mutató növényekből izolált endofita gombák a Szekszárdi Borvidék fiatal ültetvényében.
In: 64. Növényvédelmi Tudományos Napok: Absztrakt és poszter kötet. Szerk.: Haltrich Attila, Varga Ákos, Magyar Növényvédelmi Társaság, Budapest, 66, 2018.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (3)

11. **Zabiák, A.**, Kovács, C., Karaffa, E. M.: Characterization of endophytic fungi isolated from grapevines by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).
J. Plant Pathol. 100 (3), 652, 2018. ISSN: 1125-4653.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s42161-018-0130-y>
12. Kovács, C., Takács, F., **Zabiák, A.**, Karaffa, E. M.: Identification of pathogenic fungi in rotten walnut fruits from different plantations in Hungary.
J. Plant Pathol. 100 (3), 631, 2018. ISSN: 1125-4653.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s42161-018-0130-y>





13. **Zabiák, A.**, Karaffa, E. M., Kovács, C.: Isolation and identification of fungi from vine rootstock.
In: The International Conference for Students - Student in Bucovina Abstract book, Stefan cel Mare University of Suceava, Romania, Bucovina, 30, 2016.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,1

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,1**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.09.28.



12. NYILATKOZATOK

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2024.....

.....

a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Zabiák Andrea doktorjelölt 2018-2024 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2024.....

.....

a témavezető aláírása

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Karaffa Erzsébet Mónika egyetemi tanárnak, aki szakmai és emberi támogatást nyújtott, és építő jellegű kritikákat fogalmazott meg az elmúlt években számomra, ezzel segítve munkámat. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Takács Ferencnek a vizsgálataimhoz szükséges minták begyűjtésében és a területek kutatásomba történő bevonásában nyújtott segítségért.

Köszönöm Szakadát Gyula Zsolt, tanszéki mérnöknek a laboratóriumi munkámban nyújtott segítségét. Csótó András, tanszéki mérnöknek is külön köszönöm az eredményeim statisztikai elemzésében nyújtott segítségét. Szeretném megköszönni férjemnek és a családomnak a támogatást, hogy mellettem álltak a Ph.D. tanulmányaim alatt.