

DEBRECENI EGYETEM

HANKÓCZY JENŐ DOKTORI ISKOLA

Témavezető:

Dr. Radócz László
egyetemi docens

**A KÁRPÁT-MEDENCEI *CRYPHONECTRIA PARASITICA*
(MURRILL.) BARR SZUBPOPULÁCIÓK MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA**

Készítette:

Görcsös Gábor
doktorjelölt

Debrecen
2015

**A KÁRPÁT-MEDENCEI CRYPHONECTRIA PARASITICA
(MURRILL.) BARR SZUBPOPULÁCIÓK MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az agrártudományok tudományágban

Írta: Görcsös Gábor okleveles agrármérnök

Készült a Debreceni Egyetem Hankóczy Jenő doktori iskolája
(Fenntartható növénytermesztés doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Radócz László

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:	Prof. dr. Pepó Péter	DS
Tagok:	Prof. dr. Csép Miklós	CSc
	Dr. Kövics György	CSc

A doktori szigorlat időpontja: 2014. február 14.

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat	Aláírás
Prof. dr. Holb Imre	DS	
Dr. Juhasová Gabriela	CSc	

A bírálóbizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
elnök			
tagjai:			
titkár:			

Az értekezés védésének időpontja: 2015.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1. A kutatási téma jelentősége, aktualitása	3
1.2. A kutatás célkitűzése	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A kórokozó jellemzése	8
2.1.2. A <i>Cryphonectria parasitica</i> felfedezése, nevezéktana.....	8
2.1.3. A <i>Cryphonectria parasitica</i> morfológiai jellemzése.....	9
2.1.4. A kórokozó életciklusa.....	11
2.1.5. A kórfolyamat jellemzése.....	14
2.1.6. A kórokozó megjelenése és elterjedése Európában	18
2.1.7. A kórokozó gazdanövényei	21
2.1.8. A kórokozó elleni védekezés alapelvei, módszerei.....	24
2.1.9. A hipovirulencia jelensége	26
2.1.10. A vegetatív kompatibilitás	29
2.1.11. Európai <i>Cryphonectria parasitica</i> populációk VC csoportokba sorolása.....	32
2.1.12. Hipovirulens törzsek alkalmazása a kórokozó elleni védekezésben.....	34
2.2. Filogenetikai vizsgálatok jellemzése	37
2.2.1. Transzlációs elongációs faktor alpha fehérjét kódoló gén (<i>tef1</i>).....	37
2.2.2. Az ITS-régió a fonalas gombákban.....	39
2.2.3. Mikroszatellitek használata a filogenetikai analízisekben	41
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	43
3.1. A vizsgálati területek bemutatása	43
3.2. A kéregminták begyűjtése	45
3.3. A kéregminták laboratóriumi feldolgozása	46
3.4. A VCG vizsgálatok kivitelezése.....	48
3.5. Polimeráz-lánreakción (PCR) alapuló vizsgálat az ITS és <i>tef1</i> markerek esetében	50
3.6. A mikroszatellitek amplifikációjának részletei	52
3.7. A filogenetikai elemzésekhez felhasznált programok	54
3.8. Maximum Parsimony analízis	56

3.9. Bootstrap.....	57
3.10. Mikroszatellit analízis.....	58
4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE.....	59
4.1. Vegetatív kompatibilitási tesztek eredménye	59
4.1.1. Magyarországi minták VC tesztjeinek eredménye.....	60
4.1.2. Szlovákiai minták VC tesztjeinek eredménye.....	62
4.1.3. Ukrajnai (kárpátaljai) minták VC tesztjeinek eredménye	64
4.1.4. Romániai minták VC tesztjeinek eredménye	66
4.1.5. Macedóniai minták VC tesztjeinek eredménye.....	68
4.1.6. Görögországi minták VC tesztjeinek eredménye.....	69
4.1.7. Bulgáriai minták VC tesztjeinek eredménye.....	70
4.1.8. Portugáliai minták VC tesztjeinek eredménye	71
4.2. A molekuláris biológiai vizsgálatok eredménye	72
4.2.1. A <i>tefl</i> fragmentumok elemzése által kapott eredmények	72
4.2.2. A ITS fragmentumok elemzése által kapott eredmények	77
4.2.3. A mikroszatellit vizsgálatokba bevont minták csoportosítása	84
4.2.4. A mikroszatellit eredmények által becsült genetikai diverzitás	85
4.2.5. Az F-statisztika alapján kapott eredmények értékelése.....	87
4.2.6. Nei-féle genetikai azonosság és genetikai távolság	89
4.2.7. BAPS analízis.....	92
4.3. A kutatási munkához kapcsolódó egyéb eredmények	94
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	97
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	101
7. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK	103
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	104
9. SUMMARY	106
10. FELHASZNÁLT IRODALOM JEGYZÉKE	108
11. MELLÉKLETEK	120
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	148
13. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	149
14. NYILATKOZATOK.....	152

1. BEVEZETÉS

1.1. A kutatási téma jelentősége, aktualitása

Magyarország területének közel egyötödét, 1, 933 millió hektárt borított erdő a 2012-es évben, 160 ezerrel többet, mint az ezredfordulón. 2000 óta az intenzív erdőtelepítések és fásítások nyomán évente megközelítőleg 14 ezer hektárral nőtt az erdőterület nagysága, ebből 2 ezer hektár a pótlás, és átlagban 26 ezer hektáron végeztek erdőfelújítást (KAPRONCZAI et al., 2012).

KERESZTESI (1971) szerint az erdőterületek elhelyezkedésére a nagyfokú koncentrálttság jellemző, nagy kiterjedésű erdős területek találhatók Észak-Magyarország, illetve a Dél-Dunántúl hegyes-dombos vidékein, míg az alföldi régiók kevésbé felelnek meg az erdők ökológiai igényeinek. Az évről évre növekvő erdőterület ellenére az erdősültség 20,5%-os aránya azonban jelentősen elmarad az Európai Unió egészére jellemző 36%-os átlagtól.

A magyar erdők egészségi állapotára elsősorban az időjárási viszonyok (aszály, fagy, jégverés, szél) és egyes biotikus ágensek (növénypatogén gombák, rovarkártevők) vannak hatással, de nem elhanyagolható a vadállomány által előidézett károk nagysága sem. Erdeink általános egészségi állapota a jelentkező vadkárok ellenére is jónak mondható, negatív tendencia nem figyelhető meg. Az ezredforduló óta némileg nőtt a kármentes területek aránya, ugyanakkor a gyengén, illetve a közepesen károsodottaké csökkent, amely egyértelműen az állapot javulását vetíti előre (KAPRONCZAI et al., 2012).

A héjasok gyűjtőnéven emlegetett gazdasági növényeink csoportjába a dió, a gesztenye, a mandula és a mogyoró tartozik, melyeknek ökológiai igényeik, botanikai jellemzőik és termesztési sajátosságai tekintetében is lényeges eltérést mutatnak. A héjasok gyűjtőnév a termesztést tekintve gyakorlatias jellegű, mivel mint gyümölcstermő növények, mindig terméseik azonos részét, a magbelet hasznosítjuk (RADÓCZ, 2002).

Napjainkban a világ vezető gesztenyetermesztő országai közül ki kell emelni Kínát, Dél-Koreát, Törökországot, Olaszországot, Japánt Spanyolországot, Portugáliát, Franciaországot és Görögországot. A világ gesztenyetermése 2010-ben elérte a 2 millió tonnát. Ebből a mennyiségből önmagában Kína 1,7 millió tonnát állít elő, így messze a legnagyobb termesztő. Hazánk az elmúlt években megközelítőleg 256 tonna gesztenyét termelt (BOUNOUS és MARINONI, 2010).

A héjasok között néhány, többes hasznosítású fajt is találunk (pl. dió, gesztenye), amelyek erdészeti, faipari, vidékfejlesztési szempontból is jelentősek lehetnek. Fontos szerepe van ezen fajoknak a talajeróziós folyamatok megakadályozásában, a tájlesztikában és a vidék népességmegtartásának erősítésében is (RADÓCZ, 2002).

A gesztenye termelésének stagnálását a hagyományosan nagy gesztenyetermelőnek számító mediterrán országok: Olaszország, Franciaország, Portugália, Görögország területeinek drasztikus csökkenése okozta. Ez a visszaesés az európai térségben a gesztenye kéregrák (*Cryphonectria parasitica*) kontinentális méretű járványával és katasztrofális kártételével magyarázható (DIAMANDIS és PERLEROU, 2001).

SOÓ (1962) szerint az európai szelídgesztenye (*Castanea sativa*), kontinensünk jelentős fafajai közé tartozik. A Kárpát-medencében is őshonos fafaj Magyarországon számos erdőtársulásban, a Mecsekben, a Zalai-dombságban, a Somogyi-dombságban, valamint az Alpokalján található jelentősebb populációban, de fellelhető a Dunakanyar körzetében és az Északi-középhegység egyes részein is. Határainkon kívül a Kárpát-medencében termesztik, a szlovákiai Felvidék több körzetében, a Kárpátalja hegyoldalain, Észak-Erdélyben a Kőhát- és Gutin-hegység Nagybánya környéki dombok déli lankáin és völgyeiben, valamint a határ menti horvát, szlovén- és osztrák területeken is.

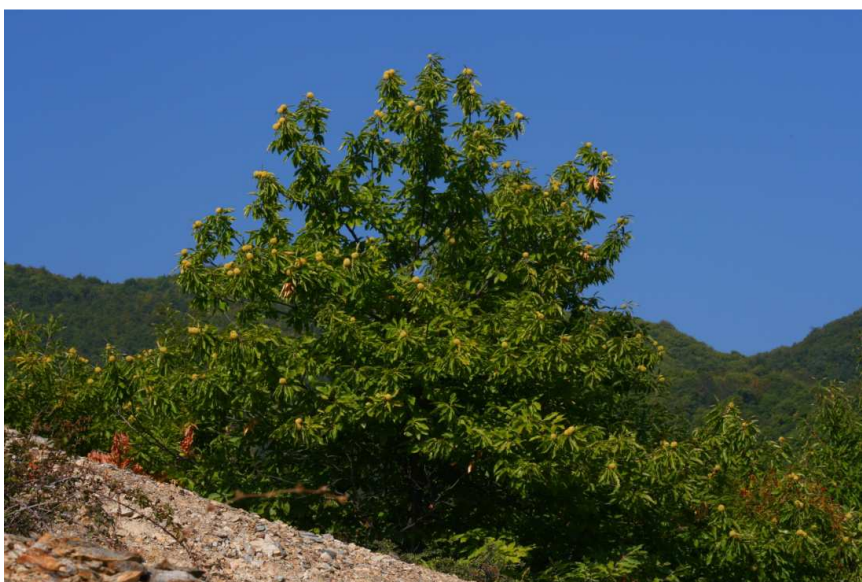
Magyarországon intenzív gesztenyetermesztés nem alakult ki, csak a termőtájakon megtalálható ősi szórvány, liget-legelő és egyéb elegyes erdőkben levő állományok kiegyenlítetlen, gyenge minőségű termésének a betakarítása folyt. A gesztenyetermesztés ilyen formájú művelése természetesen nem lehet gazdaságos, hiszen az állományokban csak ősi gyűjtögető gazdálkodásra jellemző „fejszés” szelekció érvényesült (MOHÁCSI és PORPÁCZY, 1951).

A gesztenyefák többsége (81,3%) szórvány, nem képez önálló állományokat. Ez a korszerűtlen termesztési forma a mezőgazdasági üzemek fejlődésével, a termesztés intenzitásának növelésével fokozott ütemben felszámolásra kerül, az idős gesztenye állományainak erős csökkenése prognosztizálható. Erre enged következtetni a szórvány állományok magasabb (81%), idős, termőkorú aránya. Összefüggő, nagyobb kiterjedésű gesztenyeállományok szinte kizárólag a Dunántúlon helyezkednek el. A termőtájak közül a nyugat-dunántúli bír a legnagyobb jelentőséggel, az ott elhelyezkedő 51%-nyi terület nagyobb részben Zala megyében található. A termelés fejlesztése esetén célszerű az új ültetvények elhelyezésénél a Zala és Somogy megyei termőhelyeket preferálni (SZENTIVÁNYI et al., 1976).

SOÓ (1962) szerint a mediterrán hegyvidéki tájakon az ősi gesztenye (*Castanea sativa*) erdők káliumban gazdag, savanyú talajon a *Castaneion* csoportot alkotják. A szubatlantikus éghajlat lombosai nálunk leginkább a Dunántúlon és az Északi-középhegységben, mint acidofil bükkösök, gyertyános tölgyesek és elegyes tölgyesek jelennek meg, mint klíma vagy lokálklímatis társulások podzolos talajon, agyagpala, homokkő, andezit, gránit hegyeken. Bennük kocsánytalan tölgy és cser uralkodik, belekeveredik a gyertyán, és a Dunántúlon a gesztenye is.

A Bükkfélék (*Fagaceae*) családjába tartozó európai szelídgesztenye (*Castanea sativa*) az egyik legvastagabb törzzsel rendelkező, és a legnagyobb életkört elérő fajok közé tartozik (1. ábra). A mészmentes és káliumban gazdag talajokat kedveli. Egyenes szálú fája könnyen hasad, csaknem füst nélkül ég, bőséges tannin tartalmánál fogva kiválóan ellenáll a korhadásnak. Fontos megemlíteni, hogy kiváló mézélő növény. A gesztenye gyümölcsében nagy mennyiségben találhatóak a táplálkozásbiológiai szempontból értékes anyagok, vitaminok. Hazánkban sütv, főzve, esetleg liszt formájában, valamint édesipari alapanyagként használjuk fel (RADÓCZ, 1995a).

Botanikai és fiziológiai vonatkozásban ÉKES (2003) az alábbi megállapításokat teszi a szelídgesztenyeről: "A növény kérge sokáig sima marad. A gesztenye jellegzetessége, hogy június végén a teljes lombzat kifejlődése után virágzik. Erős, sajátos illatú virágai kiválóan mézélnek."



1. ábra Termő szelídgesztenye fa

Fotó: Görösös Gábor

Termése mintegy 44% keményítőt és megközelítőleg 2,5% olajat tartalmaz, a déli országokban fontos népelelmezési cikknek számít. Közép-Európában elsősorban a cukrászat hasznosítja a termését. Egy-egy középkorú fa átlagosan évi 15-20 kg termést hoz. Viszonylag gyors növekedése következtében a gesztenyések és a gesztenyes tölgyes társulások élőfakészlete nagy. Faipari feldolgozása után bútorok, belsőépítészeti elemek, hordók készíthetők belőle. Tartóssága miatt szívesen alkalmazzák a hajógyártásban, a vízépitésben is (GENCSI és VANCSURA, 1997).

A szelídgesztenye termesztésének egyik legveszedelmesebb ellensége a szelídgesztenye kéregrákosodását előidéző *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr / syn: *Endothia parasitica* (Murr.) Anderson/ gombafaj. E kórokozó, valamint a szelídgesztenye másik fontos betegségét előidéző két jelentős gombafaj a *Phytophthora cambivora* (Petri/Büsm) és a *Phytophthora cinnamomi* (Rands.) az elmúlt száz év folyamán világszerte óriási pusztításokat végzett a szelídgesztenye állományban. Különösen nagy károkat okozott a kéregrákosodást előidéző gomba Észak-Amerikában, valamint Európában. A kórokozó először a XX. század elején vált ismertté az Egyesült Államok keleti részén, majd szinte az egész országban elterjedt. 40 év alatt a teljes amerikai szelídgesztenye (*Castanea dentata*) állományt megfertőzte, és majdnem teljesen ki is pusztította, közel 4 millió hektáron. A kéregrákosodás jelenleg is intenzíven terjed, s ma már az európai szelídgesztenyéjénél is a legjelentősebb kórokozónak számít (ANAGNOSTAKIS, 1987, DUTECH et al., 2012).

RADÓCZ (2002) közlése szerint nem kizárólag a szelídgesztenye fajok a gazdanövényei a *Cryphonectria parasitica* gombának. A kórokozó megfertőzheti a Bükkfélék családjába tartozó más fafajokat is, többek között a tölgyeket és a bükköt is. Ezt igazolja, hogy 1998-ban a betegséget Zengővárkony térségében -Magyarországon először- megtalálták a kocsánytalan tölgy magoncokon is. A tölgyfajok fogékonysága a kórokozóval szemben az eddigi ismereteinek alapján mérsékeltebbnek mondható az európai szelídgesztenyéhez képest.

A *Cryphonectria parasitica* legnagyobb kártételét a *Castanea* nemzetségbe tartozó amerikai szelídgesztenye (*Castanea dentata*) és európai szelídgesztenye (*Castanea sativa*) fajok világméretű pusztításával okozza. Viszont képes a *Fagaceae* családba tartozó más fafajok megbetegítésére is. A család legnépesebb nemzetsége a *Quercus*, azaz a tölgy nemzetség. Az ide tartozó fajok száma meghaladja a 450-et. Jelentős részük szubtrópusi vagy hegyvidékeken él. Erdőgazdaságilag nagyon jelentős Európában, a kontinens erdeinek közel 38% -át adja (KRISTÓ, 1995).

1.2. A kutatás célkitűzése

1. A Debreceni Egyetem Agrártudományi Központ Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karán található Növényvédelmi Intézetben rendelkezésre álló *Cryphonectria parasitica* minták felfrissítése, új vizsgálati területekről származó minták begyűjtése, és a meglévő törzsgyűjtemény fenntartása, bővítése.
2. Az általunk végzett terepi gyűjtésből származó minták VCG tesztjeinek végrehajtása, és a kapott eredmények összehasonlítása más kutatási eredményekkel.
3. A gyűjtésből származó minták molekuláris biológiai vizsgálata ITS és *tefl* molekuláris markerek segítségével, valamint az eredmények összehasonlítása a különböző nemzetközi adatbankokból származó eredményekkel.
4. Összefüggések és kapcsolatok keresése a különböző minták genetikai, illetve földrajzi helyzetéhez kapcsolódóan.
5. Mikroszatellit markerek vizsgálata, illetve alkalmazhatóságuk meghatározása a különböző *Cryphonectria parasitica* szubpopulációk összehasonlító vizsgálataiban.
6. A szakirodalom által feljegyzett adatok, eredmények összehasonlítása a saját kutatásból származó eredményekkel. Az esetleg eltérések, változások okainak feltárása, elemzése.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A kórokozó jellemzése

2.1.2. A *Cryphonectria parasitica* felfedezése, nevezéktana

Az *Endothia* és *Cryphonectria* genuszokba tartozó növénypatogén gombafajok általánosan elterjedtek a Föld trópusi, szubtrópusi valamint mérsékelt égövi régióiban. A *Cryphonectria* nemzetség egyik legfontosabb növénykórokozó faja a *Cryphonectria parasitica* (Murr) Barr /syn: *Endothia parasitica*/ /anamorf: *Endothiella* sp./, az európai szelídgesztenye kéregrákosodásának előidézője (ANAGNOSTAKIS, 1987).

A betegséget először 1904-ben a bronxi állatkert (New York város USA) idős szelídgesztenyefáin észlelte és írta le Herman Merkel, erdész, aki halálos kórokozóként jellemezte a gombát (MERKEL, 1906).

Az észak-amerikai kontinensen intenzíven terjedő járványról Európában a legelsők között tudósított Vadas Jenő, a Magyar Királyi Erdészeti Kísérleti Állomás kiadásában megjelenő Erdészeti Kísérletek című korabeli szaklapban (VADAS, 1908).

A betegség okozóját először 1905-ben Flora W. Patterson, mint egy *Cytospora* nemzetségbe tartozó fajt írta le. Ezt a besorolást és meghatározást változtatta William A. Murrill 1906-ban *Diaportha parasitica* névre. A következő névváltozás Paul J. Anderson nevéhez fűződik, aki 1913-ban mint *Endothia parasitica* írta le a kórokozót (ANDERSON és ANDERSON, 1912). A mai napig használt legitim nevet *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr (anamorf: *Endothiella parasitica*) 1978-ban Margaret E. Barr adta a kórokozónak, miután a peritécium és az aszkospórák jellemzői alapján a *Cryphonectria* génuszba sorolta a fajt (BARR, 1978).

Rendszertani besorolása (KÖVICS, 2000) alapján:

Törzs: Ascomycota (tömlősgombák)

Osztály: Pyrenomycetes (maggombák)

Rend: Diaporthales

Család: Valsaceae

Nemzetség: *Cryphonectria*

2.1.3. A *Cryphonectria parasitica* morfológiai jellemzése

A kórokozó sztrómája jellemzően szétszórt, lapított gömb alakú (2. ábra), először a peridermába süllyed, majd később kiemelkedik abból, valszóid, sárga, vörösesbarna vagy feltűnően narancssárga színű, párhuzamosan rendezett (prozenhimatikus). A sztróma felső részén laza hifaszövedék figyelhető meg, bazális régióiban pedig gyakran előfordul a gazdanövény sejteinek beépülése a gombaszövetek közé. Általános méretei: szélesség 2-3 mm, magasság 1,5-2,5 mm (SHARE et al., 1917).



2. ábra A sztróma mikroszkopikus képe

(Forrás: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/may98.html)

A peritécium rendszerint 10-20-as csoportokban helyezkedik el, formája szabályos gömb, legfeljebb 400 μm széles, színe sötétbarna vagy fekete. A peritécium sajátossága a rendkívül hosszú, elnyúlt, csőrszerű nyaki rész, amely átnyomul a sztromatikus szöveteken, és a felszínen sötét szemölcsben végződik. A megnyúlt nyaki rész maximális hossza: 900 μm , szélessége 200 μm . A nyaki rész belső felületét áttetsző, szőrszerű képletek bélelik. A peritécium külső fala hialin-szubhialin típusú, pszeudoparenhimatikus sejtekből belső felén áttetsző, kissé megnyúlt alakú sejtekből áll (BARR, 1978).

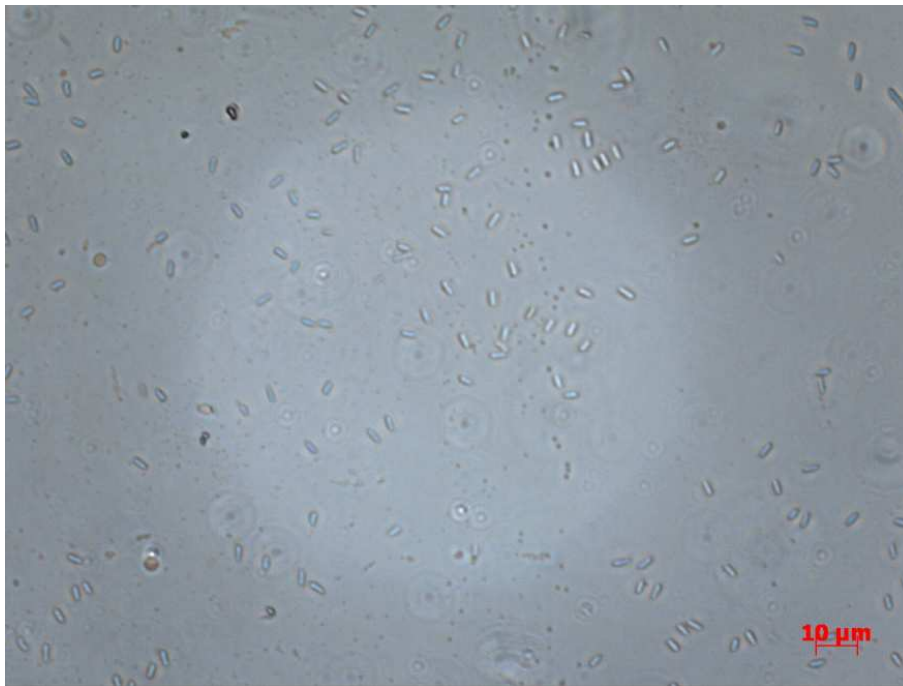
Az aszkuszkok hengeresek, buzogány formájúak, vékony, egyrétegű fallal. Rendszerint 8 db aszkospórával rendelkeznek. A csúcsi részeken keményítőszerű apparátus nem található. A himéniumról lefüződve a központi üregben szabadon találhatók. Átlagos méretük: 32-55 μm x 7-8,5 μm (ROSSMAN et al., 2007).

Az askospórák elliptikus alakúak, szabálytalanul kétsejtűek, áttetsző hialinok, a válaszfalnál csak kevésbé befűződtek. Méretük 7-12 μm x 3-3,5 μm között változik. Rendszerint az askuszok felső részében rendeződnek el (MYBURG et al., 2004; CANNON és KIRK, 2007).

A piknídium pszeudosztomatikus, beágyazott helyzetű, magányosan elkülönülő vagy csoportos lehet. Sárga, sárgásbarna színű, gömb alakú, egy vagy több üregű. Mérete változó, legfeljebb 300 μm széles, egyetlen szájnírással. Belső fala halványbarna, kissé megnyúlt alakú pszeudoparenhimatikus sejtekből áll (GRYZENHOUT et al., 2006).

A konídium tartók csoportosak, hialinok, többsejtűek, rendszerint csupasz felületűek. A konidiogén sejtek duzzadtak, ampullaszerűek, terminális vagy laterális helyzetűek, csúcsi részeiken egy nehezen észlelhető csatornával, illetve gallérral. Átlagosan 60 μm hosszúak és 1,5 μm szélesek (CASTLEBURY et al., 2002).

A konídiumok mérete: 3,5 μm x 1-1,5 μm . A konídiumok hialinok, egysejtűek, ellipszoid (3. ábra), vagy kissé bacillus alakúak (SIVANESAN és HOLLIDAY, 1981).



3. ábra A *Cryphonectria parasitica* konídiumok mikroszkopikus képe

Fotó: Görcsös Gábor

2.1.4. A kórokozó életciklusa

A kórokozó obligát sebsz parazita. A fertőzést követően a lappangási időszak az időjárás alakulásától függően 3-6 hét között változik. A sérülések, sebek felületén kialakuló sztrómákban először piknídiumok képződnek, amelyekből a kacsaringósan kitüremkedő ragadós, nyálkás váladékot a piknokonídiumok nagy tömege alkotja. A ragacsos váladék legfontosabb feladata, hogy a piknokonídiumok megtapadását elősegítse (4. ábra). A megfigyelések szerint a peritéciumok rendszerint sokkal később, általában a következő év tavaszán alakulnak ki, de pontos ciklikusság az ivaros és az ivartalan alakok váltakozásában nem tapasztalható. A konídiumok kiürülése és szóródása már 3 °C fölött állandó, amelyhez elegendő lehet az éjszakai vagy a reggeli harmat által biztosított minimális nedvesség is (HEALD és GARDNER, 1913).

Az aszkospórák szóródása nagy valószínűséggel akkor várható, amikor egy csapadékos időjárást legalább 10 °C napi átlaghőmérséklet követ. Ezt igazolják EKE és GÁL (1977) megfigyelései is, akik azt tapasztalták, hogy 8,3 °C volt az a küszöbérték, amely alatt az aszkospórák szóródása nem volt megfigyelhető.

Az aszkospórák szóródása magas hőmérsékleten (35 °C fölött) leáll, de természetes körülmények között - az esetleges légköri aszályos időszakokat eltekintve - ez a környezeti állapot nagyon ritkán alakul ki. A spóraszóródás optimum hőmérséklete 18-27 °C között van. Ezzel magyarázható az, hogy például augusztusban sokkal intenzívebb az aszkospóra szóródás, mint a tavaszi vagy őszi relatíve hűvösebb időszakokban (HEALD és STUDHALTER, 1915).

Az aszkospórák szóródását mesterséges körülmények között előidézve megállapítást nyert, hogy a közvetlen csapadékon kívül nagyon fontos szerepe van a levegő relatív páratartalmának is. Ez az összefüggés magyarázatot ad a peritéciumok felépítésére is: a peritéciumok hosszú, perifízisekkel bélelt nyaki résszel rendelkeznek. A perifízisek zavartalan működéséhez elengedhetetlen a nedves, megduzzadt állapot. A megfigyelések során, amikor a nyaki részt eltávolították, illetve száraz, páramentes levegő hatására a sztrómák külső rétege kiszáradt, az aszkospórák szóródása is leállt (HEALD és WALTON, 1914).

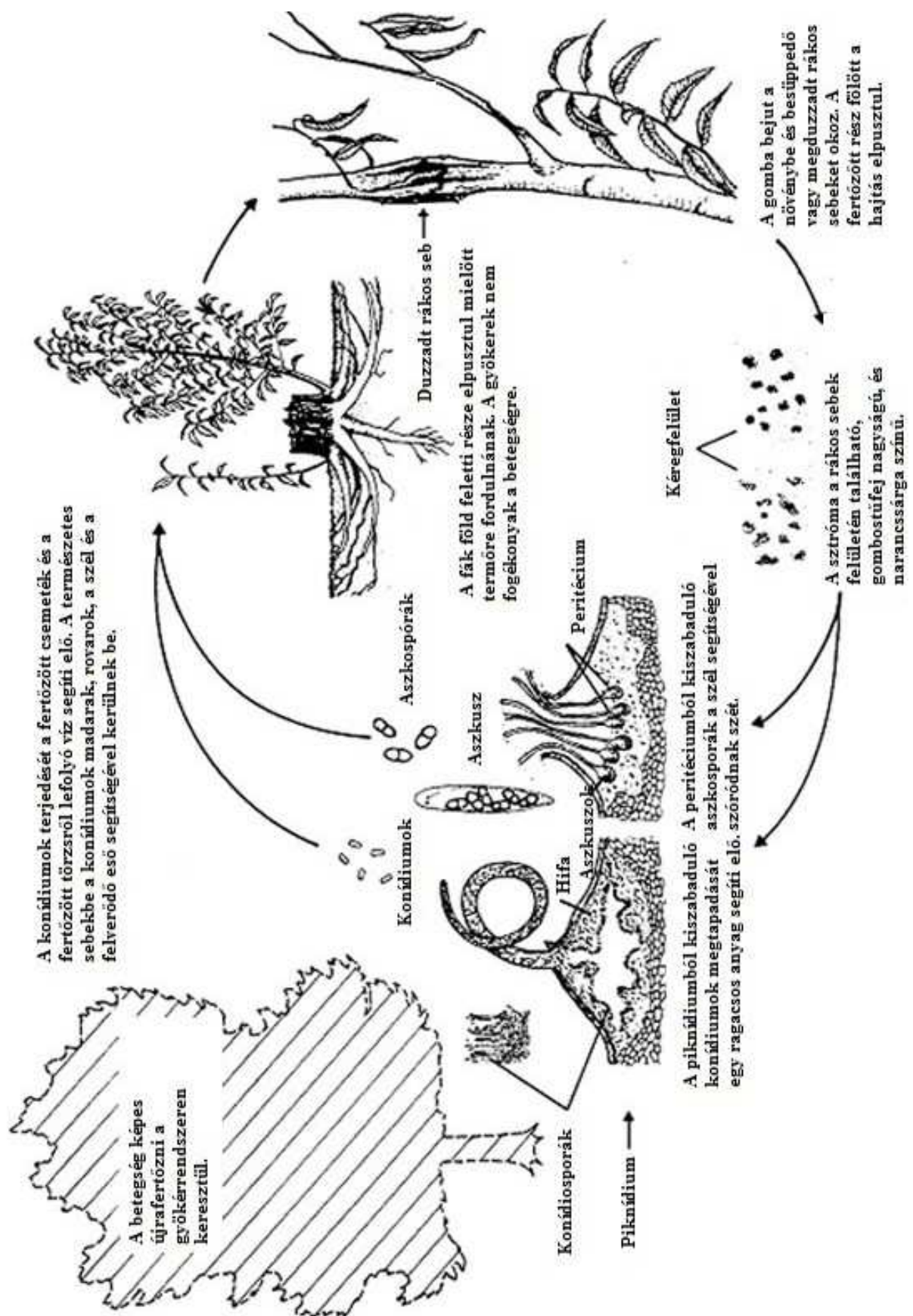
ANDERSON és BABCOCK (1913) kutatásai alapján megállapítható, hogy egyetlen peritéciumból a teljes tenyészidőben, természetes körülmények között akár 168 napig is folyamatosan képződhet az aszkospóra. A csapadékos időjárást követően nem ritka a napi 14 órán át tartó, folyamatos aszkospóra kiürülés sem.

A kórokozó bár obligát sebpazita, megfigyelték, hogy az elhalt növényi részeken is képes szaprofitaként sokáig fennmaradni, sőt akár sporulálni is. Nagy mennyiségben termelődhetnek mind az ivaros, mind az ivartalan szaporító képletek a lehullott ágdarabokon, a kivágott, a szállításra előkészített gesztenyefákon (SHEAR és STEVEN, 1913a).

A gomba természetes terjedésében, amely egyes szakirodalmi adatok szerint akár 37 km/év is lehet ANAGNOSTAKIS (1987) vizsgálatai alapján, mindkét spóralak jelentős szerepet kap. A ragadós, a nyálkás anyagba ágyazott konídiumok könnyen megtapadhatnak a rovarok, a madarak lábán, kültakaróján, amelyek mint vektorok széthurcolják a kórokozó szaporító képleteit.

Megfigyelésekkel támasztották alá, hogy a fákon található ízeltlábúak mellett jelentős a madarak szerepe is a kórokozó terjesztésében. Nem elhanyagolható tényező az sem, hogy a csapadék hatására az ágak, illetve a törzs alsóbb részeire a sebekből kimosódó konídiumok könnyebben tudnak eljutni (HEALD és STUDHALTER, 1914).

Az aszkospórák terjesztésében a szélnek van az elsődleges és a legfontosabb szerepe. Egyes esetekben fontos terjesztője lehet a kórokozónak a micélium darabkák vektorok általi széthurcolása, illetve a fertőzött faanyagok szállítása is. Az ilyen fertőzött szaporítóanyagokon sok esetben nincs is látható tünet, amely gyanút keltene, így ez a betegség időbeni felismerését nagyon megnehezítheti a termelő, felhasználó számára (RADÓCZ, 1995).



4. ábra A szelídgesztenye kéregrák életciklusa

(Forrás: <http://ecosystems.psu.edu/research/chestnut/breeding/blight/life-cycle/view>)

2.1.5. A kórfolyamat jellemzése

A mechanikai behatásokra, valamint a természetes úton kialakuló sebzésekbe, illetve kéregrepedésekbe bekerülő aszkospóra vagy konídium ideális környezeti feltételek mellett kicsírázik, és megtörténik az elsődleges infekció. Mesterségesen előidézett fertőzések esetében megfigyelték, hogy egy ún. "iniciális lézió" alakul ki a fertőzött sebek környékén, közvetlenül a fertőzést követően. A kialakuló lézió növekedésében két csúcst figyeltek meg. Az első szakasz a fertőzés utáni első 8-10 napig tart, és intenzív fejlődés jellemzi (5. ábra). A lézió további növekedése egy 10-15 napos szünetet követően a fertőzés kezdetétől számított 26-30. napon folytatódik tovább. Ezt követően a nekrotizálódás egészen addig tart, amíg teljesen körülöleli a kérget (HEBARD et al., 1984).



5. ábra A *Cryphonectria parasitica* fertőzés hatására szétszakadozó szelídgesztenye fa kérge

Fotó: Görcsös Gábor

Az iniciális lézió kialakulásának és fejlődésének két szakaszra történő bomlása feltehetően egy, a sebek körül kialakuló lignifikált zónának tulajdonítható, amely a kéreg által képzett, és 9-15 sejt szélességű. A lignifikációs zóna kialakulásának élettani háttere egy általános védelmi funkciónak tudható be. Ez a lignifikált zóna a víz számára igen nehezen átjárható (hidrofób), és funkciója feltehetőleg a sebzések lezárása.

Ez a zóna az, amely a gomba micéliumnak a háncs belső részeibe irányuló további növekedését ideiglenesen megakadályozza. A kórokozó hifái ebben a fázisban főként intracellulárisak, tehát a sejtek belsejében növekednek. A kutatások során megállapították, hogy az iniciális lézió akkor is kialakul, ha hipovirulens törzsekkel fertőzték meg a szelídgesztenye fákat. Továbbá megállapították azt is, hogy az iniciális lézió mérete nem függ attól, hogy azt a kórokozó virulens vagy hipovirulens törzsei alakították ki, illetve fogékony (pl. európai szelídgesztenye) vagy a betegséggel szemben ellenálló (pl. kínai szelídgesztenye) fajokon történt az infekció. Ezt igazolja az a megfigyelés is, hogy a sebzések körül megjelenő lignifikált zóna kialakításában nincs különbség a rezisztens ázsiai és a fogékony európai, illetve amerikai gesztenye fajok kéregreakciói között (BRAMBLE, 1936).

Miután a lignifikációs zónát a kórokozó hifaszövedéke áttörte, megnyílik a lehetőség a gomba számára, hogy behatolhasson a kéreg belső szöveti részei, illetve a kambium felé. A lényegi különbségek ez követően figyelhetők meg a patogenezis folyamatában a hipovirulens és a virulens kórokozó törzsek, illetve a fogékony és a rezisztens gazdanövény között. A fogékony fajokon, a virulens törzsek által okozott nekrozisoknál a hifák növekedése rendkívül gyors, és egy időben többirányú lesz, és fontos jellemzője, hogy a háncs külső és belső részeit, valamint a kambiumot is érinti. Ezzel ellentétben a hipovirulens törzsek, illetve a virulens törzsek által rezisztens fajokon okozott fertőzések esetében a hifák relatíve lassú, egyirányú és csak a külső háncsrészekre korlátozódó növekedése figyelhető meg (HEBARD et al., 1984).

Számos kutatást végeztek annak a kiderítésére, hogy az egyébként rezisztens ázsiai fajok csemetéi miért fogékonyak kb. 2-3 éves korukig a *C. parasitica* fertőzésére, valamint, hogy az idősebb fák fiatal kéreggel rendelkező részei is sokkal érzékenyebbek. A különböző vizsgálatok során végül megállapítást nyert, hogy a virulens kórokozó törzsek hifáinak növekedése inkább jellemző a külső háncsrészekben, a 4-6 évnél idősebb ágrészek esetében (UCHIDA, 1977).

MCCARROLL és THOR (1978) kutatásaik során fényt derítettek arra, hogy a kialakuló elhalások széli részein erősen savas (pH 2,7-5,6) kémhatás figyelhető meg.

COOK és WILSON (1915) megfigyelései rámutattak arra a tényre, hogy a kórokozó a szelídgesztenye kérgének tanninját jól hasznosítja tápanyagforrásként.

BAZZIGHER (1955) vizsgálatai során megállapította, hogy a gomba, a kiválasztott észteráz enzimek segítségével képes felhasználni az európai szelídgesztenye hidrolizálható tannin tartalmát. A táptalajokon végzett kísérletek során megfigyelte, hogy a magas hidrolizálható tannin-tartalmú szelídgesztenye fajok (pl. az európai és az amerikai) kérgéből

előállított oldatokban a kórokozó képes intenzíven növekedni, sőt előidézi a szubsztrátum pH-jának erőteljes csökkenését is.

A rákos sebek könnyen felismerhetővé válnak a fiatal, sima kérgű fákön, illetve ágakon, mivel feltűnő elváltozásokat okoznak. Jellemző a kéreg színében bekövetkező markáns változás is, mert a fertőzés kezdeti szakaszában vörösesbarna színű, sárgás duzzanatokkal borított, kissé bemélyedő elszíneződés alakul ki, amely igen jól megkülönböztethető az egészséges, olajzöld színű kérgtől. A felszíni színváltozás a gomba kéreg alatti micéliumának növekedésével párhuzamosan alakul ki. A kórfolyamat előrehaladtával rendszerint a behatolás helye körül a kéreg több vonalban fölrepedezik, és ezt követően a kórokozó 1,5-3 mm átmérőjű, narancsszínű sztrómái is megjelennek (6. ábra), amelyek először a peridermába ágyazottak, majd később kiemelkednek (JUHASOVA és RADÓCZ, 1995).



6. ábra A *Cryphonectria parasitica* narancsszínű sztrómáinak megjelenése az ágvillaiban

Fotó: Göröcs Gábor

Az idősebb héjkéreggel rendelkező, a természetes úton repedezett kérgű törzsön és ágakon a kórokozó jellegzetes tünetei a fertőzés korai szakaszában nehezen ismerhetők fel, és összetéveszthetők egyéb kórokozók által kialakult kéregdefektusokkal.

A kéregrepedések alján képződő narancsszínű sztrómák, és a kéreg alatt kialakuló jellegzetes, legyező alakú micélium képződmény, az ún. szirrócium, amely a *Cryphonectria* genuszon belül csak a *C. parasitica* -ra jellemző, alapján azonban a kórokozó jelenléte biztonsággal diagnosztizálható (EKE és SELMECZI, 1984).

A betegség elhatalmasodásával a megtámadott kéregrészt teljesen elpusztul, és felszakadozva leválik. Miután a kórokozó megjelenik egy adott fa kérgén, hamarosan az újrafertőzés miatt az egész fán megfigyelhetőek lesznek a tünetek. Egy-egy fertőzött fán általában több rákos seb is kialakul, leggyakrabban a vázágakon, a törzsön és az ágvillákban, de gyakori a gyökérnyaki részek fertőződése is, különösen a csemeték és a fiatal oltványok esetében. A kórfolyamat végén rendszerint a teljes fa elpusztul (7. ábra). A fiatal fákon, a csemetéken megjelenő sztrómák átlagos mérete is kisebb (1-1,5 mm). A fertőzés helyén a kéreg szintén besüpped, fel is repedezhet, de a farésztől való elválása nem jellemző (RADÓCZ, 1994).



7. ábra A *Cryphonectria parasitica* által elpusztított szelídgesztenyefa a macedóniai Tetovo termőrégióban 2011-ben

Forrás: Görcsös Gábor

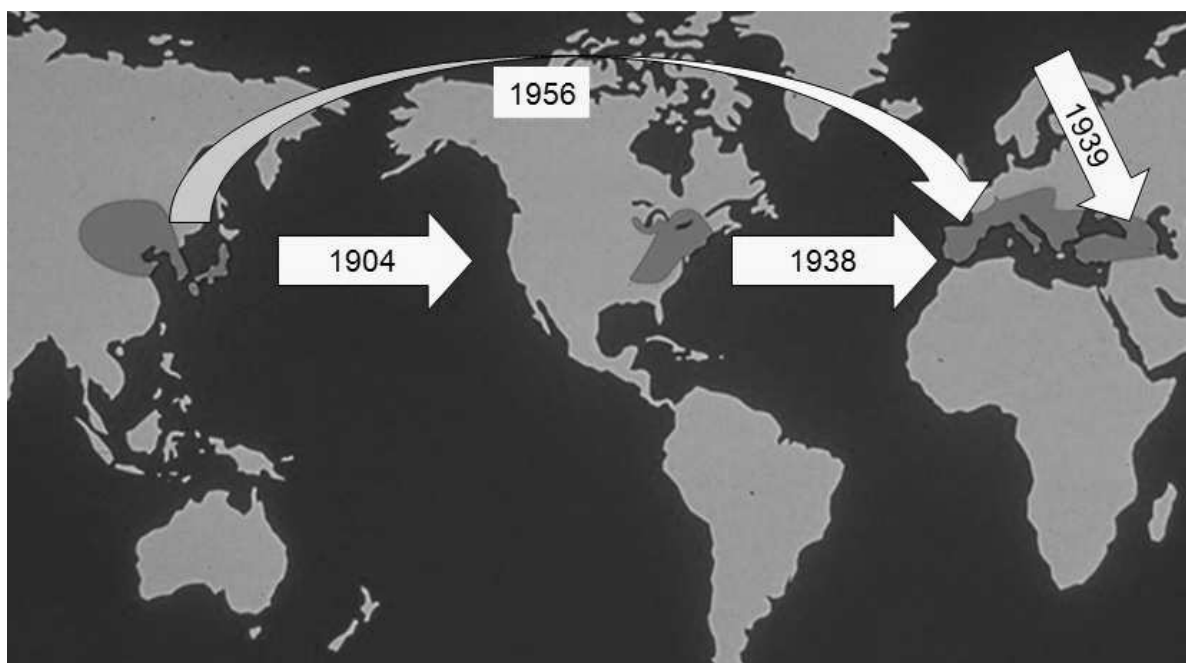
2.1.6. A kórokozó megjelenése és elterjedése Európában

Először egy erdész, MERKEL (1906) fedezte fel és írta le a betegséget 1904-ben a bronxi állatkert idős szelídgesztenyefáin, melyet halálos kórként jellemzett.

A betegség Amerikába kerülésének módját, illetve a betegség őshazáját azután kezdték el kutatni, miután az megjelent Észak-Amerikában. Frank Meyer, herbológus Ázsiában kereste a betegség eredetét, és találta meg a kórokozót Kínában és Japánban. A kutató azonban megfigyelte azt is, hogy az ázsiai gesztenyék rezisztenciát mutatnak a betegséggel szemben (SHEAR és STEVEN 1913b; SHEAR és STEVEN 1916).

PROSPERO és RIGLING (2012) kutatásaik során arra keresték a választ, hogy a kórokozó mikor és merről érkezett Európába. Vizsgálataik során megállapították, hogy a betegség valószínűleg két irányból támadta Európát: az egyik fő terjedési vonal Olaszország felől rajzolódik ki, míg a másik irány Franciaország nyugati határától ered. A két terjedési útvonalat az Alpok határolja el egymástól.

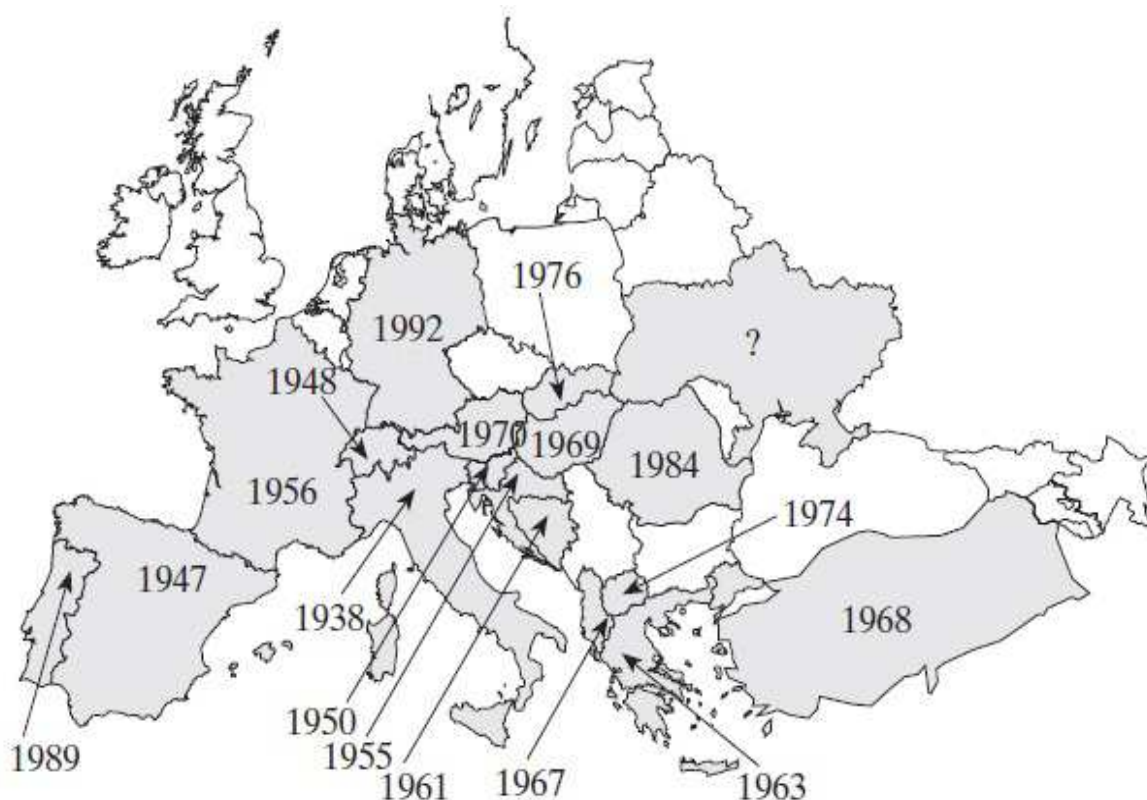
DUTECH et al. (2012) munkájuk során egy harmadik lehetséges, Európa felé irányuló terjedési útvonalat is közölnek, amely vélhetően Grúzia területén keresztül érte el az európai kontinenst (8. ábra).



8. ábra A *Cryphonectria parasitica* kórokozó terjedésének iránya a kontinensek között

Forrás: (DUTECH et al., 2012)

Napjainkban a kórokozó világszerte előfordul, minden jelentősebb szelídgesztenye termőterületen megtalálható. Kutatási munkám során a vizsgálatokat igyekeztem a Kárpát-medence szelídgesztenye termőterületeire korlátozni. A 9. ábrán jól megfigyelhető, hogy Közép-Európában mindenhol jelen van a kórokozó.



9. ábra A *Cryphonectria parasitica* kórokozó gomba megjelenésének időpontjai a különböző európai országokban

Forrás: (ROBIN és HEINIGER 2001)

A különböző szakirodalmi adatokat áttanulmányozva megállapítható, hogy Európában elsőként 1938-ban Olaszországban fedezték fel a betegséget. Ezt követően a gyors terjedésnek köszönhetően először a szomszédos országokban, majd szinte az egész kontinensen végigsöpört a kórokozó. A 1960-as években egyre több helyről jelentették a *C. parasitica* gomba megjelenését. A kórokozó rohamos terjedését több tényező segítette. A védekezések korlátozott megvalósíthatósága, valamint a kórokozó számára ideális környezeti feltételek mind gyorsították a szétterjedését a kontinensen.

Az 1. táblázat megmutatja az európai országokban megjelenő kórokozó első megfigyelésének dátumát. A dátumokat megvizsgálva kimutatható, hogy a kontinensen megjelent betegség 25-30 év alatt minden jelentősebb szelídgesztenye termőterületen általánossá vált és elérte a fajok északi kiterjedésének határait is.

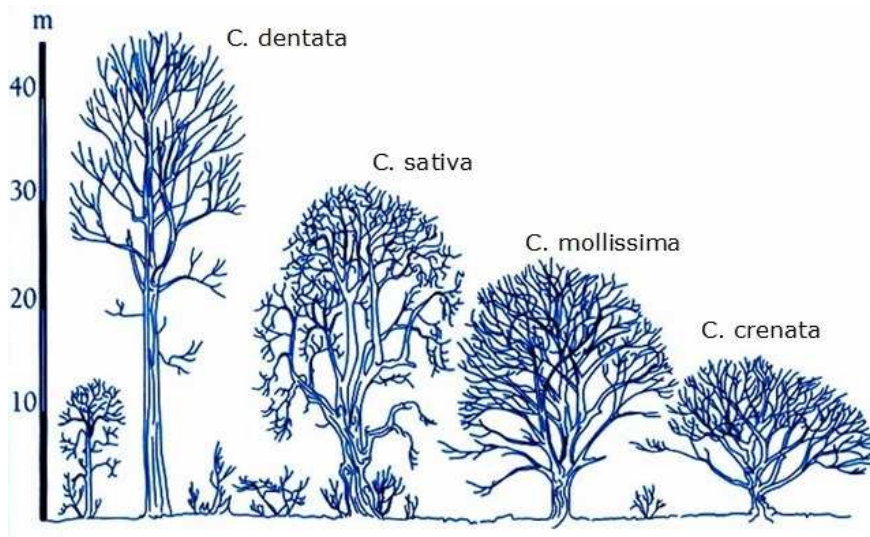
Ország	Első megfigyelés éve	Hivatkozás
Albánia	1967	ELEZAJ 1970
Ausztria	1970	WRONSKI et al., 1997
Bosznia-Hercegovina	1961	USCUPLIC 1961
Horvátország	1955	NOVAK AGBABA 1998
Franciaország	1956	ROBIN és HEINIGER 2001
Németország	1992	SEEMANN et al., 2001
Görögország	1963	PERLEROU és DIAMANDIS 2006
Magyarország	1969	KÖRTVÉLY 1970
Olaszország	1938	CORTESI et al., 1996
Portugália	1989	ABREU 1992
Macedónia	1974	SOTIROVSKI 2000
Románia	1984	FLOAREA és POPA 1984
Szlovákia	1976	JUHÁSOVÁ 1976
Szlovénia	1951	SOLAR et al., 2001
Spanyolország	1947	COLINAS és USCUPLIC 1999
Svájc	1948	HEINIGER és STADLER 1990
Törökország	1968	AKDOGAN és ERKAN 1968
Bulgária	1990	SOTIROVSKI et al., 2004
Csehország	2002	JANKOVSKÝ et al., 2004
Ukrajna	2001	RADÓCZ 2001

1. táblázat A *Cryphonectria parasitica* európai elterjedésének fontosabb dátumai

2.1.7. A kórokozó gazdanövényei

A *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr parazita kórokozó tápnövényeinek számát tekintve oligofágnak mondható. Nem kizárólagosan az európai szelídgesztenyét (*Castanea sativa*) károsítja. Első leírása alkalmával az amerikai szelídgesztenyén (*Castanea dentata*) találták meg, majd később áttelepült Európába is. Elsődlegesen a *Castanea* nemzetségbe tartozó fajokon okoz súlyos károkat, de megfigyelték azt is, hogy a *Fagaceae* családba tartozó egyéb fafajokat is megtámadhatja. A kutatások rámutattak arra is, hogy a *Quercus* nemzetség számos fajtát is képes megbetegíteni a gomba (JUHÁSOVÁ és KULCSAROVÁ, 2002).

GRAVES 1950-ben vizsgálatai során igazolta, hogy a kínai gesztenye (*Castanea mollissima*) rezisztensnek mutatkozik a kórokozóval szemben. A kutatások során megállapítást nyert, hogy az alábbi sorrendben növekszik a fogékonyság a legelterjedtebb gesztenyefajok tekintetében: a legfogékonyabb az amerikai szelídgesztenye (10. ábra), majd őt követi az európai fajtársa, a legnagyobb ellenálló képességgel a kínai gesztenye rendelkezik, és kicsivel elmarad mellette a japán gesztenye (FULBRIGHT et al., 2010).



10. ábra A különböző szelídgesztenye fajok morfológiai különbségei

Forrás: (RADÓCZ, 2010)

NIENSTAEDT 1953-ban megfigyelte, hogy a kínai gesztenye melegvizes oldata gátolta a kórokozó micéliumainak növekedését. A rezisztencia élettani háttere a különböző szelídgesztenye fajok kérgében megtalálható lignifikált sejtsorokra vezethető vissza (HEBARD és SHAIN, 1988). A fő különbség az, hogy a kínai szelídgesztenye

enzimkészletében megtalálhatók olyan antifungális hidrolázok, kitinázok és glükánázok, valamint egyén fitoalexinek, amelyek a kórokozó micéliumainak növekedését gátolják, és lebontják a gomba hifáit (SHAIN et al., 1994).

Szintén az USA-ban figyelték meg biológusok a 60-as évek elején, először olasz tölgyön vagy más néven levélnyelű vergiliusztölgyön (*Quercus virgiliana*) a kórokozó megjelenését, majd ezt követően tömeges előfordulását jelentették erről a fafajokról. A további kutatások során más tölgyfajokon is megtalálták a kórokozót, például bíbor tölgy (*Quercus coccinea*) egyedeken. A részletes, mesterséges infekciós vizsgálatok eredményei alapján beszámoltak arról is, hogy a betegség lefolyása, hevéssége, valamint a kórokozó agresszív terjedése elmarad a különböző szelídgesztenye fajokon megfigyeltektől. Jellemzően ott ütötte fel a fejét a gomba, ahol a tölgyek a szelídgesztenyével elegyerdőket alkottak, és a nagy fertőzési nyomás hatására a tölgyeken is megjelent a betegség (BATSON és WITCHER, 1968; TORSELLO et al., 1994).

Európában szintén több publikáció és tudományos munka született, amelyek a *C. parasitica* tölgyön való megjelenését írták le. BISSEGER és HEINIGER 1991-ben Svájcban is észlelte a betegséget kocsánytalan tölgyön (*Quercus petraea*). Vizsgálataik során megállapították, hogy a betegség terjedése lényegesen lassúbb, mint ahogy az a szelídgesztenyén megfigyelhető.

Olaszországban LUISI és munkatársai 1992-ben szintén kocsánytalan tölgyön írták le a kórokozót. 7 évvel később olasz kutatók megtalálták és izolálták a betegséget molyhos tölgy (*Quercus pubescens*), magyar tölgy (*Quercus frainetto*), magyaltölgy (*Quercus ilex*), egyedeken, valamint közönséges gyertyán (*Carpinus betulus*), közönséges komlógyertyán (*Ostrya carpinifolia*), és olasz éger (*Alnus cordata*) fajokon is. Az utóbbi három fafajnak vélhetően a fertőzés továbbításában és fenntartásában lehet szerepe.

A terepi felmérések során azt tapasztalták, hogy a szelídgesztenyével társult tölgyek voltak a fertőzésnek legkitettebbek. Minden esetben enyhébb lefolyásúnak tapasztalták a kórfolyamatot, de a fertőzöttség mértéke hasonló mértékű volt a szelídgesztenye állományokban megfigyelt (DALLAVALLE és ZAMBONELLI, 1999).

A Kárpát-medencei szelídgesztenyés, tölgyes elegyerdőkben felbukkanó *C. parasitica* fertőzésekről számos szerző tesz említést. Magyarországon először 1998-ban Zengővárkony figyelték meg a kórokozót fiatal kocsánytalan tölgy egyedeken (RADÓCZ és HOLB, 2002). Később további fertőzésekről számoltak be Győr-Moson-Sopron, Zala, Somogy és Baranya megye tölgyeseiben (GÁNCS, 2002; SZABÓ, 2003).

Szlovákia területén 1996-ban JUHÁSOVÁ és LEONTOVYČ izolálta a betegséget kocsánytalan tölgyön, majd 6 évvel később JUHÁSOVÁ és KULCSAROVÁ 2002-ben megtalálta a kórokozót fiatal tölgyeken Modry Kamen (Kékkő) mellett található szelídgesztenyés társulásban is.

Romániában először 2004-ben Baia Mare (Nagybánya) közvetlen közelében találták meg és izolálták a kórokozót szelídgesztenyével elegyes kocsánytalan tölgyeken (TARCALI és RADÓCZ, 2006).

RADÓCZ és munkatársai 2011-ben Ukrajnában kocsánytalan tölgyön találták meg a kórokozót Ukrajnában, Bobovyshe (Borhalom) mellett. Vizsgálataik során izolálták a kórokozót, majd morfológiai és molekuláris biológiai markerek segítségével identifikálták a gombát (11. ábra).



11. ábra A vörös színű *Cryphonectria parasitica* termetestek megjelenése kocsánytalan tölgyön Bobovyshe (Ukrajna) mellett

Fotó: Görcsös Gábor

Összefoglalva a kórokozó által preferált gazdanövények körét, megállapítható, hogy elsősorban a *Castanea* nemzetség, a *Quercus* nemzetség és az *Acer* nemzetség különböző fajait támadja meg a kórokozó (SÓTONYI és APONYINÉ, 1996).

Fontos viszont megemlíteni, hogy a kórfolyamat a különböző nemzetségben történő fertőzés hatására lényeges különbségeket mutat. A kórokozó az európai és az amerikai szelídgesztenyén fejlődik a leggyorsabban, és jellemzően a *Quercus* fajokat a nagy fertőzési nyomás következtében támadja meg.

2.1.8. A kórokozó elleni védekezés alapelvei, módszerei

A betegség elleni védekezés egyik legfontosabb szerepe, hogy a továbbterjedést megállítsuk. Az integrált növényvédelemnek számos eszköz áll rendelkezésére a betegségek megfékezésére. A kéregrák elleni védekezés is nagyon összetett feladat, hiszen nem lehet kizárólag csak egy módszerre, illetve eljárásra hagyatkozni.

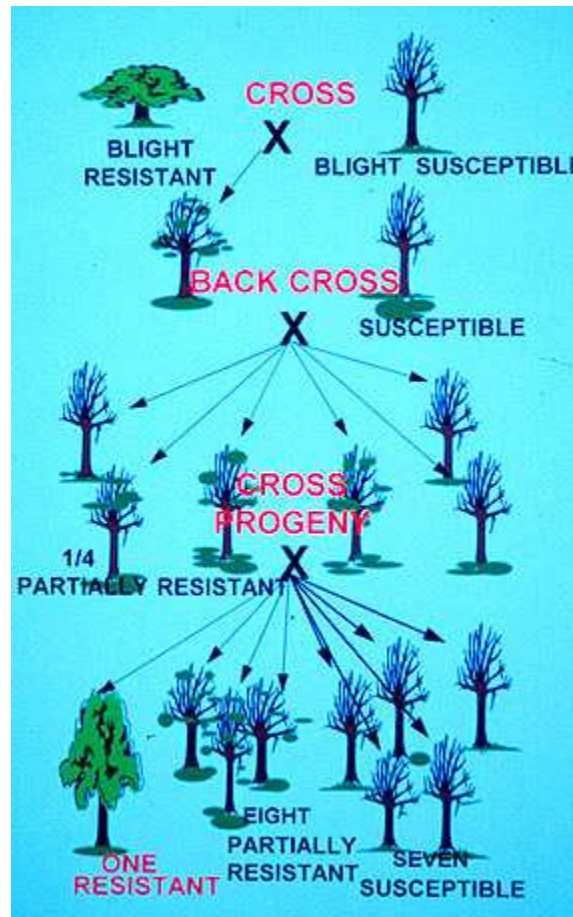
A kémiai védekezés nagyon nehezen kivitelezhető, több probléma is rontja a védekezés hatékonyságát. Miután a kórokozó a kéregbe jutott, a fungicidek nagy része már nem képes meggátolni a teljes szétterjedést a beteg fában. Megelőző jelleggel, rügpattanás előtt réz tartalmú készítményekkel lehet a kezeléseket végrehajtani, de ennek is korlátot szab a kijuttatás korlátozott időtartama, valamint az, hogy a kórokozó a tenyészidőszak végéig képes a kérgen keletkezett sebeken keresztül fertőzni (GLICS és FOLK, 2000).

Számos kutató vizsgálta a benomil hatóanyagot, amely a növényvédelemben általánosan elterjedt fungicid hatóanyag, és egyedi esetekben hatékonynak bizonyult a kórokozóval szemben. A benomil a benzimidazol típusú gombaölő szerek csoportjába tartozik, és a sejtosztódást gátolja. A kezelés legnagyobb hátránya, hogy nagyon idő és energia igényes, mivel a hatóanyagot injektálva juttatják be a beteg fa törzsébe. A hatóanyagot Magyarországon 2003-ban visszavonták, az fungicidként már nem felhasználható (JAYNES és VAN ALFEN 1974; DELEN, 1979; SZABADI et al., 2003).

Kisebb kiterjedésű gesztenyésekben jól alkalmazhatóak a különböző mechanikai védekezési módszerek. A beteg, illetve az elszáradt ágakat össze kell gyűjteni, és el kell égetni ahhoz, hogy a kórokozó kitartó képletei is megsemmisüljenek. A beteg fákra a rákos sebekkel borított ágrészeket le kell vágni, a vágási sebeket gombaölőszerekkel kevert olajfestékkel le kell zárni, és a levágott ágrészeket szintén el kell égetni. A vadkárok megelőzése céljából vadriasztó készítmények is rendelkezésre állnak, melyek használatával a vadállatok okozta kéregsérülések visszaszoríthatóak (RADÓCZ, 2010; RADÓCZ, 2013, MARÁCZI, 2013).

Számos kísérlet irányult arra, hogy a kínai gesztenye és a japán gesztenye toleranciáját a kéregrákkal szemben átültessék különböző növénynemesítési eljárásokkal a fogékony amerikai és európai szelídgesztenye fajtákba. Itt fontos szempont volt az, hogy az eltérő fajok eltérő termőhelyekről származnak, ezáltal mások az ökológiai igényeik is. Éppen ezért szükséges a nemesítési eljárások során a termőhelyi adaptációt bevinni a létrehozandó új fajtákba, hibridekbe is (LEE et. al., 1992; ANAGNOSTAKIS, 1992).

BURNHAM 1988-ban az USA-ban kidolgozott egy keresztezési eljárást, amely segítségével a rezisztenciát kiváltó géneket átültette a fogékony amerikai gesztenye egyedekbe. Nemesítési eljárása során rezisztens fajtát keresztezett fogékony fajtával, majd azt visszakeresztelte fogékony fajtával, majd újbóli visszakeresztelés történt fogékony fajtával. A keresztezés végére 16 fából 7 fogékony, 8 részlegesen rezisztens és 1 teljes rezisztenciával rendelkező egyed alakult ki (12.ábra).



12. ábra A *Cryphonectria parasitica* gomba elleni rezisztencia nemesítés modellje amerikai szelídgesztenye esetében

Forrás: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/ChestnutBlightDisease.aspx>

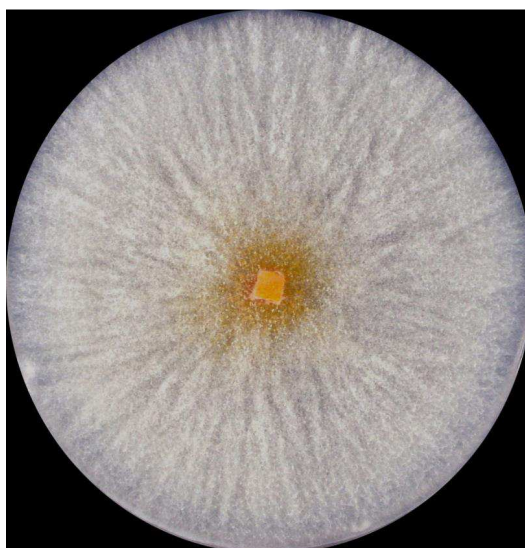
A hagyományos nemesítési eljárásokon is túlmutat a rohamosan fejlődő biotechnológiai módszerek alkalmazása. Talán az egyik legnagyobb előnye, hogy lényegesen gyorsabb és stabilabb az általa elért módosítás. Lényege, hogy a rezisztenciát kiváltó gén(ek)t különböző biotechnológia eljárások után áthelyezik a fogékony egyedek genomjába. Természetesen itt is a donorként szolgáló fajok az Ázsiából származó rezisztens populációkból kerülnek ki (FINESCHI et al., 1994).

2.1.9. A hipovirulencia jelensége

A *Cryphonectria parasitica* elleni védekezésben az egyik legnagyobb áttörést a hipovirulencia felfedezése jelentette. Napjainkban is a leginkább kutatott témákhoz tartozik, pedig már több mint 50 éve írták le a jelenséget először.

A szelídgesztenye esetében Olaszországban fedezték fel először, hogy Genova környékén egy erősen fertőzött állományban, a besüppedt rákos sebek felszínén begyógyult nekrozisok voltak találhatóak. Addig az újra kalluszosodás mint a gyógyulási folyamat része, csak az ázsiai gesztenyefajták esetében volt megfigyelhető (BIRAGHI, 1950).

GRENTE 1964-ben a természetes úton meggyógyult rákos sebekből sikeresen kitenyésztette a kórokozót. Megfigyelte azonban, hogy a hipovirulens izolátumok táptalajon növesztett telepei nagy morfológiai eltérést mutatnak a virulens törzsekéhez képest. A telep jellemzően hófehér színű (13. ábra), csökkent pigment-tartalmú volt, ellentétben a virulens törzsek erős narancssárga, pigmentált színével. A hipovirulens törzsekre jellemző volt továbbá a gyenge sporuláló képesség is. Az ilyen törzsek megbetegítő képességükben is jelentős eltérést mutattak az addig ismert virulens törzsekhez képest. Mesterséges inokulációs vizsgálatok során megfigyelték, hogy a hipovirulens kórokozó csak a kéreg felületén maradt, nem hatolt be a mélyebb rétegekbe, ezáltal a kambium sértetlen maradt, így a fertőzött fák nem pusztultak el.



13. ábra Hipovirulens *Cryphonectria parasitica* izolátum, jellegzetes depigmentált fehér
színnel

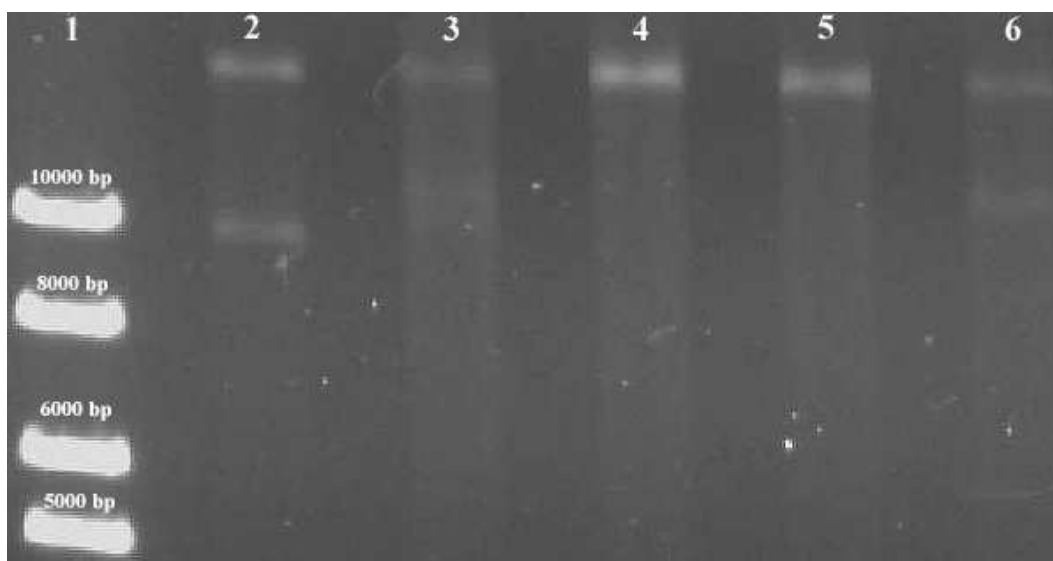
Fotó: Görcsös Gábor

Az ilyen törzseket csökkent fertőzőképességük miatt hipovirulenseknek nevezték el. További vizsgálatok során fény derült arra is, hogy a hipovirulencia előidézője a gombasejtek citoplazmájában megtalálható, és az könnyen átadódhat két egymással vegetatívve kompatibilis gomba egyed között kialakuló hifa anasztomózisokon keresztül (GRENTE és SAURET, 1969).

A hipovirulencia működésének pontos megértésében MOFFITT és LISTER 1975-ben publikált munkája segített. Vizsgálataik során sikeresen kimutatták kettősszálú RNS-ek (dsRNS) citoplazmatikus jelenlétét a két francia eredetű hipovirulens törzs esetében.

Az első, az egyszerűsített módon történő dsRNS izolálását a mikovírussal fertőzött *C. parasitica* izolátumból MORRIS és DODDS végezte el 1979-ben. Az eredeti módszert a későbbiekben számos szerző módosította (ALLEMANN et al., 1999; ALLEN et al., 2003; HILLMAN et al., 1990; PEEVER et al., 1997; RIGLING et al., 1989).

Ezt követően DODDS 1980-ban olasz és francia hipovirulens törzsekben 3 különböző nagyságú, kettősszálú RNS-frakció jelenlétét mutatta ki, majd a leghosszabb kétszálú RNS-t 12,7 kbp nagyságban határozta meg (14. ábra).



14. ábra Hipovirulens *Cryphonectria parasitica* törzsekből izolált dsRNS elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben

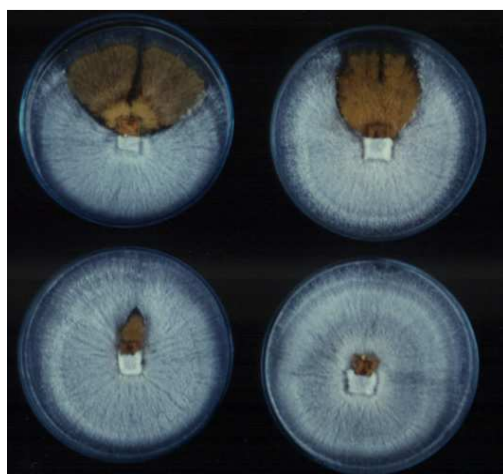
Fotó: Görcsös Gábor

Abban az esetben, ha a hipovirulens törzsek elveszítik a citoplazmájukban lévő kettősszálú RNS-üket, vagy mesterségesen blokkolják azokat, akkor megfigyelték a fertőzőképesség nagyméretű növekedését (FULBRIGHT, 1984).

A hipovirulencia terjedésében igen fontos szerepe van a konídiumok keletkezésének, mert a konídiumok kb. 90 %-os valószínűséggel hordozzák a kettősszalú RNS-t. Ha terjedésüket összehasonlítjuk a virulens törzsek terjedésével, megállapítható, hogy a gyengébb sporuláció, illetve a kisebb mértékű konídium termelés miatt a hipovirulens törzsek légyegesen lassabban képesek elterjedni. További problémát jelenthet szétterjedésükben, hogy az ivaros szaporodás igen ritka a hipovirulens törzseknél (TURCHETTI, 1982).

A természetes szétterjedés szempontjából jelentős szereppel bír a hifa anasztomózison keresztül történő átadás (15. ábra), de a transzmisszió lehetősége függ az egyes izolátumok vegetatív kompatibilitásától. Valószínűsíthető, hogy adott területen a kórokozó megjelenése után bizonyos időnek el kell telnie ahhoz, hogy természetes úton megjelenjen a hipovirulencia is. Ezt példázza az, hogy Svájcban 1948-ban észlelték a kórt, a hipovirulens törzseket viszont csak 1975-ben találták meg először (BAZZIGHER et al., 1981).

A hipovirulenciát előidéző kettősszalú RNS-t tartalmazó, köpenyfehérjével nem rendelkező mikovírusok rendszertani elhelyezésével HILLMAN és munkatársai által 1994-ben közölt munka foglalkozott. Ebben a munkában az európai *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) a *Hypoviridae* genuszba került besorolásba. Svájci kutatók RFLP eljárással (Restriction Fragment Length Polymorphism) 9 különböző európai ország hipovírusait vizsgálták, és megállapították, hogy a francia izolátumokat kivéve egységes képet mutatnak a többi országból származó minták. A Franciaországból származó hipovirulens gombatörzsek morfológiai szempontból is különböztek, mert a telepeiket lassú növekedés jellemezte, továbbá a telepek pigmentáltak voltak (ALLEMAN et al, 1999).



15. ábra A konverzió hatása és folyamata a hipovirulens és a virulens *Cryphonectria parasitica* izolátumok között

Forrás: (RADÓCZ, 2010)

2.1.10. A vegetatív kompatibilitás

A hipovirulens törzsek hifa anasztomózisokon keresztül képesek a dsRNS átadására, ezáltal a virulens kórokozó törzsek elvesztik fertőzőképességüket, és megindulhat a nekrózisok lassú gyógyulása. Mivel ez a védekezési módszer tűnik a leghatásosabbnak, számos kísérletet végeztek, amelyekben ráoltásokkal próbálták meggyengíteni a fertőző kórokozó törzseket (15. ábra). E kísérletek során megfigyelték, hogy a ráoltások nem minden esetben voltak sikeresek, a hipovirulenciát kiváltó vírus nem mindig jutott át a „vad” törzsekbe. A vírus átadása csak abban az esetben volt sikeres, ha vegetatív kompatibilitás áll fenn a két gombaizolátum között (ANAGNOSTAKIS és WAGGONER, 1981).

A vegetatív inkompatibilitás egy olyan endogén szabályozási folyamat, amely abban nyilvánul meg, hogy egy adott fajon belül is csak az azonos vegetatív kompatibilitási csoportba tartozó törzsek képesek stabil anasztomózisok kialakítására. Ha vegetatív inkompatibilis törzsekkel végzünk ráoltást, akkor kétféle reakció következhet be. Az első esetben egy torlasz (barrage) keletkezik, melynek kialakulásáért a két egymással szemben növő micéliumfront között kialakuló intenzív fehérjelebomlás a felelős. Az érintkező hifák lebomlanak, és pigment anyagok áramlanak ki belőlük, ezért mind a felgyűrődés, mind pedig az elszíneződés jól láthatóvá teszi a folyamatot (16. ábra). A kialakuló szegély a kéreggrák gomba esetében vöröses narancssárga színű (ANAGNOSTAKIS et al., 1998; MARÁZ és HORNOK, 2003).



16. ábra Inkompatibilis *Cryphonectria parasitica* törzsek párosítása nyomán kialakuló szegély

Fotó: Görcsös Gábor

A második esetben a hifák érintkezését gyors sejthalál követi. Ebben a reakcióban nincsenek olyan szembetűnő jelek, mint az első esetben. A vegetatív inkompatibilitás feladata többszörös jelentőséggel bír. Ez a mechanizmus képes megakadályozni a mikovírusok horizontális terjedését. Megóvhatja továbbá a klónként szaporodó vonalak genetikai állományát a felhígulástól, amely főleg a növénypatogén gombák esetében különösen fontos önvédelmi reakció. Bár a vegetatív kompatibilitást determináló gének, és a fertőzőképességért felelős gének egymástól függetlenül öröklődnek, de az előbbiek az idegen partnerekkel való rekombináció kizárásával csoporton belül tarthatják a populáció túlélése és a szaporodás szempontjából oly fontos patogenitási tulajdonságokat. A patogenitás és a vegetatív kompatibilitás kapcsolata sok esetben olyan szoros kapcsolatban van, hogy ismert tulajdonságú törzsekkel végzett vegetatív kompatibilitási próbát lehet használni a patogén rasszok azonosítására. A vegetatív kompatibilitás sejtmagi kontroll alatt áll, a kompatibilitási gének olyan sejtalkomponenseket vagy egyéb azonosításra alkalmas polipeptideket kódolnak, amelyek jellemzőek egy adott csoportra, s a csoport tagjai ennek alapján képesek felismerni egymást (MARÁZ és HORNOK, 2003; BIELLA et al., 2002).

Két egymással nem kompatibilis gombatörzs esetében a párosításkor a hifa-anasztomózisok már azelőtt elhalnak, mielőtt a hipovirulenciáért felelős kettősszálú RNS részecske átadódna. Fontos felfedezés viszont az, hogy a kettősszálú RNS (dsRNA) átadása bizonyos esetekben még inkompatibilis (különböző VCG-be tartozó) egyedek között is lehetséges, igaz nagyon kis gyakorisággal. Ennek magyarázata az, hogy az inkompatibilitási reakció által indukálódott sejthalált megelőzően az ideiglenesen képződő anasztomózisokon keresztül is megtörténhet a transzmisszió, mert a citoplazmatikus dsRNA mozgása meglehetősen gyors (PENNISI et al., 1992; GRANATA et al., 1992).

ANAGNOSTAKIS 1977-ben sikeresen beazonosította a kórokozó gombában a vegetatív inkompatibilitásért felelős géneket. Vizsgálatai során megállapította azt is, hogy minél nagyobb a genetikai különbség két törzs között, azok hifái annál kevésbé képesek anasztomózisra. Ilyen esetekben nem alakul ki tartós anasztomózis, a hifák a találkozási pontoknál elhalnak, és kialakul a már említett szegélyzóna. Amennyiben viszont a genetikai eltérés nem nagy, s ha a kórokozó kromoszómáinak 7 különböző VCG-lókuszában azonos allélok találhatók, tehát közeli rokonsági fokról beszélhetünk, a tartós anasztomózisok kialakulnak, és lehetővé válik a citoplazmák kölcsönös cseréje a két egyed hifái között. A csere alkalmával pedig lehetőség nyílik az RNS vírus átadására, és kialakul a hipovirulencia. A hipovirulens törzsek hatékony felhasználása a kéregrák ellen tehát attól függ, hogy a virulens és a hipovirulens törzsek között képes-e kialakulni a stabil hifa anasztomózis.

Ennek felmérése céljából fejlesztették ki a vegetatív kompatibilitási tesztet, amely alapján a törzseket vegetatív kompatibilitási csoportokba (Vegetative Compatibility Group - VCG) lehet sorolni. Azok a kórokozó törzsek, amelyeknek hifái egymás között képesek anasztomózisra, vagyis kompatibilisek, egy vegetatív kompatibilitási csoportba (VCG-be) kerülnek. A *Cryphonectria parasitica* esetében az elméletileg lehetséges VC csoportok száma a 150-t is meghaladhatja. Az Amerikai Egyesült Államokban 1983-ban már 77 VC típus létezett (ANAGNOSTAKIS, 1983; ANAGNOSTAKIS, 1998; HOGAN és GRIFFIN, 2002a).

A hipovirulens törzsek hatékony felhasználásnak alapja az volt, hogy minél részletesebben feltérképezzék a kórokozó lehetséges VC csoportjait. Európában egy átfogó nemzetközi kutatás kezdődött az azonosított vegetatív kompatibilitási típusok egységes rendszerbe foglalása céljából. Ennek eredményeként 31 EU-teszter törzset identifikáltak a kórokozó Svájcban és Olaszországban izolált törzseiből. Megállapításuk szerint hat locus-t és két-két allél-t számítva potenciálisan 64 ilyen VCG létezik (CORTESI et al., 1998).

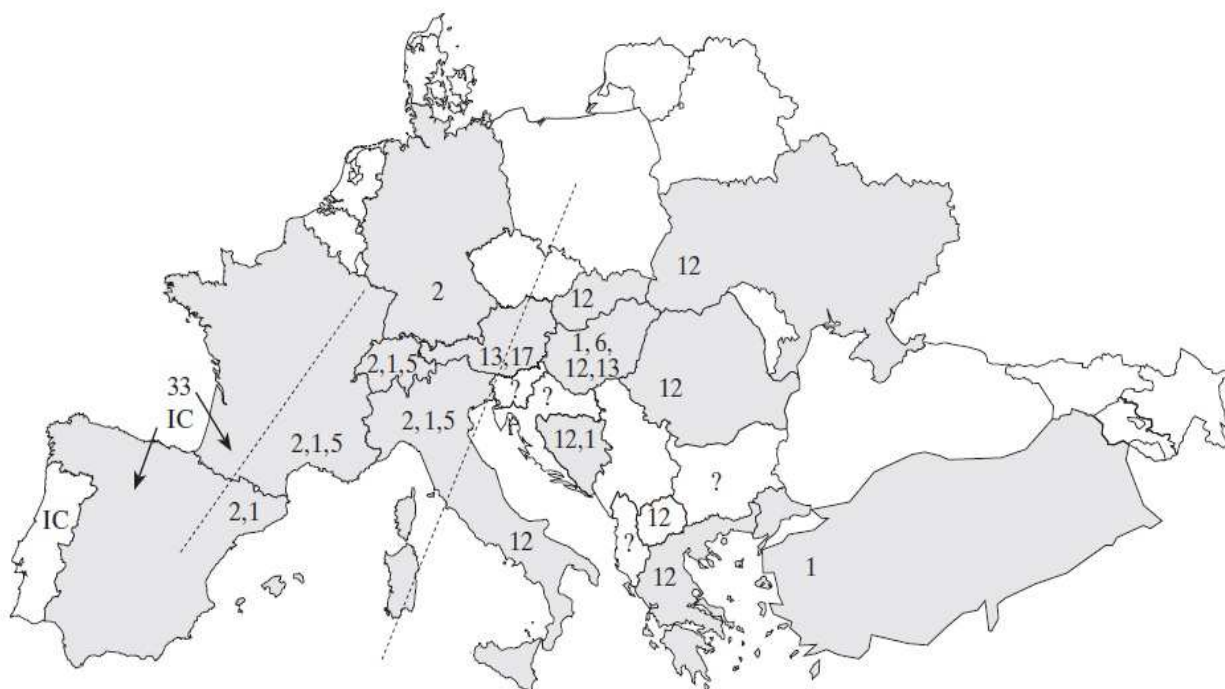
A Kárpát-medence *C. parasitica* populációinak vegetatív kompatibilitási csoportokba történő besorolását követően az volt megállapítható, lényegesen kevesebb VC csoport van jelen, mint az Egyesült Államokban, vagy akár a kiemelt szelídgesztenye-termelő európai országokban, mint például Olaszországban, Franciaországban (VIDÓCZI et al., 2000).

A magyarországi szelídgesztenye állományok felmérésekor megállapították, hogy az egyes termőhelyeken azonos VC csoportokba tartozó kórokozó törzsek vannak jelen. Ez azzal magyarázható, hogy a gomba viszonylag rövid ideje van jelen hazánkban. A legújabb kutatások szerint viszont már elmondható az, hogy vannak olyan termőhelyek is, ahol már több VCG-be tartozó törzset azonosítottak egy populáción belül, amelyek a kórokozó genetikai elkülönülésére, vagy egy másik genotípussal történő hibridizációjára utalnak. Ezeken a helyeken már megtalálták az ivaros szaporodásra utaló peritéciumokat, s ez a tény a biológiai védekezés lehetőségét nehezíti. Nemzetközi azonosító törzsek segítségével hazánkban eddig 18-féle VCG-t sikerült identifikálni. Ezek nagy részének kiterjedt hálózata van, amely valószínűsíti azt, hogy a kromoszómáik VC-lókuszaiban csak egy-két allél eltérés van (RADÓCZ, 1997).

MARESI és munkatársai 1995-ben közölt munkájukban a szabadföldi hipovirulens törzsekkel történő kezelések tapasztalatait írták le. Vizsgálataik szerint a kezelések hatékonysága növelhető, ha a hipovirulens törzsek túlsúlyba kerülnek a virulens törzsekhez viszonyítva egy-egy populáción belül. A kéregrák megelőzése céljából ajánlott a hektáronkénti 400 mesterséges fertőzés, ezáltal kiszorulnak a virulens törzsek a kezelt területekről.

2.1.11. Európai *Cryphonectria parasitica* populációk VC csoportokba sorolása

Miután Olaszországban megfigyelték a hipovirulens törzsek megjelenését a szelídgesztenyéken, megkezdődött az európai *C. parasitica* populációk VC csoportokba sorolása. Minderre azért volt szükség, mert a hipovirulens törzsek hatékony felhasználása a védekezésre csak a kompatibilis törzsek között lehetséges. A 17. ábrán jól látható, hogy Európában lényegesen kevesebb VC csoport jelenléte jellemző, mint például Észak-Amerikában.



17. ábra A különböző európai országok *Cryphonectria parasitica* populációinak jellemző VC csoportjai 1-33-ig. Az IC törzsek nem kompatibilisek az európai teszter törzsekkel.

Forrás: (ROBIN és HEINIGER, 2001)

A legátfogóbb képet az európai szelídgesztenye kéregrák VC csoportjairól ROBIN és HEINIGER 2001-ben közölt munkája adja. Kutatásuk eredményeként arra a megállapításra jutottak, hogy az európai *C. parasitica* populációkat 3 nagy csoportra lehet osztani. Az Ibériai félsziget, valamint Délnyugat-Franciaország területén lévő populációkban kizárólagosan megtalálhatók az EU-33 illetve EU-66 törzsek.

A képzeletben meghúzott vonaltól nyugatra haladva az Alpok vonulatáig az EU-1, az EU-2, és az EU-5 törzs az elterjedt. Az Alpoktól keletre található területeken az EU-1, az EU-2 illetve az EU-12 VC törzsek jelenléte az uralkodó. A különböző VC csoportok európai előfordulását összefoglalva a 2. táblázatban láthatjuk. Megállapítható, hogy Franciaország, Olaszország, Horvátország, Szlovénia és Svájc szelídgesztenye állományaiban találták a legtöbb VC törzset. Ez megerősíti ROBIN és HEINIGER 2001-ben közölt eredményét Európa három részre osztásáról a VC csoportokat illetően. Az európai vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy az uralkodó VC csoportok az EU-1, az EU-2, az EU-5 illetve az EU-12.

Ország	VC típusok száma	Főbb VC típusok	Forrás
Albánia	5	EU-1; EU-3; EU-12	LUSHAJ, 1999
Ausztria	15	EU-2	ROBIN és HEINIGER, 2001
Bosznia-Hercegovina	10	EU-1; EU-2; EU-12; EU-13	TRESTIC et al., 2001
Horvátország	18	EU-1; EU-2; EU-12	KRSTIN et al., 2008
Franciaország	40	EU-1; EU-2; EU-5; EU-33	ROBIN et al., 2000
Németország	4	EU-2	SEEMANN et al., 2001
Görögország	4	EU-12	PERLEROU és DIAMANDIS, 2006
Magyarország	18	EU-1; EU-6; EU-12; EU-13	RADÓCZ, 2001
Olaszország	20	EU-1; EU-2; EU-5	CORTESI et al., 1996
Portugália	9	EU-11; EU-12; EU-66	BRAGANÇA et al., 2005
Macedónia	5	EU-12	SOTIROVSKI, 2000
Románia	1	EU-12	RADÓCZ, 2001
Szlovákia	8	EU-12	JUHÁSOVÁ et al., 2010
Szlovénia	15	EU-1; EU-2; EU-12; EU-13	JURC, 2002
Spanyolország	13	EU-1; EU-2; EU-12	MONTENEGRO et al., 2008
Svájc	28	EU-1; EU-2; EU-5	ROBIN és HEINIGER, 2001
Törökország	2	EU-1; EU-12	AKILLI et al., 2009
Bulgária	3	EU-2; EU-10; EU-12	RISTESKI et al., 2013
Csehország	6	EU-1; EU-12; EU-13	JANKOVSKÝ et al., 2010
Ukrajna	2	EU-12; EU-13	RADÓCZ, 2001

2. táblázat Az európai szelídgesztenye állományokban izolált *Cryphonectria parasitica* törzsek főbb VC típusai

2.1.12. Hipovirulens törzsek alkalmazása a kórokozó elleni védekezésben

A hipovirulencia jelenségének megfigyelésekor világossá vált, hogy nagy potenciál rejlik benne, és segítségével egy teljesen új védekezési lehetőség nyílhat a szelídgesztenye kéregrák ellen küzdelemben. A hipovirulens törzsekkel végzett szabadföldi kezelések nagyon hatékonyak bizonyultak több európai országban, de az USA egyes szelídgesztenye állományaiban is sikeresen alkalmazták. A hipovirulens törzsek nagy területen történő alkalmazásának elsődleges célja az, hogy felgyorsítsák a természetes önszabályozó mechanizmus szétterjedését, valamint a viszonylag gyors gyógyulások révén megmentse a már erősen megfertőződött szelídgesztenye állományokat (18. ábra).



18. ábra A hipovirulens törzsekkel végzett kezelések utáni begyógyult sebek

Forrás: (RADÓCZ, 2010)

Jól szemlélteti a kezelések sikerességét, az első, az 1970-es évek végén a Dél-Franciaországban elvégzett oltások hatékonysága. Francia kutatók egy hipovirulens törzs felhasználásával az alábbi eredményeket érték el. A kezelések hatására a beoltott fák több mint 70 %-a meggyógyult, miközben a kezeletlen fák több mint 90 %-a elpusztult. Tehát a kezelések egyrészt megelőzőnek tekinthetők, másrészt viszont gyógyító jellegű beavatkozásoknak is.

A szabadföldi izolációk hatékonyságának értékelése során kiderült, hogy a kezelt fák környezetében a hipovirulens törzsek természetes úton is elkezdtek szétterjedni. A terjedés a kezelést követő 4-5 éven belül 5-10 m sugarú körben volt érzékelhető (GRENTE és BERTHALAY-SAURET, 1978).

Észak-Amerikában a hipovirulens törzsek sikeres alkalmazását egy tényező korlátozta, mégpedig az, hogy egyedülállóan nagyszámú VC csoportok előfordulására kell számítani. Ezen okból kifolyólag széles konvertáló kapacitással rendelkező hipovirulens törzsek alkalmazására volt szükség. Egy olyan „multikonverter” jellegű preparátum használata bizonyult eredményesnek, amelyet az előzetesen szelektált hipovirulens törzsek keverékéből hoztak létre (JAYNES és ELLISTON, 1980).

Amerikai kutatók szerint (HOGAN és GRIFFIN, 2002b) szelídgesztenyével elegyes erdőkben a kéregrák kórokozójának hatékony biológiai kontrollja a hipovirulens törzsek nagyarányú jelenlétével tartható fenn. Lényeges, hogy a hipovirulens nektrózisok az uralkodó szintben lévő (20-30 m) amerikai szelídgesztenyék (*Castanea dentata*) törzsein legyenek jelen. A szelídgesztenyének a kéregrák epidémia utáni lecsökkent elegyaránya az erdőterületeken a hipovirulencia terjedésének korlátozó tényezője, mert a továbbterjedési lánc a kiritkult állományban szétszakadozott (LIU et al., 2002).

Miután egyre több kutatási munka foglalkozott a hipovirulencia és a biológiai növényvédelem kapcsolatával, néhány negatív tulajdonság is kirajzolódott a CHV törzsek felhasználását illetően. TURCHETTI és munkatársai 1996-ban közölt kutatásaiban megfigyelték, hogy néhány hipovirulens törzs instabil, és nem képes a virulenciát teljes mértékben elnyomni. Egy gyógyuló rákosodást kialakító, olasz hipovirulens törzs a későbbi patogenitási tesztben virulensnek bizonyult.

Maga a gyógyulás egy hosszan elnyúló folyamat, amely a szelídgesztenye, a virulens és a hipovirulens kórokozó jelenlétében zajlik le. A kezelés sikeressége nagyban függ attól, hogy mennyire tudjuk a hipovirulens törzseket helyzeti előnybe hozni a virulens törzsekhez képest. Ezért minden eszközzel arra kell törekednünk, hogy a virulens kórokozó terjeszkedését gátoljuk, a hipovirulenciát pedig elterjesszük. Egy nektrózisnál a fertőzött, sztomatikus piknídiumokkal teli kéregrész eltávolításával jelentősen csökkenthetjük a felülfertőzések előfordulását, amely visszavetné a gyógyulási folyamatot. Emellett a mechanikai védekezéshez hasonlóan gátoljuk az újabb virulens nektrózisok megjelenését (VIDÓCZI et al., 2005).

Az eredményes szabadföldi védekezések hatására több országban (USA, Franciaország, Olaszország, Görögország) már ipari méretekben történik a hipovirulens törzseket tartalmazó készítmények előállítása és forgalmazása. Lehetőség van több törzsből álló multikonverter jellegű preparátumok előállítására is (MACDONALD és FULBRIGHT, 1991; GRENTE és BERTHALAY-SAURET, 1978; TURCHETTI, 1982; RADÓCZ et al., 1996).



19. ábra *Cryphonectria parasitica* hipovirulens törzsszel kezelt európai szelídgesztenye

Forrás: (RADÓCZ, 2010)

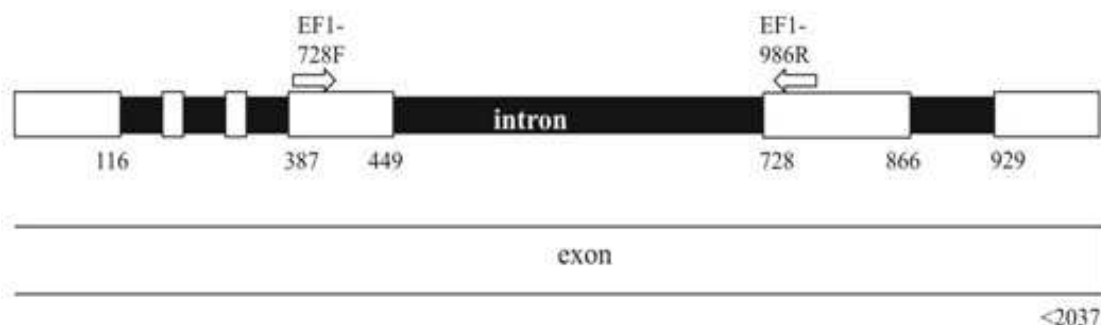
Az eredményes kezelések elérése elképzelhetetlen a gesztenyések megfelelő ápolása, illetve agrotechnikája nélkül. Minden lehetséges eszközzel ki kell aknázni az integrált védelemben rejlő lehetőségeket, mert egy több oldalról megtámogatott védekezés nagy mértékben képes meggátolni a kéregrák pusztítását (19. ábra). Különösen fontos lehet a hipovirulens törzsek alkalmazása az epidémia jelenlegi „front országaiban”, ahol a hipovirulencia természetes megjelenése és szétterjedése csak több évtized múlva lenne várható (HEINIGER és RIGLING, 1994).

2.2. Filogenetikai vizsgálatok jellemzése

2.2.1. Transzlációs elongációs faktor alpha fehérjét kódoló gén (*tef1*)

A fehérjeszintézis során az elongáció folyamatában három faktor vesz részt: az EF-1 α , az EF-1 $\beta\gamma$ és az EF-2. A transzlációs elongációs faktor 1 alfa alegysége (EF-1 α) fehérje a citoszólban található meg. Legfontosabb feladata az eukarióta élőlényeknél és az Archea baktériumoknál, hogy az elongáció energia-igényét fedező GTP-t beköti az aminoacil-tRNS komplexhez, majd katalizálja a GTP-függő aminoacil-tRNS komplex felbomlását, és a riboszóma A helyére irányítsa azokat. A fent említett funkciók miatt a gén aktivitása korrelációban van a sejtnövekedéssel és a proliferációval (MOLDAVE, 1985; SPRINZL, 1994).

MERRICK 1992-ben közölt munkájában megállapította, hogy az EF-1 α fehérje további feladata a megfelelő tRNS-nek a megfelelő mRNS-el való összekapcsolása, valamint az átírás sebességének és megbízhatóságának felügyelete. A filogenetikai kutatásokhoz való felhasználását az teszi lehetővé (20. ábra), hogy az EF-1 α fehérje, és így a fehérjét kódoló gén (*tef1*) is erősen konzervatív az élővilágban (CHO et al., 1995; MOREIRA et al., 1999).



20. ábra A *tef1* gén sematikus vázlata, fehér színnel a kódoló, fekete színnel a nem kódoló régiók láthatóak

(Forrás: DRUZHININA és KUBICEK, 2005)

A *tef1* gén megtalálható minden élőlényben, és legnagyobb előnye ITS-szekvenciákkal szemben (3. táblázat), hogy a gén csak egy kópiában van jelen a genomban (BALDAUF és DOOLITTLE, 1997).

Számos kutató használta fel filogenetikai vizsgálatai során a fajok közötti és fajon belüli rendszertani kapcsolatok felderítésére a *tef1* génszakaszt. ROGER és munkatársai 1999-ben különböző gombafajoknál (*Mucor racemosus*, *Podospora anserina*) alkalmazta azt.

DRUZHININA és munkatársai 2006-ban *Trichoderma* fajok identifikálásához használták fel a *tef1* génszakaszt. SAMUELS és munkatársai 2002-ben a *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* és *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, filogenetikai alapon történő elkülönítésére alkalmazták.

A génszakaszt számos kutatás során használták fel, és megállapították, hogy a *tef1* gén alkalmazása nem megfelelő a magasabbrendű filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára a gombák körében. A *tef1* alkalmazásának hátránya, hogy a fehérjét kódoló gén rövidebb, mint más filogenetikai markerként használt gének. Mintegy 2 kb hosszúságú, intront és exont egyaránt tartalmazó szakasz (TANABE et al., 2004).

Számos korábbi molekuláris biológiai vizsgálat alapján a *tef1* negyedik és ötödik exonja közötti fragmentum (nagy intron) szekvenciája sikeresen használható gombáknál mind a fajok közötti, mind a fajon belüli kapcsolatok vizsgálatára (ROGER et al., 1999).

	tef1	ITS1
Kópiaszám	1	>1000
Felhasználása	Fajok közötti kapcsolatok	Fajon belüli kapcsolatok
Méret	350 bp.	600 bp.
Variabilitás	alacsony	magas

3. táblázat A vizsgálatok során felhasznált génszakaszok összehasonlítása

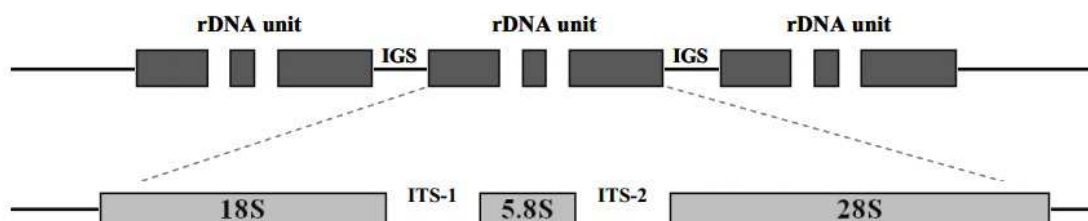
2.2.2. Az ITS-régió a fonalas gombákban

Az rRNS molekulát kódoló gének általános elterjedését a filogenetikai célú vizsgálatokban a génszakasz több előnyös tulajdonsága is elősegítette. A gén minden sejt életformában előfordul. Mivel a sejt működésében a funkciója nélkülözhetetlen, ezért relatíve kicsi a mutációs rátája, evolúciósan igen konzervatív. Viszont a génen belül több, eltérő fokú variabilitást mutató régió is van, melyek elemzése révén különböző szintű illetve mélységű filogenetikai felbontás válik lehetővé (WOESE, 1987).

A filogenetikai vizsgálatokhoz már hosszú ideje a legszélesebb körben használt konzervatív régiók a sejtmagban és a mitokondriumban található riboszomális rRNS szekvenciákat kódoló gének (rDNS) (MONCALVO et al., 2002; AVISE, 2004).

Ezen génszakaszok fontos jellemzője az, hogy akár több ezer kópiában is jelen lehetnek a sejtekben. Ez arra vezethető vissza, hogy a riboszómákon a transzláció, és az intenzív sejt folyamatok során a transzláció folyamatos működését a riboszómák nagy száma biztosítja. A kellő riboszóma mennyiség csak úgy érhető el, hogy több lókuszt, és több ezer kópia áll rendelkezésre a folyamatos szintézishez. A fent említett folyamatok miatt az ITS génszakaszok száma is magas, és ezek a lókuszok egymás után, tandem elrendeződésben találhatóak meg a DNS szálon (HILLIS és DIXON, 1991; ÁLVAREZ és WENDEL, 2003).

A riboszómák képződéséhez szükséges lókuszok 7 szakaszból állnak (21. ábra). Minden lókuszt egy nem átíródó IGS (Intergenic Spacer) szakasszal kezdődik, a következő szakasz az ETS (External Transcribed Spacer), majd azt követi 3 génszakasz: a 18S, az 5,8S, és a (25-28)S. Közöttük találhatóak meg az ITS1, illetve az ITS2 (Internal Transcribed Spacer) szakaszok. Az ETS és az ITS szakaszok átíródnak, de a pre-mRNS érése során kivágásra kerülnek, nem kódoló szakaszok (JORGENSEN és CLUSTER, 1988).



21. ábra Az ITS génszakaszt tartalmazó lókuszt sematikus vázlata, sötét színnel a kódoló, fehér színnel a nem kódoló régiók láthatóak

Forrás: (REDDY et al., 2005)

A fentiekből következően a lókuszt kódoló szakaszai a 18S (vagy kis alegységet, Small Subunit, SSU), az 5,8S, valamint a (25-28)S-t (nagy alegységet, Large Subunit, LSU) riboszóma alegységet kódoló gének. A *Basidiomycota* gombáknál és néhány tömlősgombánál a lókuszt elválasztó IGS régiók között megtalálható egy 5S riboszóma alegységet kódoló gén is (GERBI, 1985; HIBBET et al., 1995).

A különböző génszakaszok variabilitása meghatározza azok filogenetikai célú felhasználását. A kódoló 18S, 5,8S 25-28S illetve 5S gének variabilitása kisebb, mint a nem-kódoló szakaszoké. Az ITS1 és ITS2 az SSU, 5,8S és LSU alegységekkel egyetlen transzkripciót képeznek, mivel közöttük helyezkednek el. Az IGS1 és IGS2 régiók az LSU, (egyes fajoknál 5S) és SSU alegységek között találhatóak (GUNDERSON et al., 1987; LANE et al., 1985).

A nagy variabilitású, nem kódoló IGS és ITS génszakaszok a taxonok közötti rokonsági viszonyok feltárásához: osztály, család, nemzetség, faj kapcsolatok modellezésére a legalkalmasabbak, ezen génszakaszokat számos kutató alkalmazta munkája során. Az IGS génszakaszok amplifikálásának határt szab az azok relatív kis mérete (MONCALVO et al., 1995; NICHOLSON, 1995; PINE et al., 1999; BINDER és HIBBETT, 2002; JEEWON et al., 2009; IRINYI et al., 2009; NAEIMI et al., 2011).

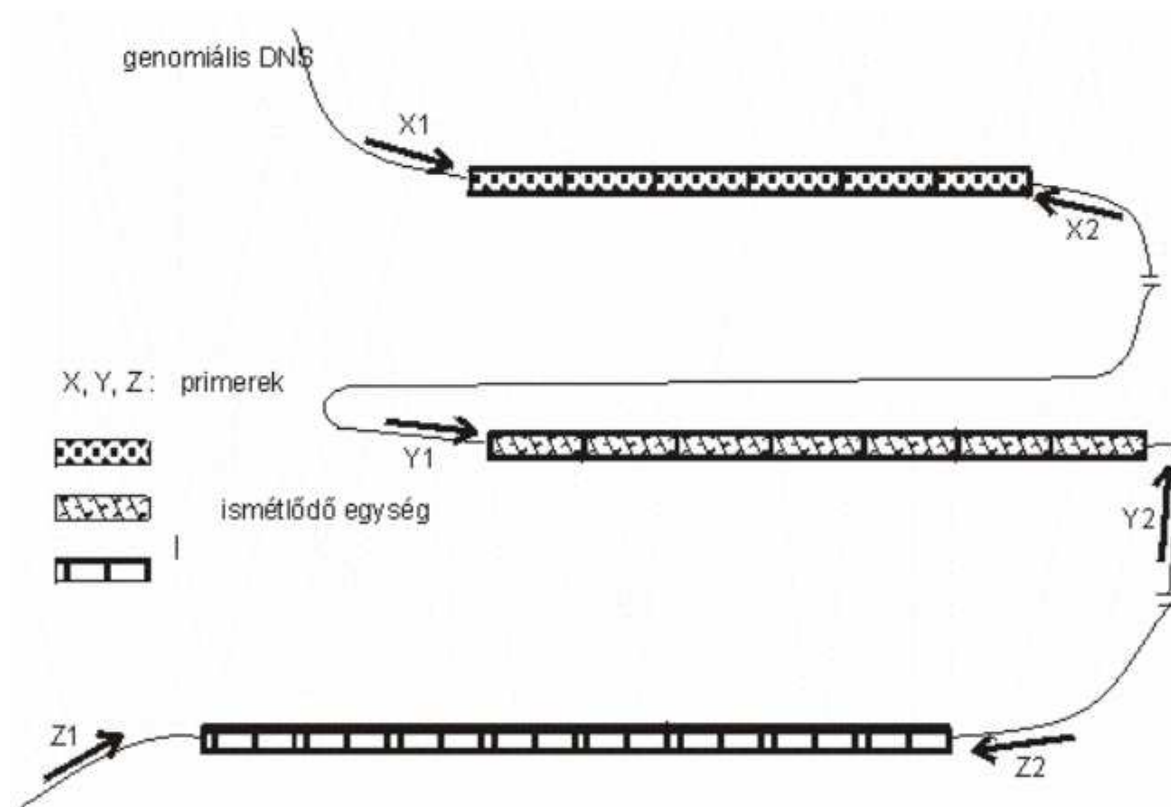
A kódoló régiókra (LSU és SSU) erős szelekció hat, ezáltal a mutációk valószínűsége kicsi, a variabilitás alacsony, a génszakaszok evolúciósan erősen konzerváltak. Ezen tulajdonság lehetővé teszi a kódoló régiók alkalmazását a távolabbi taxonok (osztály, rend, család, nemzetség) rokonsági viszonyainak megállapítására (HILLIS és DIXON, 1991).

A filogenetikai vizsgálatok során a kódoló régiók közül a fonális gombáknál leggyakrabban az LSU gént alkalmazzák. A vizsgálatok során rendszerint a gén 5' végének első 600-900 bázisból álló részét használják, mert a DNS-szekvencia variabilitás itt nagyobb, és így több filogenetikai adatot tartalmaz, mint a gén többi, gyakorlatilag invariábilis része (WHITE et al., 1990; RIETHMÜLLER et al., 2002).

A nem-kódoló régiókra (ITS és IGS) kismértékű szelekció hat, ezáltal a mutációk valószínűsége nagy, a variabilitás nagy, a génszakaszok evolúciósan erősen változékonnyak. Ezen tulajdonság lehetővé teszi a nem-kódoló régiók alkalmazását a többségében alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok vizsgálatánál, például közeli rokon fajok vagy populációk egymástól való elkülönítéséhez. Az ITS génszakasz amplifikálásához az ITS1 primer és az ITS4 primer felhasználása általános (BALDWIN, 1992; YAN et al., 1995; MAI és COLEMAN, 1997; WEEKERS et al., 2001; OLIVERIO et al., 2002; CHEN et al., 2002; GULYÁS et al., 2005; OCHIENG et al., 2007; DEVEY et al., 2008).

2.2.3. Mikroszatellitek használata a filogenetikai analízisekben

Az eukarióta élőlények genomi vizsgálata során megfigyelték, hogy a nem kódoló régiókban egymás után következő, ismétlődő szekvenciák is találhatóak. Ezeket a néhány száz bázisból álló szekvenciákat szatellit DNS-nek nevezik (22. ábra). A szatellitek sajátos tulajdonsága az, hogy a cézium-klorid (CsCl) jelenlétében történő gradiens centrifugálás során ezek a DNS szakaszok egy jól elkülönülő csúcsként (szatellitként) jelennek meg (PARKER et al., 1998).



22. ábra Mikroszatellit markerek vázlatos felépítése

(FÉSÜS et al., 2000; BÁTORINÉ KUSZA, 2006)

A mikroszatelliteket, melyeket egyszerű szekvencia ismétlődésnek (SSR - Simple Sequence Repeat) vagy rövid tandem ismétlődésnek (STR - Short Tandem Repeat) is hívnak, széles körben használják filogenetikai és populációgenetikai vizsgálatokra, mivel nagy számban találhatóak a genomban, és könnyen amplifikálhatóak specifikus primerekkel, továbbá nincsenek szelekciós nyomás alatt (JARNE és LAGODA, 1996; TAUTZ, 1993). A mikroszatellitek általánosan elterjedtek mind a prokarióta, mind az eukarióta genomban (ZANE et al., 2002).

A mikroszatellitekre jellemző a magas inter és intraspecifikus polimorfizmus, különösen azokban az esetekben, amikor az ismétlődések száma 10 vagy több. A mikroszatellitek tandem módon ismétlődő (akár 100-szor), 1-10 bázispár hosszúságú specifikus DNS szekvenciák (LAI és SUN, 2003; LEVINSON és GUTMAN, 1987). A mikroszatellitek hosszúsága nagy polimorfizmust mutat az egyes egyedek között, mely a különböző allélokon található ismétlődő egységek eltérő ismétlődés számának tudható be (SELKOE és TOONEN, 2006).

Mutációs rátájuk gamétánként és generációnként 10^6 és 10^3 között változik szervezettől és lokusztól függően (WEBER és WONG, 1993; SCHUG et al. 1997).

A mikroszatelliteket a gombáknál széles körben alkalmazzák genetikai vizsgálatokra. A mikroszatellitek nagy felbontású genetikai térképek elkészítésére alkalmas markerek (HEARNE et al., 1992).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgálati területek bemutatása

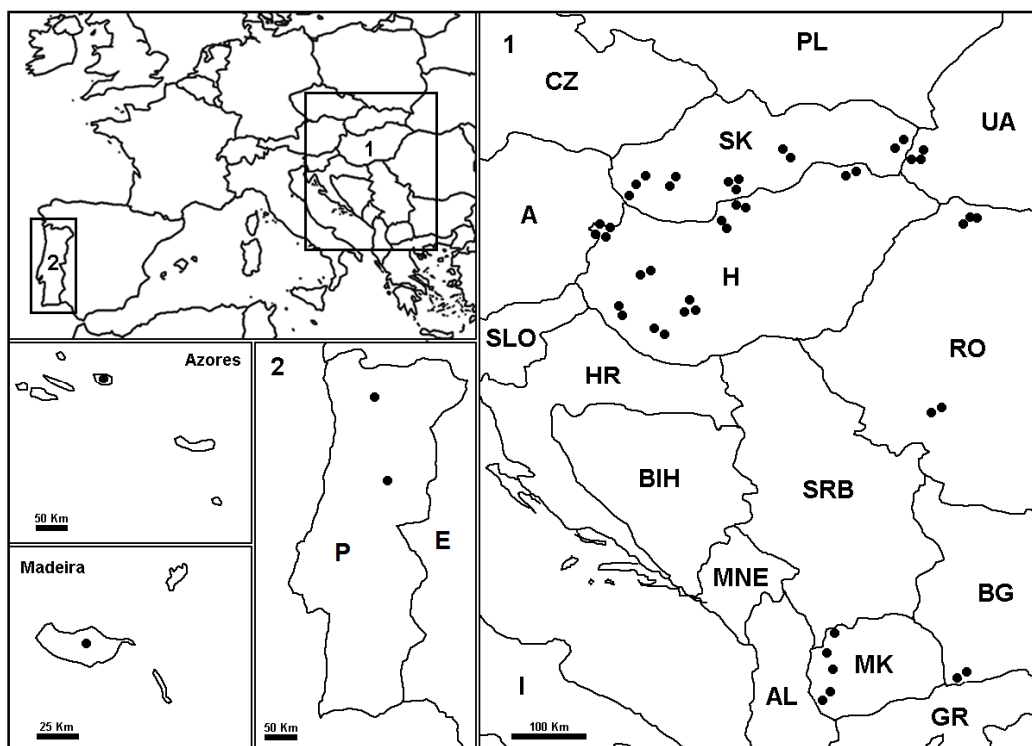
Kutatásunk első lépéseként a vizsgálati területek kerültek kiválasztásra. A vizsgálatokba bevont gesztenye termőterületek kiválasztásakor szem előtt tartottuk azt, hogy azok minél jobban reprezentálják a Kárpát-medence különböző *C. parasitica* szubpopulációit. Bevontunk több olyan területet is, amelyet már korábban vizsgáltak Debreceni Egyetem Növényvédelmi Intézet más kutatói is. A régebbi területek mellé új kutatási területek is bekerültek. Mivel a *C. parasitica* az EPPO besorolása szerint zárlati károsító, amely az EPPO országainak területén, így Magyarországon is megtalálható, behozatala engedélyköteles. A 37/2003. (IV. 4.) FVM rendelet 5. § (2) értelmében behozatali forgalomban a rendelet 5. számú mellékletében meghatározott vizsgálatköteles árut csak a mellékletben meghatározott különleges előírás betartásával lehet Magyarországra behozni. A rendelet szerint a környező országokból behozott mintákra engedélyt kellett kérnünk, és a vizsgálatok számára helyet adó laborokat és eszközöket ellenőrzésnek kellett alávetni, melynek jegyzőkönyve a MELLÉKLETEK című fejezetben megtalálható. A laborok engedélyezését évente meg kellett újítani, amelyre 2011-ben és 2012-ben is sor került.



23. ábra A minták GPS koordinátáinak rögzítése Modra (Szlovákia) melletti szelídgesztenye ültetvényen

(Fotó: Tarcali Gábor)

A mintagyűjtés megkezdése előtt a fent említett rendelet értelmében minden mintagyűjtési helyszín felkeresése előtt megkértük a hatósági engedélyt az akkori Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóságtól. A kérelmek elbírálását követően az Igazgatóság kiállította számunkra a behozatali engedélyeket, amelyek a MELLÉKLETEK című fejezetben csatolva megtalálhatóak. A területeket a mintagyűjtés alkalmával pontosan felmértük egy kézi GPS készülék segítségével, és külön rögzítettük a GPS koordinátáit azoknak a fáknak, amelyekről kéregmintát vettünk (23. ábra). Az összefoglaló táblázat a MELLÉKLETEK című fejezetben megtalálható. A GPS koordináták segítségével pontosan meghatározható a különböző szelídgesztenye populációk földrajzi távolsága.



24. ábra A vizsgálatba bevont minták származási helye

Munkánk során 95 darab *C. parasitica* izolátumot vizsgáltunk meg. Magyarország területéről 31, Szlovákiából 17, Ukrajnából 10, Romániából 11, Macedóniából 10, Bulgáriából 2, Görögországból 9, és Portugáliából 5 izolátum szerepelt a kutatásokban. A Portugáliából származó mintákat Helena Bragança, a Görögországból származókat Charikleia Perlerou bocsájtotta rendelkezésünkre. A többi országból származó, a vizsgálatba bevont mintákat a kutatásban résztvevő munkatársakkal közösen gyűjtöttük be (24. ábra).

3.2. A kéregminták begyűjtése

A vizsgálatba bevont területek bejárása közben képet kaptunk a gesztenye állomány fertőzöttségéről és általános egészségi állapotáról. Ha az adott terület már korábban is volt vizsgálva, akkor összehasonlítottuk a fertőzöttség mértékét a régebben tapasztaltakkal. A vizsgálati területek bejárása után kijelöltük a mintavételt szolgáltató beteg fákat. Fontos volt, hogy a begyűjtött minták minél pontosabban jellemezzék a területen található *C. parasitica* populációt. A mintavevő kés segítségével 3-5 cm² nagyságú darabokat hasítottunk le a fa kérgéről (25. ábra). Korábbi kutatások tapasztalataiból kiindulva igyekeztünk úgy venni a mintákat, hogy a kórokozó által elpusztított kéregrészt és a még egészséges élő szövetek határán legyen a bevágás. Itt később nagyobb sikerrel izolálható a kórokozó. Egy fáról több mintát is vettünk, és a begyűjtött mintákat egy előre felcímkézett mintazacskóba tettük.

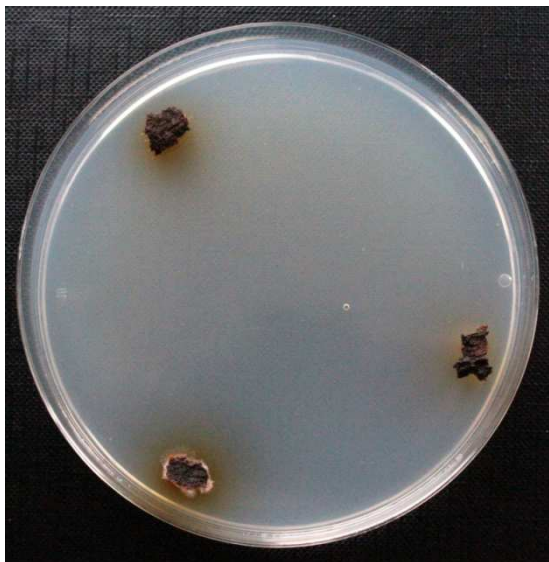


25. ábra A kéregminták begyűjtése Szerednje (Ukrajna) mellett található gesztenyéből
(Fotó: Tarcali Gábor)

A zacskókon feltűntettük a mintahely nevét, a minta rövidített nevét és a gyűjtés pontos dátumát. Ukrajnában és Romániában a szelídgesztenye fákon kívül a kórokozót megtaláltuk kocsánytalan tölgyön (*Quercus petraea*) is. Ezeket a mintákat a későbbi keveredés elkerülése miatt külön tároltuk, és a címkéken is jelöltük a gazdanövényt. A minta rövidített neve a laboratóriumi vizsgálatok nyilvántartásában is nagy segítséget nyújtott. Miután az adott fával végeztünk, alkohollal fertőtlenítettük a mintavevő kést. A begyűjtött mintákat egy hűtőtáskában hoztuk be az előkészítő laboratóriumba.

3.3. A kéregminták laboratóriumi feldolgoása

A begyűjtött mintákat a feldolgozás megkezdéséig hűtőben tároltuk. A laboratóriumi vizsgálatok a táptalaj elkészítésével kezdődtek. A mintákat PDA (potato dextrose agar) táptalajon növesztettük. A táptalaj elkészítéséhez a gyártó által megadott recepturát használtuk fel. 500 ml desztillált vízhez 20 g PDA (Scharlau) táptalajt kellett keverni. Ezután a táptalajt autokláv segítségével sterilizáltuk. A kéregmintákat az előkészítés során 2-3 percig 70%-os etanolban fertőtlenítettük, majd desztillált vízben lemostuk a mintákról. A fertőtlenítés alkalmazásával sikeresen megakadályoztuk a baktériumok okozta befertőződést (26. ábra).



26. ábra A terepi munkák során begyűjtött kéregminták felhasználása a *Cryphonectria parasitica* izolálására
(Fotó: Görcsös Gábor)

Az előre megcímkézett Petri csészékbe kiöntött táptalajra a kéregmintákból kis darabkákat helyeztünk, és ezt követően a mintákat termosztátba tettük, ahol egy hétig állandó 27 °C -os hőmérsékleten növesztettük. Mindennap ellenőriztük a fertőzött kéregmintákat, majd miután megjelent a *C. parasitica* a táptalajon, újra átoltottuk azokat, és a termosztátban neveltük őket tovább. 10 nap elteltével a gomba teljesen benőtte a Petri csészéket, és alkalmassá vált a folyékony táptalajra való átoltásra (27. ábra).

A VCG vizsgálatok során a PDA táptalajhoz 50 mg/l brómkrezol zöld indikátort is hozzáadtunk. Az indikátor használata azért előnyös, mert a szegély zóna az egymással vegetatív inkompatibilis tenyészetek esetében sokkal markánsabban kirajzolódik, mivel a

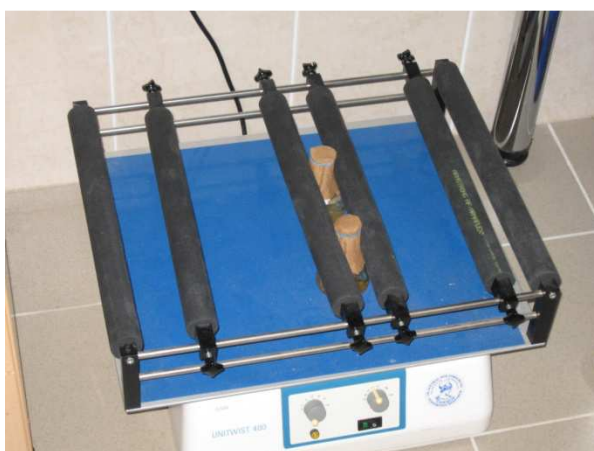
brómkrezol zöld indikátor a táptalaj savasodásának hatására színváltozással reagál, kivilágásodik. A táptalaj azonban az elhalt hifák esetében nem produkálja a színváltozást (POWELL, 1995).



27. ábra *Cryphonectria parasitica* tenyészet PDA táptalajon növesztve
(Fotó: Görcsös Gábor)

A folyékony MEX (malt extract) táptalaj elkészítéséhez a gyártó által megadott recepturát használtuk fel. 500 ml desztillált vízhez 20 g MEX táptalajt kellett keverni. Ezután a táptalajt autokláv segítségével sterilizáltuk. A folyékony MEX (Scharlau) táptalajt Erlenmeyer lombikokba öntöttük szét. Egy Erlenmeyer lombikba 50 ml táptalajt öntöttünk.

A szilárd PDA táptalajról steril 5 ml desztillált víz segítségével lemostuk a gombát, majd a lombikba pipettáztuk a folyadékot. Ezután az Erlenmeyer lombikokat rázógépre helyeztük, és 74 órán keresztül szobahőmérsékleten ráztuk 125 rpm sebességen (28. ábra).

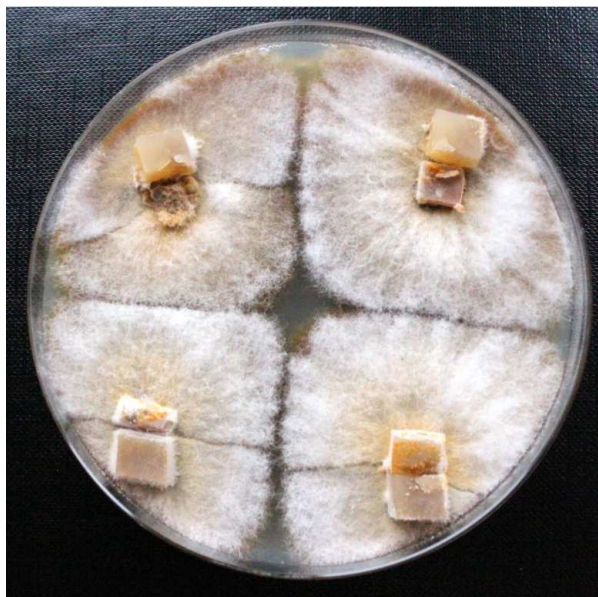


28. ábra Folyékony táptalajon növesztett *Cryphonectria parasitica* izolátumok a rázógépen
(Fotó: Görcsös Gábor)

3.4. A VCG vizsgálatok kivitelezése

A kutatásainkba bevont minták molekuláris biológiai vizsgálatait megelőzően elvégeztük a VC csoportokba való besorolást. A tesztvizsgálatok során POWELL 1995-ben közölt receptúráját használtuk fel: 5 dl desztillált vízhez először hozzákevertünk 20 g előre kevert PDA komponenst, majd kiegészítésként hozzáadtunk 50 mg metionint, 0,5 mg biotint, 3,5 g maláta kivonatot, 1 g élesztő extraktumot, 0,4 g tannin savat, 1 mg tiamint valamint 25 mg brómkrezol zöld indikátort. A PDA táptalajhoz kevert kiegészítő anyagok szükségesek az inkompatibilitást jelző határvonal (barrier) kialakulásának pontosabb megfigyeléséhez. Az indikátor használata azért előnyös, mert a szegély zóna az egymással vegetatív inkompatibilis tenyészetek esetében sokkal markánsabban kirajzolódik, mivel a brómkrezol zöld indikátor a táptalaj savasodásának hatására kivilágosodó színváltozással reagál. A táptalaj azonban az elhalt hifák esetében nem produkálja a színváltozást.

Mindezek után a táptalaj főzését egy RAIPA típusú nedves autokláv segítségével végeztük el. Az autokláv az alábbi program szerint végezte el a sterilizálást: 12 °C-on, 1,1 bar nyomás mellett 20 percen sterilizálási idő alatt. A steril táptalajt ezután Petri csészékbe töltöttük ki, ezekre 10x10 mm nagyságú gomba micélium szöveteket tartalmazó tápkockákat helyeztünk el. Egyidőben egy Petri csészében 4 pár tesztet végeztünk el a 29. ábra szerint.



29. ábra A *Cryphonectria parasitica* izolátumok VC tesztörzsekkel történő párosítás, a bal felső párosításban egymással vegetative kompatibilis izolátumok láthatók

(Fotó: Görcsös Gábor)

A mintákat Heratherm IMH 180 S típusú fűthető-, hűthető mikrobiológiai inkubátorba helyeztük. Az izolátumokat 25 °C-on növesztettük, majd a párosítást követő második héten végeztük el a tesztek kiértékelését.

A begyűjtött nagyszámú kéregminta esetében kivitelezhetetlen lett volna minden mintát a tesztörzsekkel összepárosítani, ezért először az adott termőhelyekről származó mintákat párosítottuk egymáshoz. Ha az adott termőhelyről származó minták vegetatív kompatibilitást mutattak egymással, akkor azokat egy csoportnak tekintettük. Az elvégzett tesztek eredményét Excel táblázatban rögzítettük, ezáltal jól áttekinthetővé váltak a különböző kompatibilis és inkompatibilis csoportok. Így azok a minták egy egységet képezve az EU tesztörzsekkel történő párosítás során már csak minden második mintát vizsgáltunk a csoportból. A vegetatív kompatibilitási vizsgálatot minden esetben elvégeztük a kocsánytalan tölgyről származó minták esetében is.

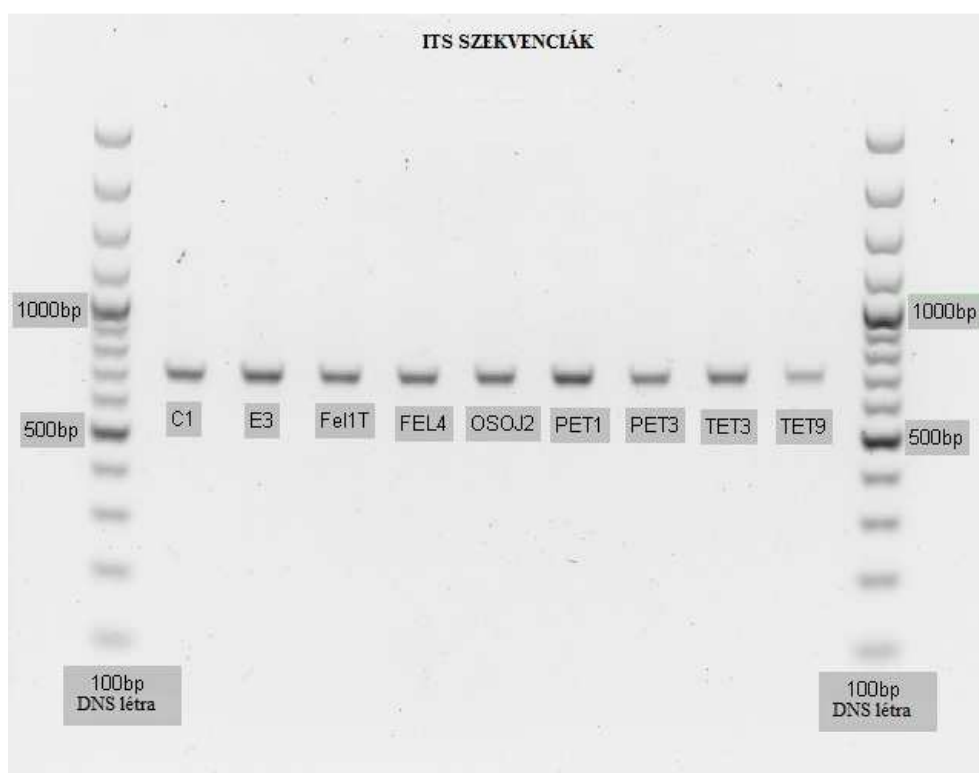
A tesztek elvégzéséhez szükséges (EU 1-31) tesztörzseket a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Intézet, valamint a Nyitrai Erdészeti- és Ökológiai Kutató Intézet bocsátotta rendelkezésünkre. A vizsgálatok első lépéseként elvégeztük a különböző mintagyűjtési helyek populációin belüli kompatibilitási teszteket. Ezt követően minden mintagyűjtési helyről 6-6 mintát párosítottunk az EU teszt törzsekkel.

A kapott eredményeket Excel táblázatban összegeztük, ezáltal áttekinthetővé vált a különböző VC csoportok megjelenése az adott termőhelyen. A különböző termőhelyek VC csoportjainak arányait illetve százalékos megoszlását kördiagram segítségével szemléltettük. Ezt követően a kapott eredményeket összevetettük a korábbi vizsgálatok eredményével, és összegeztük az esetlegesen bekövetkezett változásokat.

3.5. Polimeráz-láncreakción (PCR) alapuló vizsgálat az ITS és *tef1* markerek esetében

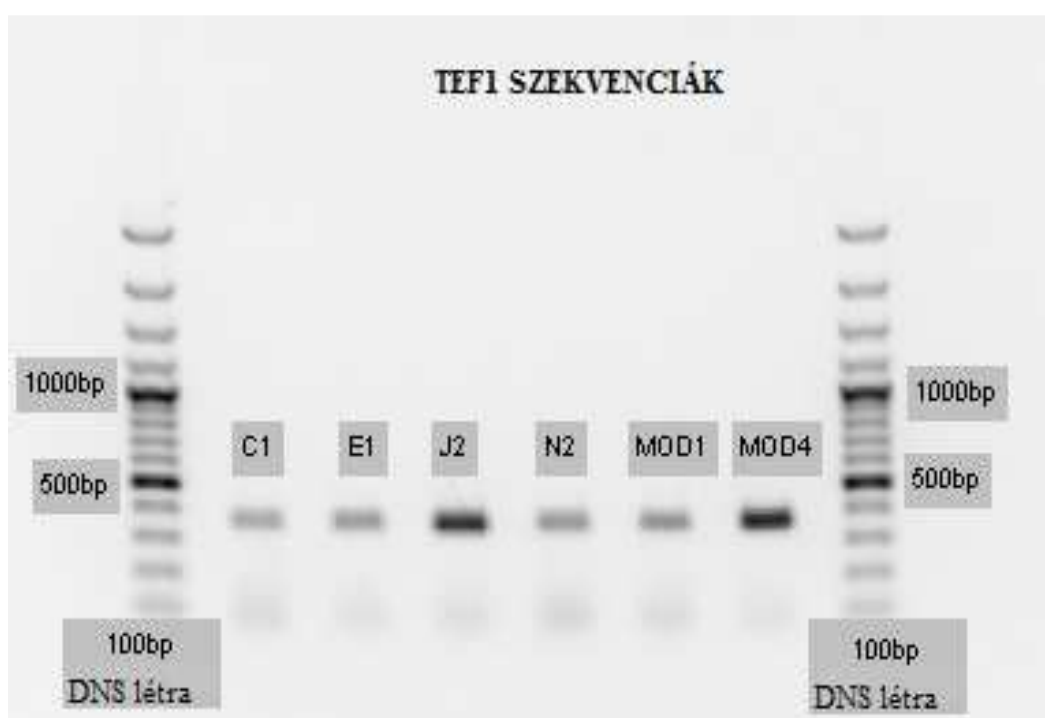
A PCR-t 50 µl térfogatban végeztem el, amely a következő összetevőket tartalmazta: 25 µl 2X PCR Master Mix (Fermentas, K0171), 2 µl genomi DNS (0,5–1 µg), 2–2 µl forward és reverse primer (10 pmol/µl), 19 µl steril, nukleázmentes víz (Fermentas, #R0581). A PCR körülményei az egyes fragmentumok felszaporítása során a következők voltak:

Az ITS-fragmentum felszaporításához az alábbi primerpárt alkalmaztuk: SR6R: 5'-AAG TAG AAG TCG TAA CAA GG-3' (SSU) 23 bp; az LR1: 5'-GGT TGG TTT CTT TTC CT-3' (LSU) 17 bp (WHITE et al., 1990). A reakció körülményeit az alábbiak szerint állítottuk be: első lépésként kezdeti denaturálás történt 95 °C-on 3 percen át, amelyet 5 cikluson keresztül további denaturálás követett 95 °C-on 1 percig. Majd az annelláció 50 °C-on 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on 1 percen át. Ezt követte 25 cikluson keresztül a denaturálás 95 °C-on 1 percig, majd az annelláció 50 °C-on 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on 1 percen keresztül. Utoljára egy 15 perces polimerizáció következett 72 °C-on (30. ábra).



30. ábra A PCR során felszaporított ITS-szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés)
(Fotó: Görcsös Gábor)

A transzlációs elongációs faktor fragmentumának felszaporításához a következő primerpárt használtuk: EF1-728F: 5'- CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG -3' 20 bp; az EF1-986R: 5'- TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC -3' 20 bp (DRUZHININA és KUBICEK, 2005). A reakció körülményeit az alábbiak szerint állítottuk be: első lépésként kezdeti denaturálás történt 95 °C-on 3 percen át, amelyet 5 cikluson keresztül további denaturálás követett 95 °C-on 1 percig, majd az annelláció 59 °C-on 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on 1 percen át. Ezt követte 25 cikluson keresztül a denaturálás 95 °C-on 1 percig, majd az annelláció 59 °C-on 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on 1 percen keresztül. Legutoljára egy 15 perces polimerizáció következett 72 °C-on (31. ábra).



31. ábra A PCR során felszaporított *tef1* szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés)

(Fotó: Görcsös Gábor)

A PCR-t az MWG Biotech Inc. Primus 25 (Milton Keynes, UK) típusú készülékével végeztük el. A felszaporított és tisztított PCR-termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany cég végezte térítéssel megbízással. Az általuk alkalmazott szekvenálás a Sanger-féle módszeren alapszik (SANGER et al., 1977), és az ABI cég által fejlesztett gépekkel végzik. A szekvenálás megbízhatóságát az ISO nemzetközi minőségbiztosítási szabvány (DIN EN ISO 9001:2000) garantálja.

3.6. A mikroszatellitek amplifikációjának részletei

Munkánk során 6 különböző mikroszatellitet választottunk ki és vontunk be a vizsgálatokba, melyeket előzőleg BREUILLIN et al. (2006) és KUBISIAK et al. (2007) írtak le (4. táblázat).

Lókuszt	Ismétlődő szakaszok	Allélszám	Allélok mérete (bp)
CPSI_085	(AC) ₁₁	5	248-252
CPSI_102	(ACG) ₁₂	6	270-282
CPSI_108	(AAG) ₁₀	5	221-265
CPG_6	(GA) ₁₇	6	263-289
CPE_5	(AAC) ₁₁	8	256-265
CPSI_014	(AAG) ₉	8	263-299

4. táblázat A vizsgálatba bevont *Cryphonectria parasitica* mikroszatellitek fontosabb paraméterei

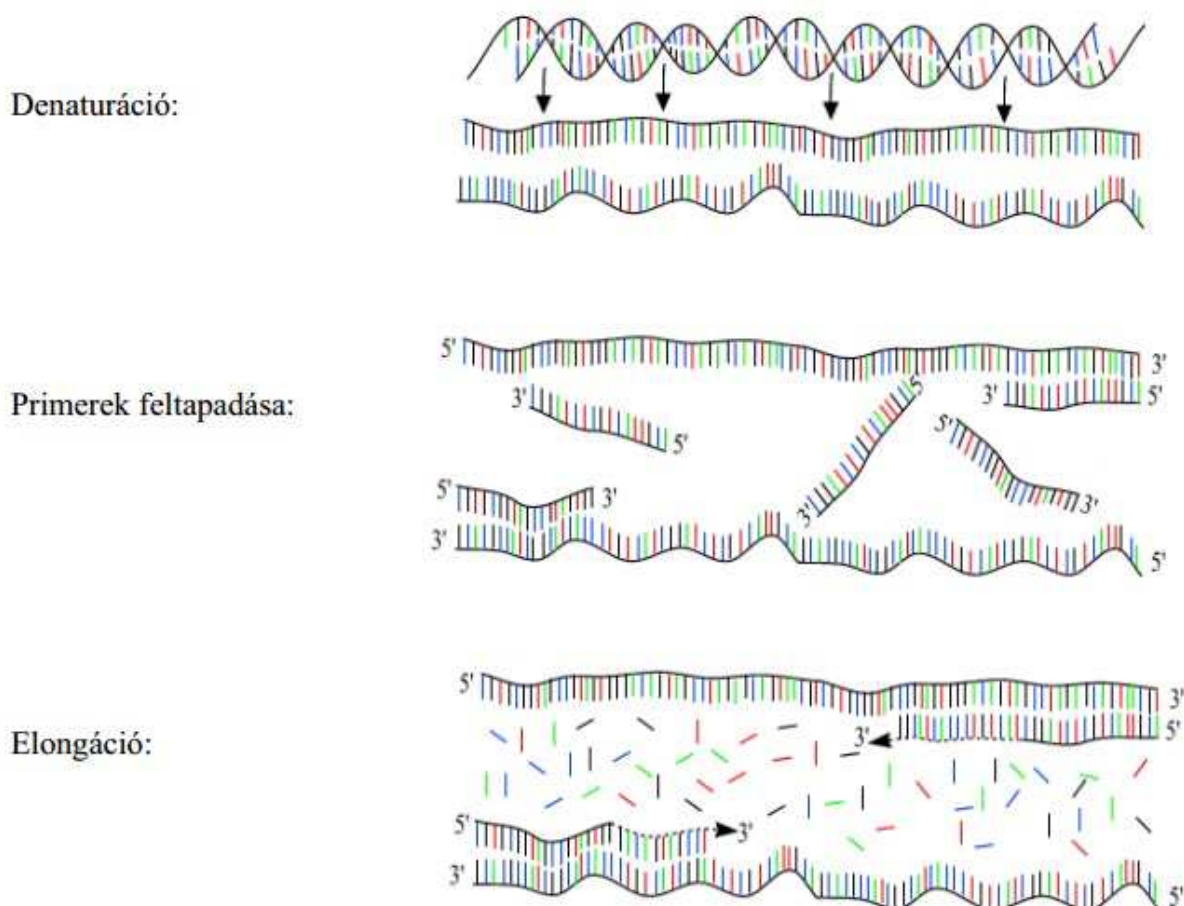
Az amplifikációt 50 µl végtérfogaton hajtottuk végre, amely tartalmazott 25 µl 2X PCR Master Mix-et (ImmoMix, Bioline, 25020), 40-40 pmol primert, 20-40 ng DNS-t. Az oldatot nukleáz mentes vízzel egészítettük ki a kívánt térfogatra. A mikroszatelliteket Primus (MWG Biotech) thermocycler használatával amplifikáltuk.

Lókuszt	Primerek	Annelációs hőmérséklet
CPSI_085	F-AGGCCTGCTTCTTTTGGAT R-CGGGTCTATATGGTGGCTTC	55 °C
CPSI_102	F-GCTCCGAGGACTTTGATGAG R-TCATCACCACCAACACCATT	55 °C
CPSI_108	F-CGGAACTACCTGCTCTTTGC R-GCGATCCGCATTCCTGTAT	56 °C
CPG_6	F-ATCATCACGACGCAATGGTA R-TCCGGGCATTTCAGCAMAT	53 °C
CPE_5	F-TGTCAACAACGGTCAACACC R-CGGAGAGGAGAACTCTGAGAC	56 °C
CPSI_014	F-TCGGAGGCTTTATTGTCGTT R-TGGGTGTATTTGCTCGGTAA	53 °C

5. táblázat A vizsgálatba bevont lókusztok felszaporításához használt primerpárok és annelációs hőmérsékleti értékek

Az alábbi PCR ciklust alkalmaztuk (32.ábra) az amplifikáció során: 3 perc iniciáló denaturáció 95 °C-on, ezután 5 ciklus következett 95 °C-on, amelyek 1 percesek, majd 1 perc annealáció 50 °C-on, 1 perc polimerizáció 72 °C-on. A további 25 ciklus denaturációs hőmérsékletét 90 °C-ra csökkentettük, az annealáció hőmérséklete pedig a lókuszoktól függően 53-56 °C között változott. A többi beállítás az első 5 ciklusával megegyezett. A záró polimerizáció 72 °C-on történt 15 percig (5. táblázat).

A fragment analízist Origins elektroforézis készülék segítségével (Elchrom Scientific AG) végeztük el. Minden PCR terméket először Spreadex_ EL 500 gélen (Elchrom Scientific AG) futtattuk 240 percig 55 °C -on. A DNS sávok élessége érdekében 1 X TAE buffert használtuk, amelyet a gyártó mellékel a felhasznált gélhez. A gél EtBr (Sigma, USA) segítségével festettük meg 45 percig, majd ezt követően BIO-RAD Gél dokumentációs rendszer használatával UV fényben ($\lambda = 250 \text{ nm}$) dokumentáltuk.

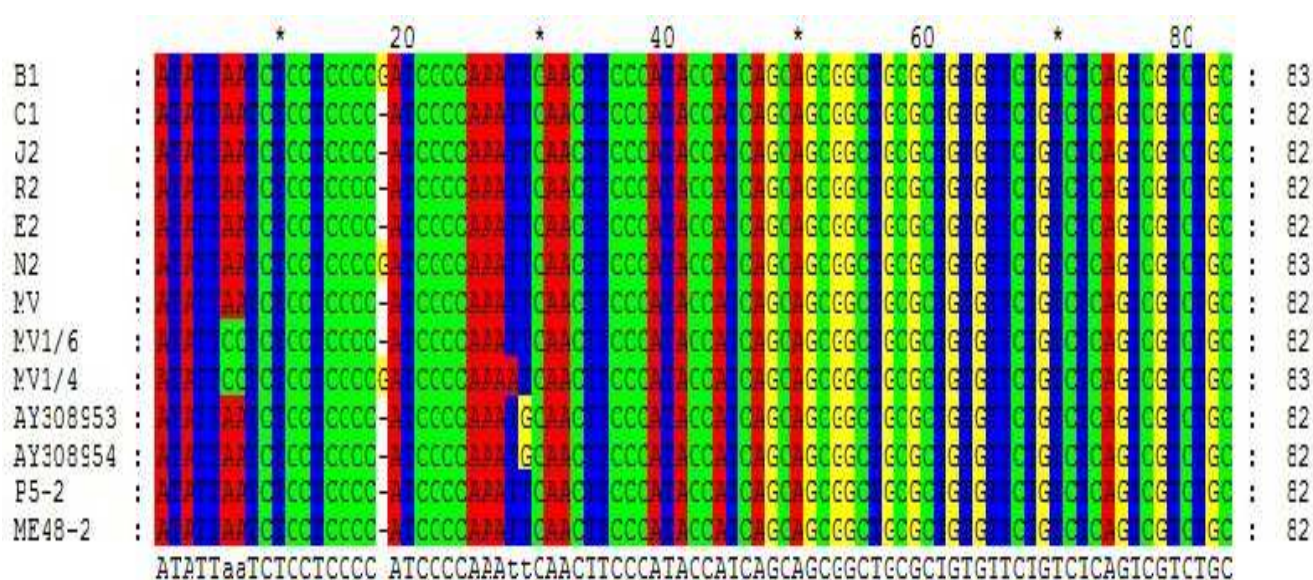


32. ábra A PCR ciklus vázlatos folyamata
(BÁTORINÉ KUSZA, 2006)

3.7. A filogenetikai elemzésekhez felhasznált programok

ClustalX

A filogenetikai elemzések első lépéseként a DNS szekvenciákat ClustalX program segítségével illesztettük össze (33. ábra). A megfelelő szekvenciaillesztés elengedhetetlenül fontos a legalkalmasabb törzsfa megtalálásának szempontjából. A program elsődlegesen egy többszörös szekvenciarendező feladattal ellátott alkalmazás, mely nagyszámú nukleotid- illetve fehérjeszekvenciákkal egyaránt képes dolgozni. A többszörös szekvenciaillesztés célja: több szekvencia leginkább hasonló pozícióinak összerendezése. Azokra a helyekre, ahol inzerciót vagy deleción feltételeztünk, rést (- gap-et) illesztettünk be a megfelelő szekvenciákba (ARI et al., 2012).



33. ábra A *tef1* szekvenciák illesztésének részlete a ClustalX program segítségével

Fotó: Göröcs Gábor

A program több szekvencia hasonlóságát, homológiáját azonosítja és elemzi, ezáltal felismerhetővé válik a szekvenciák közötti evolúciós kapcsolat, eltérés illetve egyezőség. A program által megírt fájlkiterjesztések könnyen felismerhetők egyéb törzsfakészítő és elemző alkalmazások számára. A programot THOMPSON és munkatársai (1997) fejlesztették ki. A ClustalX egy ingyenesen letölthető program, amely bárki számára hozzáférhető az alábbi web címen: <http://www.uk.plbio.kvl.dk/bioinfo.htm>

Genedoc

Miután a ClustalX program segítségével a szekvenciák illesztése megtörtént, szükség volt egy manuális finomításra. A Genedoc program szintén egy többszörös szekvenciaillesztő és szerkesztő program, amely lehetővé teszi a kézi finomhangolást. Erre azért van szükség, mert a felhasználó megfelelő szakismeret birtokában gyakran tovább tudja optimalizálni a programok által készített összerendezést, és így megtalálja a legnagyobb homológiát a szekvenciák között. A programot NICHOLAS munkatársai készítették 1997-ben, amely szintén ingyenesen hozzáférhető a következő web címen: <http://www.uk.plbio.kvl.dk/bioinfo.htm>

TreeView

A szekvenciaillesztést követően szükség van a kapott adatok grafikai ábrázolására, mert ezáltal jobban láthatóvá válnak a különböző evolúciós kapcsolatok a vizsgált minták között. Erre a feladatra több program áll rendelkezésre. Vizsgálataink során először a Treeview nevű programot használtuk, amely filogenetikai törzsfák rajzolására és szerkesztésére egyaránt alkalmas. A program a különböző törzsfakészítő alkalmazások adatait használja. A program a legtöbb analízishez használt fájlformátumot kezeli (Nexus és Phylip). A program alkotója PAGE (1996). Ez a program is ingyenes, és a következő weboldaltól tölthető le: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

Paup*

A Paup*4.0 (SWOFFORD, 2000) jelenleg az első számú törzsfakészítő program. A program a ClustalX illetve a Genedoc által készített adatfájlokból dolgozik, és többféle filogenetikai elemzés, köztük a vizsgálataim során kiválasztott Maximum Parsimony és Maximum Likelihood analízis elvégzésére is alkalmas. A PAUP* a NEXUS fájlformátumot kezeli mind bemenő, mind kimenő adatként. A program megrendelhető és megvásárolható a következő honlapon: <http://paup.csit.fsu.edu/>

3.8. Maximum Parsimony analízis

A vizsgálataink során kapott szekvenciák elemzéséhez a Maximum Parsimony analízist használtuk. Az elemzés alapjait Ockham, angol szerzetes és filozófus tette le a 13. században. Az „Ockham borotvája” néven ismertté vált elv lényege, hogy ha egy adott jelenségre két magyarázat lehetséges, akkor az egyszerűbb magyarázat bekövetkezése a valószínűbb. A Maximum Parsimony tehát azt a filogenetikai fát keresi, amely a rendelkezésre álló szekvenciák alapján a lehető legkevesebb kényszerű változást feltételezi. Összegezve az elemzés módszertani alapjait: elmondható, hogy használatával olyan törzsfát fogunk kapni, amely a leszármazási viszonyok pontos értelmezéséhez minimálisra csökkenti az evolúciós eredetű változások összegét (KLUGE és FARRIS, 1969; FARRIS, 1970; HARTIGAN 1973).

A Maximum Parsimony analízis az 1966-os első alkalmazása óta a leggyakrabban használt megközelítés a filogenetikai törzsfák rajzolására annak ellenére, hogy az azóta eltelt időszak alatt számos más alapon működő analízis jelent meg, mint például a Maximum Likelihood modell (1981) illetve a Bayesian analízis (1996). Először morfológiai karakterek elemzésére használták a módszert, majd később aminosav és nukleotid szekvenciák analízisek alapjait képezte a Maximum Parsimony (HENNIG, 1966; FITCH, 1971). A Maximum Parsimony módszer a karakter alapú módszerek közé sorolható. A karakter alapú módszerek lényege, hogy megtartják a taxon eredeti szekvenciáját, ezzel rekonstruálhatóvá téve az ősi fajok lehetséges szekvenciáját. A módszer akkor adja a legmegbízhatóbb eredményeket, amikor az evolúciós ráta alacsony, vagyis a várható evolúciós változások száma kevés. De ki kell emelni azt is, hogy a módszer nem csak olyan adatok elemzésére használható, ahol alacsony az evolúciós változások száma. A Parsimony elemzés előnyös tulajdonságai közt fontos megemlíteni azt, hogy nem igényel speciális hardveres háttérrel. A vizsgálat akadály nélkül lefuttatható asztali számítógépeken. Jellemző, hogy a vizsgálat rövid idő alatt lefuttatható, pontos és megbízható eredményeket szolgáltat (JÁGER, 2008; IRINYI, 2009; ARI, 2012). A Maximum Parsimony analízis esetében fontos megemlíteni továbbá azt is, hogy a módszer bizonyos korlátok között szolgáltat megbízható eredményeket. Az egymástól távolabb lévő szekvenciák vizsgálata során az elemzés kevésbé megbízható eredményeket ad, továbbá, ha lényeges eltérések tapasztalhatóak az egyes elágazások hosszában, szintén gyengül a megbízhatóság mértéke. Ebből adódóan nem becsülhető az egyes elágazások pontos hossza. Fontos megjegyezni azt is, hogy az elemzés nem teszi lehetővé az evolúciós modellek megválasztását (HANDY és PENNY, 1989; IRINYI, 2009).

3.9. Bootstrap

Miután a rendelkezésre álló szekvenciákból a Maximum Parsimony analízis segítségével törzsfát készítettünk, szükséges volt a kapott eredményeknek a megbízhatóságát megbecsülni. A törzsfák elágazásainak megbízhatóságát számos módszerrel becsülhetjük meg, de a legelterjedtebb eljárás a Bootstrap elemzés (EFRON, 1979; FELSTEIN, 1985).

A módszer lényegében az egyszerű visszatevés, újra mintavételezés elvét használja fel. A PAUP program segítségével elvégezhető elemzés során a szekvenciarendezést követően a kapott adatokból véletlenszerűen különböző replikák készülnek, melyeknek célja új adathalmazok (matrixok) létrehozása, amelyeknek a különböző paraméterei az eredetivel megegyezők. A bootstrap gyakorlatilag egy újra mintázás a rendelkezésre álló adatok cserélgetésével úgy, hogy egy adatot a program többször kiválaszthat. Az ismétlések száma minimum 100, de általában 1000. Minél nagyobb számú ismétléssel történik a vizsgálat, annál nagyobb a kapott eredmény megbízhatósága (HALL, 1992; IRINYI, 2009).

Az újra mintázás eredményeként kapott, kevert összetételű, mesterséges szekvenciákból újra törzsfa készül. A számítások végeztével a kapott eredményeket a rendszer összegzi, majd ezáltal megbecsüli a mesterséges szekvenciák által kapott törzsfa és azok elágazásainak a megbízhatóságát. Az elágazás bootstrap értékét az összes másolathoz viszonyított gyakorisága adja. A Bootstrap elemzés egy konszenzus fát eredményez, amely a változók bootstrap újra mintavételezésével előállított alternatív fák összevetése alapján jön létre, és százalékban adja meg, hányszor helyezi a fában azonos helyre a mintákat. Ha a bootstrap érték nagyobb, mint 95 %, akkor a kapott fa megbízható, mert a másolatok adatai nagymértékben alátámasztják az adott elágazást. Ha kevesebb mint 50%, akkor a kapott fa megbízhatósága megkérdőjelezhető, mert a másolatok nem erősítik meg az adott elágazást (FREEDMAN 1981; ARI, 2012).

A Bootstrap elemzés számos előnnyel rendelkezik, amelyek miatt a legkedveltebb ellenőrző programnak számít. Az elemzés kiküszöböli a változók kiválasztásában előforduló szubjektív elemeket, és ezáltal alkalmas a leginkább stabil csoportok kiválasztására. A Bootstrap alkalmazásához csak az elemzés lefuttatásához szükséges idő szabhat korlátokat. A Maximum Parsimony elemzés a gyorsabb törzsfakészítő alkalmazásokhoz sorolható, és ezáltal a kapott eredmények Bootstrap elemzése is gyorsan lefuttatható. Az elemzés időigényét befolyásolja a vizsgálatba bevont taxonok száma, valamint a rendelkezésre álló számítógép kapacitása is (IRINYI, 2009).

3.10. Mikroszatellit analízis

A mikroszatellit adatok elemzéséhez a Popgene 1.31 (YEH et al., 1999) szoftvert használtuk fel. A hat vizsgált mikroszatellit lokuszt elemeztük, és megbecsültük a heterozigotizás mértékét (LEVENE, 1949; NEI, 1973). A program segítségével kiszámítottuk az allélfrekvenciát, az effektív allélszámot és a genetikai diverzitást a teljes populáció esetében. A megfigyelt allélok tényleges számát szintén a POPGENE szoftver segítségével határoztuk meg (KIMURA és CROW, 1964).

A vizsgált mintákat földrajzi elhelyezkedés szerint 7 különböző csoportba rendeztük, és a program segítségével megvizsgáltuk a polimorf lokuszok számát és százalékos megoszlását, az átlagos allélszámot lokuszonként, a tényleges lokusz számot, Nei-féle géndiverzitást (h) lokuszonként. Elvégeztük a genetikai különbség becslését a populációk között a Nei-féle G-statisztika alapján, valamint a Nei-féle torzítatlan genetikai azonosság és a genetikai távolság becslését (NEI, 1972; NEI, 1973; NEI, 1987).

A populációk közötti eltérést a hét populáció közötti allélfrekvenciák összehasonlításával teszteltük le, és kiszámítottuk a Weir & Cockerham-féle θ (F_{st}) értéket (WEIR és COCKERHAM, 1984) a Multilocus 1.3b program segítségével. A program a θ értékek statisztikai elemzését a $\theta=0$ (a populációk között nincs elkülönülés) null hipotézis tesztelésével végezte a véletlenszerűen kiválasztott izolátumok adataival tízezerszer (AGAPOW és BURT, 2001).

A populációk közötti génáramlás (N_m) mértékét, vagyis az egy generáció migráns egyedek számát a θ értékből kalkuláltuk ki az $N_m = 0.5 (1 - \theta)/\theta$ képlet segítségével (MCDERMOTT és McDONALD, 1993).

A különböző genotípusok (multilocus genotypes - MLG) számának megadásához, valamint az asszociációs index a mintaszámbeli eltéréseket korrigáló, standardizált változatának kiszámításához szintén Popgene 1.31 programot alkalmaztuk. A teljes pánmixia ($r_D = 0$) null hipotézisét a program a véletlenszerűen kiválasztott izolátumok adataival tízezerszer tesztelte (AGAPOW és BURT, 2001; GIRAUD et al., 2006).

A populációk struktúráját a BAPS 6.16 (Bayesian Analysis of Population Structure) program segítségével vizsgáltuk meg. A program a Bayesian megközelítést használva határozza meg a populációban található egyedek legvalószínűbb csoportosítását. A program a mikroszatellit fragment hosszúság adataiból határozza meg a populációk legvalószínűbb (posterior valószínűség) számát (k – klaszter szám) illetve megadja az egyedek csoporthoz tartozását (CORANDER et al., 2003; TANG et al., 2009).

4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

4.1. Vegetatív kompatibilitási tesztek eredménye

Vizsgálataink során mindösszesen 168 különböző mintán végeztük el a vegetatív kompatibilitási teszteket. A 6. számú táblázatban az eltérő származási helyekről gyűjtött minták pontos mennyiségét foglaltuk össze. Legnagyobb számban a Magyarországról és a Szlovákiából származó mintákat vontuk be a vizsgálatba. A vonatkozó szakirodalmat áttekintve ebben a két termőkörfzetben lehetett számítani a legnagyobb diverzitásra a vegetatív kompatibilitási csoportok között.

Származási hely	Régiók száma	Termőkörfzet száma	Mintasám (db)
Bulgária	1	1	5
Görögország	-	-	9
Macedónia	5	5	22
Magyarország	5	13	44
Románia	2	13	21
Portugália	-	4	5
Szlovákia	5	9	39
Ukrajna	3	7	21

6. táblázat A vegetatív kompatibilitási vizsgálatba bevont minták származása és darabszáma

A vizsgálatok első lépéseként a sikeresen felszaporított mintákat termőhelyenként elkülönítve párosítottuk egymáshoz. A mintaterületek nagy részén jellemző volt, hogy nem minden minta volt kompatibilis egymással, ezáltal feltételezhetni lehetett, hogy több VC csoport megtalálható az adott területen. E tesztek eredményeit Excel táblázatban foglaltuk össze, ezáltal jól áttekinthetővé vált, mely minták kompatibilisek, illetve inkompatibilisek egymással. A táblázatok a MELLÉKLETEK fejezetben találhatók meg.

A fent leírt tesztek segítségével sikeresen redukáltuk a párosítások számát, ezáltal a különböző termőhelyekről már csak minden második mintát párosítottunk az EU tesztterörzsekkel. A tesztek értékelése a gomba micéliumok érintkezési területének vizuális vizsgálatával történt. A vegetatív kompatibilis tenyészetek esetében az érintkező micéliumok egyöntetűek voltak, nem volt megfigyelhető micélium elhalás. A vegetatív inkompatibilis tenyészetek esetében jól kirajzolódó szegély jellemezte az érintkező hifákat. A jelenséget a Powell táptalaj segítségével jóval látványosabbá sikerült tenni, ugyanis a hifaasztomizáció okozta pH csökkenésre a táptalaj erős színváltozással reagált.

4.1.1. Magyarországi minták VC tesztjeinek eredménye

Vizsgálataink során Magyarország 13 különböző szelídgesztenye termőterületéről összesen 44 mintán végeztük el a vegetatív kompatibilitási vizsgálatokat. Külön csoportban kezeltük a soproni, a zalai, a baranyai, a Dunakanyar menti, valamint az észak-magyarországi termőkörszetet. Fontos kiemelni, hogy a pálházi illetve érsekivádkerti szubpopulációk esetében először került sor a VC tesztek elvégzésére. Ezekről a helyekről korábbi szakirodalmak tekintetében nem ismertek eredmények.

A 7. számú táblázatban összegeztük az elvégzett vizsgálatok eredményét. A soproni termőkörszetben az EU-12 illetve az EU-13 VC csoportokat sikerült kimutatni. A zalai termőkörszetben az EU-12, az EU-13 illetve az EU-16 VC csoportok mutattak pozitív eredményt. A baranyai termőkörszet teljes hasonlóságot mutatott a zalai termőkörszettel a VC csoportok tekintetében. A Dunakanyarból illetve az észak-magyarországi pálházi minták az EU-12 tesztetörzsszel mutattak vegetatív kompatibilitást.

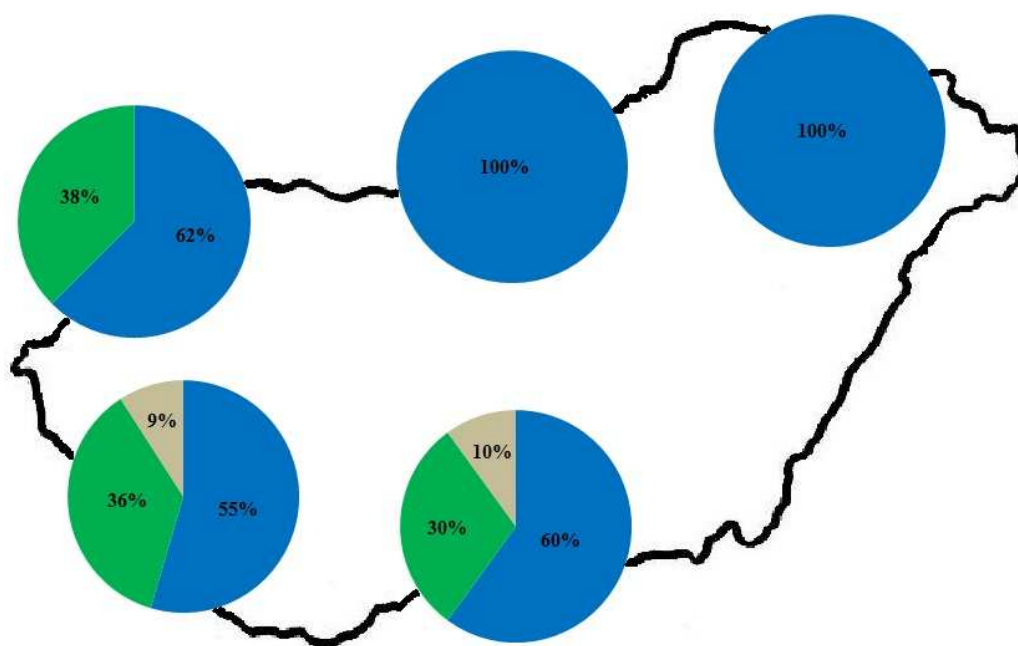
RÉGIÓ	TERMŐKÖRZET	EU TESZTER TÖRZSEK SORSZÁMA																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
SOPRONI	ÁGFALVA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BÁNFALVA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	FÁBER RÉT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SOPRON	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZALAI	DÖBRŐCE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IHAROSBERÉNY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BARANYAI	KADARKÚT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ZENGÓVÁRKONY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PÉCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DUNAKANYAR	ÉRSEKVA DKERT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	NAGYMAROS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ÉSZAK MAGYAROSZÁG	PÁLHÁZA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PÁLHÁZA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

7. táblázat Magyarországi szelídgesztenye termőkörszetekből származó *Cryphonectria parasitica* minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye

A *Cryphonectria parasitica* magyarországi szelídgesztenye termőterületeken megtalálható szubpopulációi nagy diverzitást mutatnak a vegetatív kompatibilitást illetően. Az első átfogó vizsgálatok eredményét RADÓCZ (1997) publikálta. Ezt követően VIDÓCZI (2005), valamint TARCALI (2007) közölt újabb adatokat. Ezen publikációk eredményét összevetve az általunk kapott eredményekkel az alábbi megállapítások tehetőek.

A soproni régióban VIDÓCZI 2005-ben publikált eredményei adnak átfogó képet a különböző megtalált VC csoportokról. Fellelhető a régióban az EU-1, az EU-6, az EU-9, az EU-12, az EU-13, az EU-16, az EU-17, az EU-22, az EU-23, az EU-25 valamint az EU-28. A zalai termőrégióban az EU-1, az EU-2, az EU-3, az EU-5, az EU-6, az EU-12 és az EU-16 tesztterörzsek mutattak kompatibilitást a helyi mintákkal. A baranyai régióban szintén nagyszámú, 9 különböző VC csoport került eddig felfedezésre, ezek az alábbiak: az EU-3, az EU-4, az EU-6, az EU-9, az EU-11, az EU-12, az EU-13, az EU-15 és az EU-16. A Dunakanyar régióban Pilismarót és Nagymaros környékén található szelídgesztenye állományokban az EU-4, az EU-12, az EU-16, az EU-28 illetve az EU-29 kompatibilitási csoportokat írták le.

Miután a rendelkezésünkre álló mintáknak meghatároztuk a VC csoportját, megvizsgáltuk a különböző régiók VC csoportok szerkezetét, ezáltal képet kaptunk arról, mely VC csoportok dominánsak egy adott régióban. A kapott eredményeket a 34. számú ábra szemlélteti. Magyarország valamennyi termőközetének esetében jellemző az EU-12 VC csoport dominanciája. A zalai és baranyai régióban megfigyelhető az EU-16 VC csoport 10% körüli jelenléte, ami jelentősnek mondható.



34. ábra A magyarországi termesztési régiók VC csoportjainak szerkezete, százalékos megoszlással



4.1.2. Szlovákiai minták VC tesztjeinek eredménye

A szlovákiai mintagyűjtéseink során 9 mintaterületről mindösszesen 39 mintát izoláltunk, majd elvégeztük rajtuk a vegetatív kompatibilitási tesztek. A régiók kialakítása az alábbiak szerint alakult. Külön régiót alkotnak a Pozsony környéki minták, a nyitrai minták, a kékkői minták, a besztercebányai régióban található Kiskorna (Krná) temetőjéből származó minták, valamint a Kelet- Szlovákiában, az ukrán határ közvetlen szomszédságában található Petróc (Petrovce) melletti erdőből gyűjtött minták.

A 8. táblázatban szemléltetjük az elvégzett vizsgálatok eredményét. A pozsonyi termőkörszetben jellemzően az EU-2, az EU-12 illetve az EU-13 VC csoportokat sikerült kimutatni. A nyitrai termőkörszetben szintén az EU-2 és az EU-12 valamint az EU-16 VC csoportok mutattak pozitív eredményt. Ez a két régió izolátumai mutatták a legtöbb különböző VC csoportot. A kékkői termőkörszetben már csak az EU-12 és az EU-13 VC csoportok jelenlétét sikerült kimutatni. A besztercebányai régióban található Kiskorna két mintaterületéről származó minták esetében csak az EU-12 törzs jelenléte volt kimutatható. A kelet-szlovákiai régióban található Petróc két mintaterületéről származó minták esetében az EU-12 törzs valamint az EU-13 törzs jelenléte volt kimutatható.

RÉGIÓ	TERMŐKÖRZET	EU TESZTER TÖRZSEK SORSZÁMA																														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
POZSONYI	Modra	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Svätý Jur	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bratislava	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NYITRAI	Párovské Háje	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KÉKKŐI	Modrý Kameň	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BESZTERCE BÁNYAI	Krná	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Krná	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KELET SZLOVÁKIA	Petrovce	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Petrovce	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

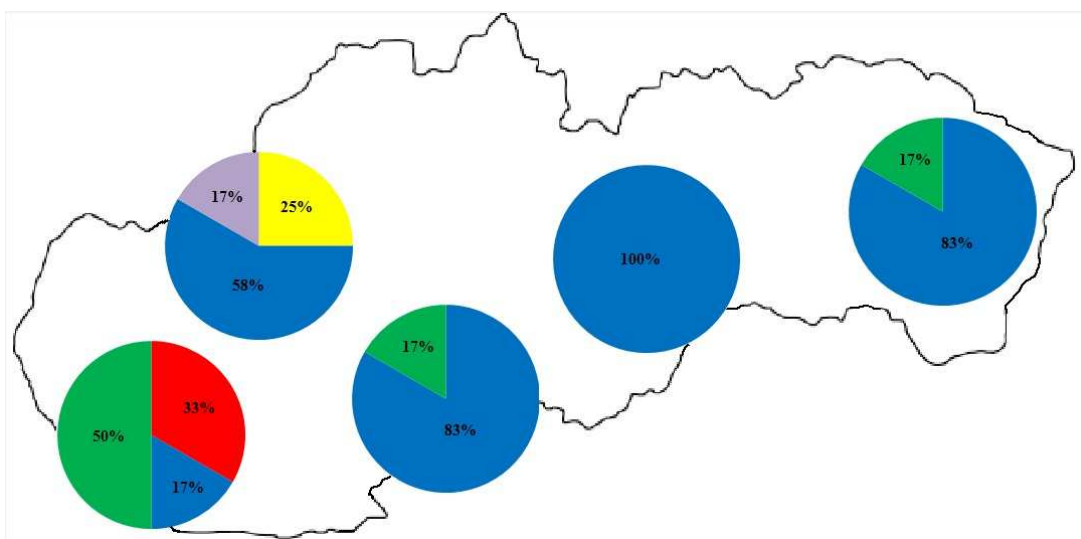
8. táblázat A szlovákiai szelídgesztenye termőkörszetekből származó *Cryphonectria parasitica* minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye

Számos publikáció és kutatási anyag foglalkozott a szlovákiai szelídgesztenye állományokban károsító *C. parasitica* populációk vegetatív kompatibilitásával. JUHÁSOVÁ 1983-ban közölt munkája, JUHÁSOVÁ és RADÓCZ 1995-ben publikált kutatása, majd TARCALI (2007) által közölt újabb adatok, valamint JUHÁSOVÁ és munkatársai által 2010-ben

összeállított publikáció részletesen bemutatja a Szlovákiában megtalálható legfőbb VC csoportokat.

A pozsonyi régióban az EU-2, az EU-5, az EU-12, az EU-13, az EU-14, az EU-17, valamint az EU-25 vegetatív kompatibilitási csoportok kerültek leírásra a korábbiakban. A nyitrai termőrégióban az EU-2, az EU-5, az EU-12, az EU-13, az EU-15, az EU-16 és EU-17 tesztterörzsek mutattak kompatibilitást a helyi mintákkal. A kékkői régióra már nem jellemző olyan nagy diverzitás, mint amely tapasztalható volt az előző régiókban. Itt az alábbi VC csoportok kerültek leírásra, az EU-2, az EU-8, az EU-12, az EU-13. A besztercebányai régióban Kiskorna környékén található szelídgesztenye állományokban eddig az EU-12 kompatibilitási csoportot írták le. A kelet-szlovákiai régióban eddig az EU-12 csoport jelenlétét publikálták.

A tesztek elvégzése után megvizsgáltuk a különböző szlovákiai régiók VC csoportok szerinti megoszlását, ezáltal láthatóvá vált a szubpopulációk variabilitása. A kapott eredményeket a 35. számú ábra szemlélteti. Általánosságban elmondható, hogy az EU-12 és az EU-13 csoport domináns a termőterületeken, de a nyugat-szlovákiai (pozsonyi és nyitrai) termőkörzetek nagyobb variabilitást mutatnak, több vegetatív kompatibilitási csoport is megtalálható, de Nyitra környékén az EU-12, illetve Pozsony környékén az EU-13 csoport a domináns.



35. ábra A szlovákiai termesztési régiók VC csoportjainak szerkezete, százalékos megoszlással



4.1.3. Ukrajnai (kárpátaljai) minták VC tesztjeinek eredménye

A terepi mintavételünk alkalmával Ukrajnából 3 különböző termőkörzetről: Serednje (Szerednye) mellől, Bobovyshche (Borhalom) település határából és Rostov'yatysya mellett található erdőből sikerült kéregrák mintákat izolálni. Ezen területekről származó átfogó vizsgálatokat és a fertőzöttség mértékének megbecsülését TARCALI 2007-ben közölt kutatási anyaga mutatja be, és részletezi. Már akkor jelentős fertőzés pusztította a szelídgesztenye állományokat, de az általunk elvégzett mintavételek idején (2011. április 23-án) még súlyosabbá vált a helyzet (36. ábra).



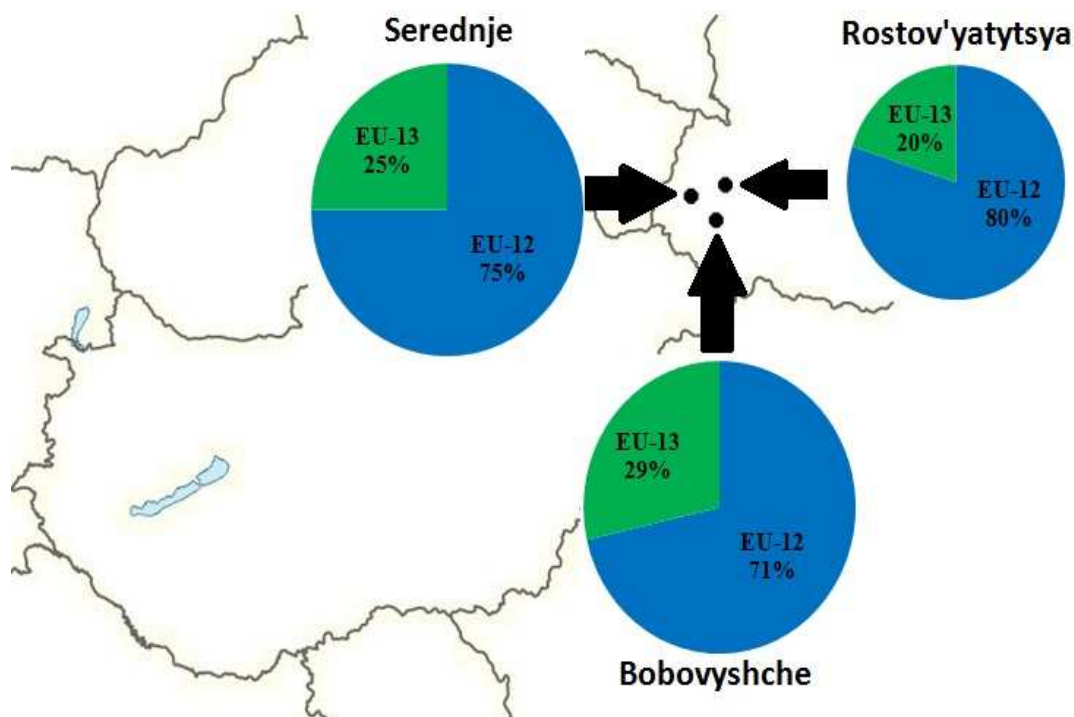
36. ábra Az ukrajnai Bobovyshche melletti szelídgesztenye kéregrákkal erősen fertőzött szelídgesztenye állomány

A 9. táblázatban összefoglaltuk az ukrajnai mintákon elvégzett kompatibilitási tesztek eredményét. A Serednje mellett található 4 mintaterületen sikerült kimutatni az EU-12 és az EU-13 törzs jelenlétét. Úgyszintén megtalálható volt a fent említett két VC törzs a Bobovyshche (Borhalom) település határából és a Rostov'yatysya mellett található erdőből származó mintákban is. Az előző fejezetekben ismertetett régiókkal ellentétben az ukrajnai szelídgesztenye állományokban károsító *C. parasitica* populációk vegetatív kompatibilitásáról kevés szakirodalom tesz említést, ezért itt is TARCALI 2007-ben írt doktori disszertációja ad támpontot a múlttal kapcsolatban. Az általa elvégzett vegetatív kompatibilitási tesztekbe, minden ukrajnai minta esetében csak az EU-12 tesztetörzs mutatott pozitív kompatibilitási eredményt.

RÉGIÓ	MINTA NEVE	EU TESZTER TÖRZSEK SORSZÁMA																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
SEREDNJE	S 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BOBOVYSHCHE	BOB 1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BOB 1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BOB 2-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BOB 2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BOB 2-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BOB 3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BOB 3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ROSTOV'YATYTSYA	RO 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RO 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RO 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RO 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

9. táblázat Ukrajnai (kárpátaljai) szelídgesztenye termőközetekből származó *Cryphonectria parasitica* minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye

A tesztek elvégzése után megvizsgáltuk a különböző ukrajnai régiók VC csoportok szerinti megoszlását, így képet kaptunk a szubpopulációk variabilitásáról. A kapott eredményeket a 37. számú ábra szemlélteti. A három vizsgált régióban az EU-12 törzs dominált 71-80 %-os jelenléttel, míg az EU-13 minta 20-29 %-os arányban volt jelen.



37. ábra Az ukrajnai (kárpátaljai) termesztési régiók VC csoportjainak szerkezete százalékos megoszlással

4.1.4. Romániai minták VC tesztjeinek eredménye

A Romániában végzett terepi vizsgálatokat két külön alkalommal végeztük el. A Nagybánya (Baia Mare) mellett található szelídgesztenye termőhelyeken, 2011. szeptember 7-én izoláltuk a vizsgált mintákat, míg a Dél-Romániában található Tismana városát körülölelő erdőkből 2012. szeptember 2-án gyűjtöttük be a mintákat. Összesen a két régió 13 termőközteréből 21 izolátumot gyűjtöttünk, majd elvégeztük rajtuk a vegetatív kompatibilitási teszteket. A 10. táblázatban szemléltetjük az elvégzett vizsgálatok eredményét.

A nagybányai régióban a Veresvíz, a Felsőötöfalu és a Kőbánya termőközterben dominál az EU-12 vegetatív kompatibilitási csoport. A Nagybánya mellett található Tăuții-Măgherauș (Miszmgogyorós) termőközterben az EU-12 törzs mellett sikerült kimutatnunk az EU-13 vegetatív kompatibilitási csoport jelenlétét is. A vizsgálataink tárgyát képező másik romániai termőrégió, Tismana esetében minden begyűjtött minta az EU-12-es vegetatív kompatibilitási csoporttal mutatott pozitív eredményt.

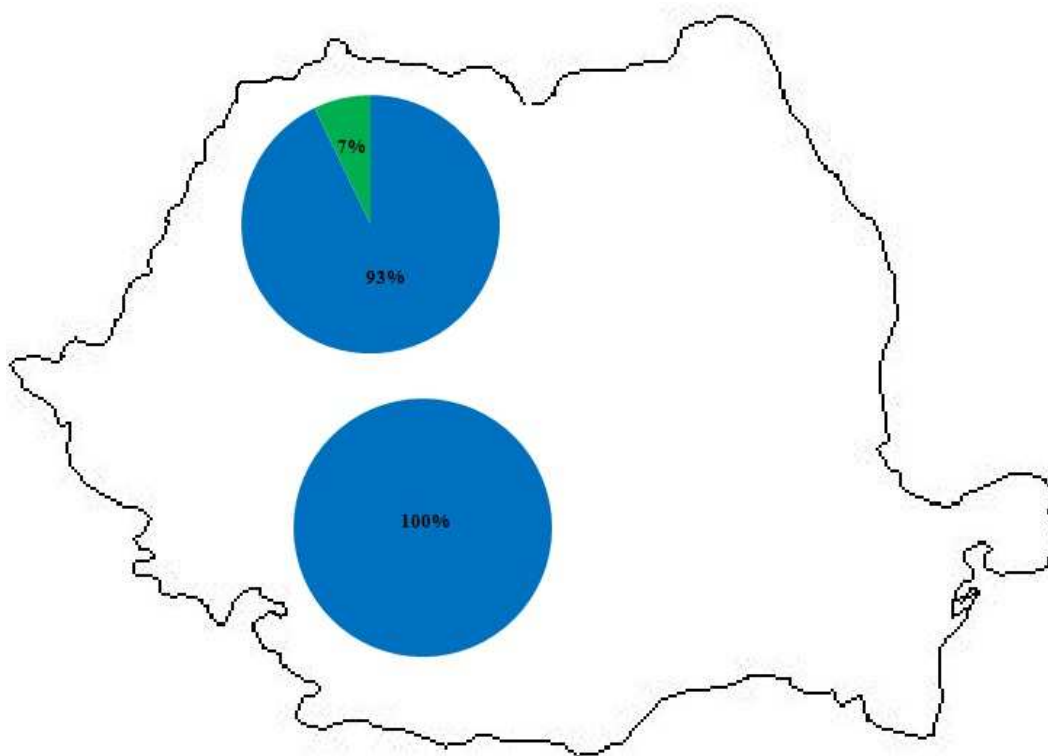
RÉGIÓ	TERMŐKÖRZET	EU TESZTER TÖRZSEK SORSZÁMA																														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
NAGYBÁNYAI	Veresvíz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Veresvíz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tăuții-Măgheraș	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tăuții-Măgheraș	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tăuții-Măgheraș	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Felsőötöfalu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Felsőötöfalu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kőbánya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kőbánya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kőbánya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TISMANAI	Tismana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tismana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tismana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10. táblázat Romániai szelídgesztenye termőközterekből származó *Cryphonectria parasitica* minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye

A *Cryphonectria parasitica* romániai szelídgesztenye termőterületeken megtalálható szubpopulációi nem mutattak nagymértékű diverzitást a vegetatív kompatibilitás tekintetében. A kórokozó jelenlétét először 1984-ben FLOREA és POPA írta le. Az első átfogó vizsgálatok eredményeit TARCALI és RADÓCZ, 2006-ban publikálta. Ezen publikációk eredményét összevetve az általunk kapott eredményekkel az alábbi megállapítások tehetők.

A nagybányai régió szelídgesztenye állományát pusztító *C. parasitica* populációk vegetatív kompatibilitását már több mint 20 éve vizsgálják, és nagyon pontos felmérések vannak róla. Ezekre a felmérésekre alapozva végzik a biológiai védekezést hipovirulens törzsek bevonásával. A kutatások szerint nagy dominanciát mutat az EU-12 kompatibilitási csoport, de néhány mintában már megtalálható az EU-13-as csoport is. Ez nagy mértékben nehezíti a hipovirulenciára alapozott védekezést. A Gorj megyében található Tismana és környékén kialakult szelídgesztenye állományt pusztító *C. parasitica* populációk vegetatív kompatibilitását az elmúlt években sikeresen feltérképezték román kutatók. Itt kizárólag az EU-12 törzs jelenléte bizonyított (CHIRA et al. 2013).

Az 38. számú ábra a különböző romániai régiók VC csoportok szerinti megoszlását mutatja, amely által láthatóvá válik a szubpopulációk variabilitása. Általánosságban elmondható, hogy az EU-12 csoport domináns a termőterületeken, de a nagybányai régióban a vizsgálat minták 7 %-ában az EU-13 vegetatív kompatibilitási csoport is megtalálható volt.



38. ábra A romániai termesztési régiók VC csoportjainak szerkezete százalékos megoszlással



4.1.5. Macedóniai minták VC tesztjeinek eredménye

A kutatásaink során nem csak a Kárpát-medencéből gyűjtött mintákra akartunk támaszkodni, hanem egy komplexebb elemzéshez szükség volt más termőrégiókból származó minták vizsgálatára is. Sikeres kapcsolatfelvétel után Dr. Kiril Sotirovski professzor úr segítségével gyűjtöttünk mintákat 2011. október 4-én és 5-én Macedónia fontosabb szelídgesztenye termőrégióiban. A gyűjtést a fővárostól Skopjétől 51 km-re található Tetovo városa melletti szelídgesztenye állományaival kezdtük, majd dél felé haladva először Vrutok, majd Osoj települések mellett végeztük el az izolálást. Ezt követően az albán-macedón határon található Ohridi-tó mentén fekvő Volino és Radolistha szelídgesztenye erdőiben folytattuk a minták gyűjtését.

Az 11. táblázatban a macedóniai minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye látható. A vizsgálatból egyértelműen kiderül, hogy minden minta az EU-12 tesztterörzsszel mutatott kompatibilitást. SOTIROVSKI és munkatársai által 2004-ben közölt vizsgálatban nagy mintaszámmal végezték el a teszteket. A különböző macedóniai populációk esetében a legnagyobb mértékben az EU-12 tesztterörzs mutatott kompatibilitást (98%), továbbá kimutatták az EU-1, az EU-2, az EU-10 valamint az EU-22 vegetatív kompatibilitási csoportok minimális jelenlétét. Összefoglalva a saját vizsgálataink, valamint a szakirodalom által kapott eredményeket elmondható, hogy Macedóniában nagyon alacsony diverzitás jellemzi a különböző *C. parasitica* populációk vegetatív kompatibilitását.

TERMŐRÉGIÓ	MINTA NEVE	EUTESZTER TÖRZSEK SORSZÁMA																														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
VRUTOK	VRUT 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VRUT 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OSOJ	OSOJ 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OSOJ 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VOLINO	VOL 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VOL 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RADOLISTHA	RAD 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RAD 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TETOVO	TET 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TET 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

11. táblázat Macedóniai szelídgesztenye termőközetekből származó *Cryphonectria parasitica* minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye

4.1.6. Görögországi minták VC tesztjeinek eredménye

A dél-európai szelídgesztenye termőterületek közül kiemelkednek a Görögország területén található. Európa 6. legnagyobb szelídgesztenye termesző országa, több mint 29 nagy kiterjedésű szelídgesztenye termőrégió megléte jellemzi. Régóta képezi az itteni kutatások gerincét az egyes vegetatív kompatibilitási csoportokban található hipovirulens gombatorzsek felhasználása a biológiai védekezésekben. Számos szakirodalom és kutatási anyag elérhető e kutatásokkal kapcsolatban. Ezért fontosnak tartottuk, hogy görög minták is szélesítsék a komplexebb elemzéseket. Sikeres kapcsolatfelvétel után Dr. Charikleia Perlerou professzor asszony rendelkezésünkre bocsájtott Görögország különböző szelídgesztenye termőterületeiről származó *C. parasitica* izolátumokat. Ezeket a mintákat egészítettük ki a tanszék törzsgyűjteményében megtalálható P5-1, P5-2, ME48-1 és ME 48-2 mintákkal.

A 12. táblázatban a macedóniai minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye látható. A vizsgálatból egyértelműen kiderül, hogy minden minta az EU-12 tesztetörzsszel mutatott kompatibilitást. PERLEROU és DIAMANDIS 2006-ban publikált munkájában Görögország 17 legfontosabb szelídgesztenye termőrégióját vizsgálta meg. A vegetatív kompatibilitási tesztek 88%-ban az EU-12 törzsszel mutattak pozitív eredményeket, de kimutatható volt az EU-1, az EU-2, és az EU-10 kompatibilitási csoportok jelenléte is. Összehasonlítva a saját vizsgálataink, valamint a szakirodalom által kapott eredményt, kijelenthető, hogy Görögországban, hasonlóan Macedóniához, nagyon alacsony diverzitás jellemzi a különböző *C. parasitica* populációk vegetatív kompatibilitását.

TERMŐRÉGIÓ	MINTA NEVE	EU TESZTER TÖRZSEK SORSZÁMA																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
PIERIA	FRI PIR 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ARCADIA	FRI ARK 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PELLA	FRI P 73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
KAVALA	FRI KAV 5h _{pv}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HORTIATIS	FRI HOR 10h _{pv}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
THESSALONIKI	P 5-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
THESSALONIKI	P 5-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
THESSALONIKI	ME 48-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
THESSALONIKI	ME 48-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

12. táblázat Görögországi szelídgesztenye termőközetekből származó *Cryphonectria parasitica* minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye

4.1.7. Bulgáriai minták VC tesztjeinek eredménye

Macedóniai mintagyűjtésünk alkalmával Dr. Kiril Sotirovski professzor úr segítségével lehetővé vált, hogy Bulgáriában is folytassuk terepi munkánkat. Az ország dél-nyugati szegletében, a görög-bulgár-macedón hármashatár közelében található Petrich szelídgesztenye állományából sikeresen mintákat gyűjtöttünk. A bulgáriai szelídgesztenye állományok kéregrák fertőzöttségéről kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Az első észlelések az 1980-as évekre tehetők. Bulgáriában két nagyterjedésű termőrégió található, a már fent említett dél-nyugati régió kívül az észak-nyugati régióban található szelídgesztenye. Fontosnak tartottuk a bulgáriai minták bevonását a vizsgálatainkba, mert ellentétben a görögországi termőrégiók alapos felméréseivel szemben itt jóval kisebb figyelem kíséri a szelídgesztenye állományok kórtani állapotát.

A 13. táblázatban a Bulgáriából izolált minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredményét mutatjuk be. A vizsgálatból egyértelműen kiderül, hogy mind az 5 minta az EU-12 tesztértörzsszel mutatott kompatibilitást. RISTESKI és munkatársai által 2013-ban publikált kutatás ad széleskörű képet a bulgáriai szelídgesztenye kéregrák populációk vegetatív kompatibilitásáról. A vizsgálatban 11 szelídgesztenye termőrégió állományát mérték fel. Ebből 8 termőrégióban sikeresen kimutatták a *C. parasitica* jelenlétét. Az általuk elvégzett vegetatív kompatibilitási tesztek 80%-ban az EU-12 törzsszel mutattak pozitív eredményeket, valamint igazolták, bár nagyságrendekkel kisebb mértékben, az EU-2, és az EU-10 kompatibilitási csoportok jelenlétét is. Az általunk elvégzett vizsgálatok, valamint a szakirodalom által kapott eredmények összevetése után megállapítható, hogy a Bulgáriában megtalálható szelídgesztenye kéregrák populációk vegetatív kompatibilitása esetében is fennáll a Görögországban és Macedóniában tapasztalt nagyon alacsony mértékű diverzitás.

TERMŐRÉGIÓ	MINTA NEVE	EU TESZTER TÖRZSEK SORSZÁMA																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
PETRICH	PET 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PET 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PET 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PET 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PET 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

13. táblázat A bulgáriai Petrich szelídgesztenye termőkörszétből származó *Cryphonectria parasitica* minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye

4.1.8. Portugáliai minták VC tesztjeinek eredménye

A kutatásunkba bevont Kárpát-medencei, valamint a Balkán-félszigetről származó minták mellé összehasonlítás céljából portugál mintákat is sikerült felhasználni. A portugál mintákat Dr. Helena Bragança, a Unidade de Silvicultura e Produtos Florestais Instituto kutatója biztosította számunkra. Két minta az Azori-szigetéről, egy minta a délnyugat-portugáliai Alentejo-ból, egy minta az észak-portugáliai Trás on Montes-ből, és egy minta Madeira szigetéről származik. Kérésünkre úgy válogatta össze a mintákat, hogy azok minél jobban reprezentálják a portugáliai *C. parasitica* populációkat. Portugália a világ egyik legfontosabb szelídgesztenye termesztő országa, nagy gazdasági és társadalmi jelentőséggel bír a szektor, évente több mint 30.000 tonna szelídgesztenye termés is ezt támasztja alá (GOMES-LARANJO et al., 2007).

A 14. táblázatban a Portugáliából kapott minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredményét mutatjuk be. A vizsgálatok során kiderült, hogy csak két mintánál sikerült pozitív eredményeket elérni, a többi minta esetén a rendelkezésünkre álló EU-1 és EU-31 közötti teszt sor nem mutatott kompatibilitást. BRAGANÇA és munkatársai által 2005-ban közölt kutatás átfogó képet ad a portugáliai szelídgesztenye kéregrák populációk vegetatív kompatibilitásáról. Az általuk elvégzett vegetatív kompatibilitási tesztek 80,2 %-ában az EU-11 törzs dominanciája volt tapasztalható, majd a 7,1%-a az EU-12 teszt törzsszel mutatott kompatibilitást. 6,6%-ban az EU-66 jelenléte volt kimutatható, valamint detektálták az EU-1, az EU-2, az EU-28, az EU-33, a P-7 és a P-9 csoport jelenlétét. Az általunk elvégzett vizsgálatok, valamint a szakirodalom által kapott eredmények összevetése után megállapítható, hogy Portugália szelídgesztenye kéregrák populációinak nagy a diverzitása, 9 különböző VC csoport jelenléte bizonyított, és ezek struktúrája különbözik a Kárpát-medencében megtalálhatóktól.

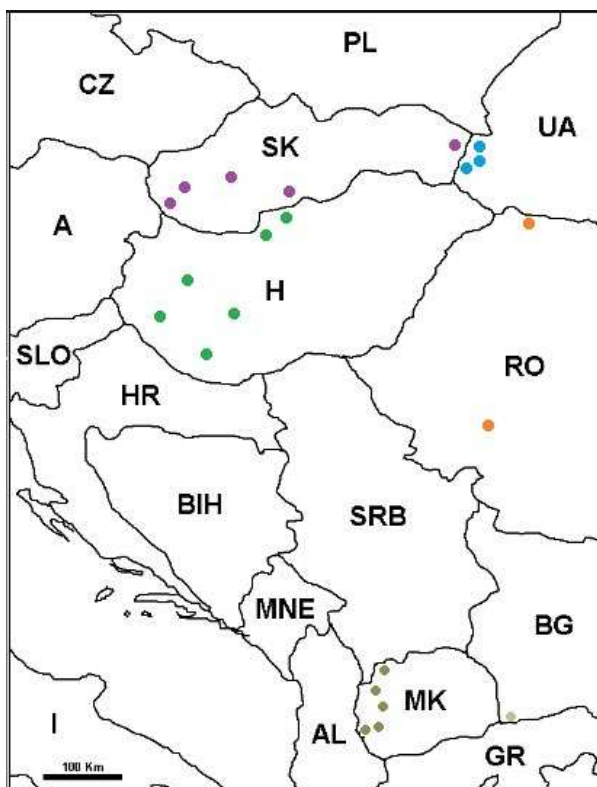
TERMŐRÉGIÓK	MINTA NEVE	EU TESZTER TÖRZSEK SORSZÁMA																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
TERCEIRA (AZORES)	C 0722	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C 0008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
ALENTEJO	C 0006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TRÁS ON MONTES	C 0003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MADEIRA	C 0009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

14. táblázat Portugáliai szelídgesztenye termőközetekből származó *Cryphonectria parasitica* minták vegetatív kompatibilitási tesztjeinek eredménye

4.2. A molekuláris biológiai vizsgálatok eredménye

4.2.1. A *tefl* fragmentumok elemzése által kapott eredmények

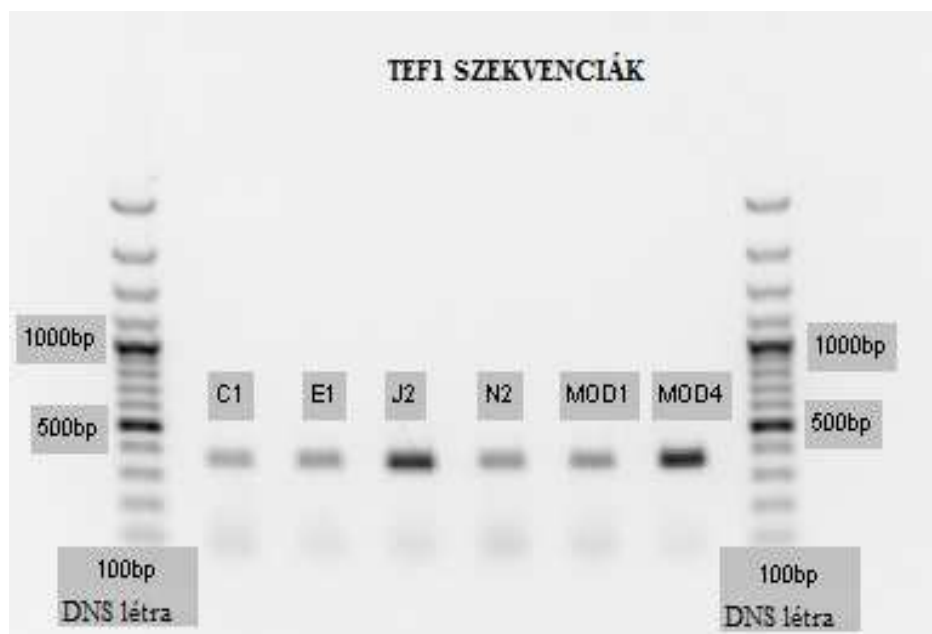
A vizsgálatokban szereplő 95 izolátumból összesen 63 minta esetében sikerült felszaporítani, majd megszekvenálni a *tefl* szakaszokat. Ezen izolátumok pontos származását a 39. ábra mutatja be. Az ábrán használt színek megegyeznek a törzsfán láthatókkal. A molekuláris biológiai labormunkák során sok esetben tapasztaltunk kevert szekvenciákat, és a PCR paraméterek többszöri beállítása és megismételt tenyésztés utáni DNS izolálást követően sem sikerült értékelhető szekvencia eredményeket kapni.



39. ábra A különböző *tefl* fragmentumok származási helye, a térképpontok eltérő színei megegyeznek az adattábla illetve a törzsfa színeivel

A vizsgálataink során begyűjtött, illetve más laboratóriumokból kapott *C. parasitica* minták *tefl* fragmentumainak felszaporítása és a szekvenciák meghatározása nem minden esetben volt sikeres. A *tefl* szekvenciák esetében a DNS izolációját követően a PCR során a primerpárokkal egy 350 bp hosszúságú *tefl* fragmentum szaporodott fel a vizsgált izolátumok esetében (40. ábra).

Az összehasonlító vizsgálatok során szintén nagyon kevés *tefl* szekvencia állt rendelkezésre az adatbankokban, ezért a végleges törzsfában mindösszesen két összehasonlításra felhasználható, nem általunk deponált szekvencia volt elérhető (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



40. ábra A PCR során felszaporított *tefl* szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés)

A szekvenálás eredményének ellenőrzését követően a szekvenciarendezést végeztünk el. A szekvenciákat a ClustalX (THOMPSON et. al., 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (NICHOLAS et al., 1997) program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol a szembetűnő hibák miatt ez szükséges volt.

Érsekvadkert 1. sorszámú *C. parasitica* izolátumának *tefl* szekvenciája (az adatbankban **KC879173** leltárszámmal jelölve):

```
ATATTAATCCCTCCCCATCCCCAAATTCAACTTCCCATACCATCAGCAGCGGCTGCGCTGT
GTTCTGTCTCAGTCGTCTGCCCTGTTTCGCCCAACGCACATTTTGTATTTTTTTGGTGCGGG
GTTTCAGCAACGGTTTCGTCTTATCTCAGATAAACGTGACCACCCCTGTACACCGCCACCT
CAAAACATTCTCCTCCCCCTCCCCACCACCGCACCCATGCACCTAGATAAGCTCTTGATA
ATAAGTCTGTGATGCTAACATTACTTTCTTCACAGCTGCTGAGCTCGGTAAGG
```

A sikeresen felszaporított és megszekvenált izolátumokat deponáltuk az általunk is használt adatbankba (GeneBank). Az adatbank a beküldött adatok feldolgozása után azonosító kóddal (accession number) jelölte az izolátumokat. Ezeket az adatokat a 15. táblázatban rögzítettük.

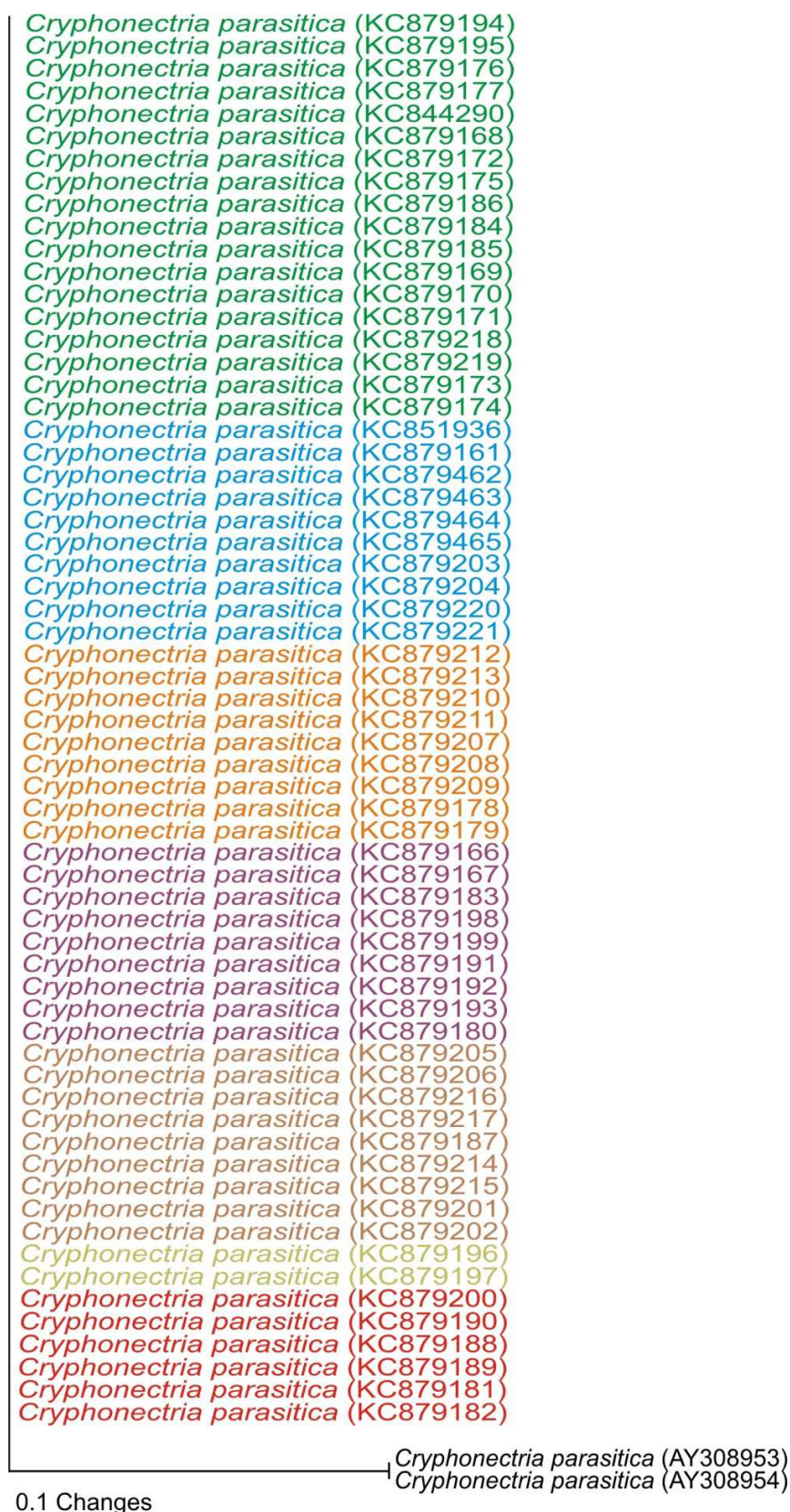
GÉNBANK KÓD	GYŰJTÉS HELYE	ORSZÁG	ORSZÁG	GYŰJTÉS HELYE	GÉNBANK KÓD
KC879203	Rostovjatica	UKRAJNA	MAGYARORSZÁG	Érsekvadkert	KC879173
KC879204					KC879174
KC851936	Bobovyshche			Pécs	KC879194
KC879161					KC879195
KC879162				Kadarkút	KC879176
KC879163					KC879177
KC879164				Nagymaros	KC844290
KC879165					KC879168
KC879220					KC879172
KC879221	KC879175				
KC879210	Tismana	KC879186			
KC879211		KC879184			
KC879207	Nagybánya	Döbröce		KC879185	
KC879208				KC879169	
KC879209				KC879170	
KC879212		Zengővárkony		KC879171	
KC879213				KC879218	
KC879178				KC879219	
KC879179					
KC879216	Vrutok	SZLOVÁKIA		Bratislava	KC879166
KC879217			KC879167		
KC879205	Tetovo		Modra	KC879183	
KC879206				KC879198	
KC879201	Radolishta		Petrovce	KC879199	
KC879202				Párovské Háje	KC879191
KC879214	KC879192				
KC879215	KC879193				
KC879187	Volino		Modrý Kameň	KC879180	
KC879187	Osoj				
KC879196	Petrich	BULGÁRIA	GÖRÖGORSZÁG	-	KC879190
KC879197					KC879200
	KC879188				
AY308953	-	USA			KC879189
AY308954					KC879181
					KC879182

15. táblázat A vizsgálatok során sikeresen felszaporított illetve adatbankból letöltött *tefl* szekvenciák származási adatai és a feltöltés után kapott azonosító kódjai

A *tefl* fragmentumok Parsimony elemzése során megrajzolt filogenetikai törzsfa a 41. ábrán látható. Az elemzés során a program 547 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 539 karaktert konstansnak talált, 6 karaktert pedig nem tekintett informatívnak, és csak 2 karaktert becsült informatívnak. Az informatív karakterek alacsony száma arra utal, hogy a különböző földrajzi körzetekből származó *C. parasitica* izolátumok *tefl* fragmentumai közötti különbség alacsony, vagyis nem alkalmas a fajon belüli elkülönítésére. Az összehasonlítás megbízhatóságának ellenőrzésére bootstrap analízis futtatunk le. A vizsgálat során kapott magas bootstrap értékek megerősítették az egyes elágazások helyének a valószínűségét, ezzel alátámasztva a felrajzolt filogenetikai törzsfa helyességét. Az egyes izolátumok közötti távolságok (bázisok közötti különbség, elágazások hossza) nem bizonyultak kellően eltérőnek ahhoz, hogy az eredmények alapján a filogenetikai törzsfát jól megalapozottnak tekinthessük.

A felrajzolt törzsfán jól látható, hogy az általunk begyűjtött, illetve megszekvenált minták egy egységet alkottak, nem mutattak értékelhető különbséget. Ez az eredmény várható volt, mivel már a szekvenciák kézi finomításakor szembetűnő volt, hogy az egyes minták között csak minimális, néhány bázispár eltérés mutatkozott. Ennek ismeretében kijelenthető, hogy az általunk megszekvenált minták *tefl* szekvenciái gyakorlatilag megegyezőek. Ezzel szemben a GeneBank adatbázisból feltöltött, (a törzsfán fekete színnel feltüntetett) az USA-ból származó minták egy különálló csoportba rendeződtek. A szakirodalmi feldolgozás során említés volt már arra, hogy a *tefl* fragmentum általánosan elterjedt és használt marker fonalas gombáknál a populációgenetikai, illetve a filogenetikai vizsgálatokban.

Kutatásunk során azonban bebizonyosodott, hogy nem alkalmas a *C. parasitica* fajon belül a különböző populációk elkülönítésére, mivel nem mutatott értékelhető különbségeket az eltérő földrajzi elhelyezkedésű minták között. Eredményként kezelhető az, hogy a meglehetősen hiányos génbanki *tefl* szekvencia állományt sikeresen kiegészítettük 63 *C. parasitica* szekvenciával.

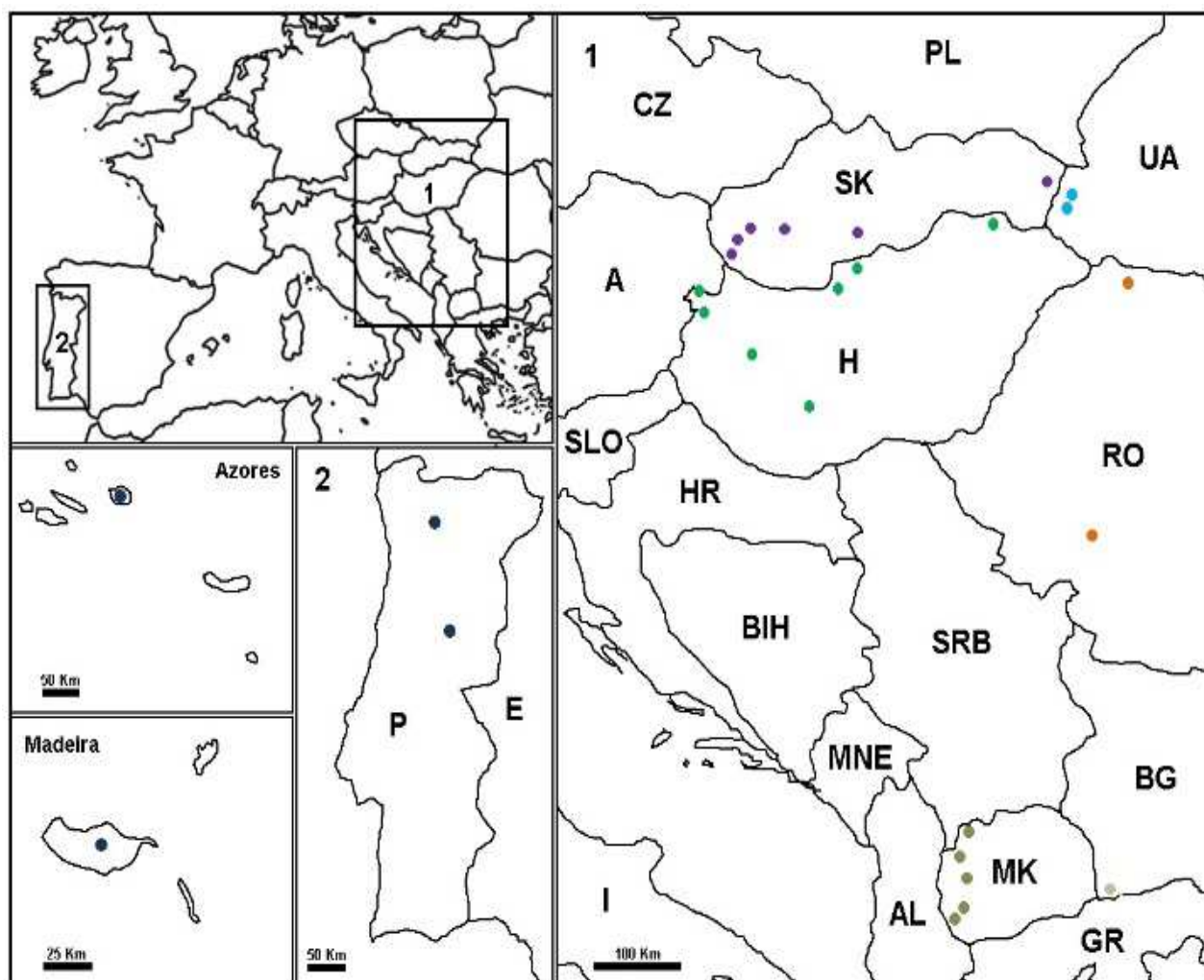


41. ábra Filogenetikai kapcsolatok alakulása a *tef1* szekvenciák Parsimony analízissel történő vizsgálata alapján (a különböző színek a származási helyeket jelölik, feketével az adatbázisból származó mintákat jelöltük)

4.2.2. A ITS fragmentumok elemzése által kapott eredmények

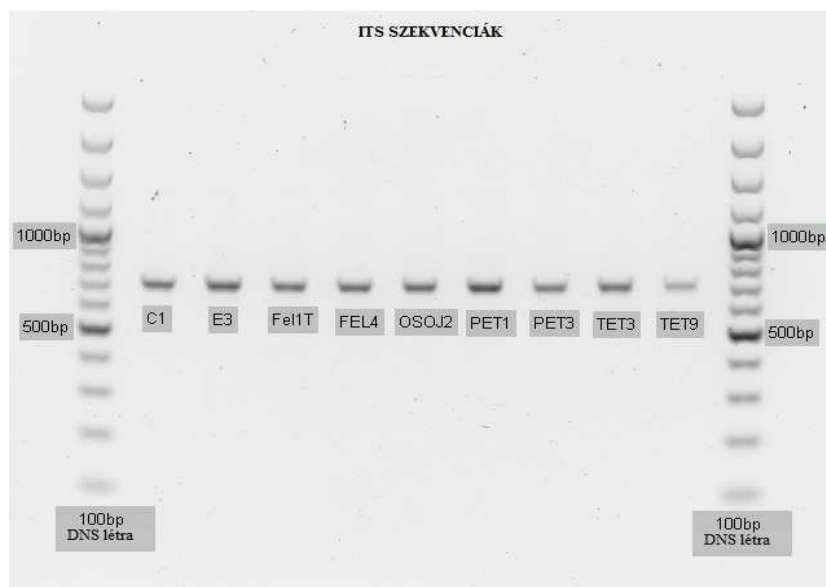
A vizsgálatainkban felhasznált *C. parasitica* minták ITS fragmentumainak felszaporítása a *tefl* fragmentumokkal tapasztaltaknál ellentétben lényegesen hatékonyabb volt. Ebben az esetben a vizsgálatokban szereplő 95 izolátumból összesen 85 minta esetében sikerült felszaporítani, majd megszekvenáltatni a ITS szakaszokat.

Ezen izolátumok pontos származását a 42. ábra mutatja be. Az ábrán használt színek megegyeznek a törzsfán láthatókkal. Az összehasonlító vizsgálatok során számos *C. parasitica* ITS fragmentum állt rendelkezésre az adatbankokban, illetve kibővítve az összehasonlító elemzést, a *Cryphonectria* és *Endothia* nemzetség más fajainak deponált ITS szekvenciáit is felhasználtuk (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



42. ábra A különböző *Cryphonectria parasitica* ITS fragmentumok származási helye, a térképpontok eltérő színei megegyeznek az adattábla illetve a törzsfá színeivel

Az ITS szekvenciák esetében a DNS izolációját követően a PCR során a primerpárokkal egy 600 bp hosszúságú ITS fragmentum szaporodott fel a vizsgált izolátumok esetében (43. ábra).



43. ábra A PCR során felszaporított ITS szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés)

Az izolátumok megszekvenálását követően a szekvenciarendezést végeztünk el. A szekvenciákat a ClustalX (THOMPSON et. al., 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (NICHOLAS et al., 1997) program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol a szembetűnő hibák miatt ez szükségessé volt.

Érsekvadkert 1. sorszámú *C. parasitica* izolátumának ITS szekvenciája (az adatbankban **KC844307** leltárszámmal jelölve):

```
GTGGCCCTCACGGGCGCAACCCAGATACCCTTTGTGAACTTATAACCATTTTATCGTTGC
CTCGGCGCTGAGCCCGGGGGGGGTTGGCGAAGGCAGATTTTCTTCCTTCTCCCCTCCCTC
CCCCCCTCTTCCACCGTGCAAACGGTTGTTGGGGAGCAGGCCCGCCGGCGGCCCACTAA
ACTCTTTGTTTTTATAACCTATCTCTTCTGAGTACATAAACAACAAAAAATGAATCAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTGG
AATTCCAGCGGGCATGCCTGTTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTGGCTTGGTGTGG
GGTACTACCCGTAAAACGGTAGGCCCTGAAATTTAGTGGCGGGCTCGCTAAACTCTGAG
CGTAGTAGTTTTTTTTTCTTCAACCTCCCTTTGGAAGGATTAGCGGTTGCTCTTGCCGTAA
AACCCCCCTTAATAATCTGAAATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG
```

A sikeresen felszaporított és megszekvenált izolátumokat deponáltuk az általunk is használt adatbankba (GeneBank). Az adatbank a beküldött adatok feldolgozása után azonosító kóddal jelölte az izolátumokat. Ezeket az adatokat a 16. táblázatban rögzítettük. Az adatbankból letöltött szekvenciákat a törzsfakészítés során beépítettük a vizsgálatba, ezzel is kiszélesítve a fajon belüli és fajok közötti kapcsolatokat. Az adatbankból 45 mintát töltöttünk le (17. táblázat). A *Cryphonectria* nemzetségből a *Cryphonectria parasitica* faj 19 deponált szekvenciája volt feltöltve a GeneBank adatbázisba, melyek ITS fragmenthosszúsága 525-638 bázispár között változott. A következő országokból származó izolátumok ITS szekvenciáit töltöttük le (zárójelben az izolátumok száma): USA (7), Japán (6), Portugália (3), Kína (2), Azerbajdzsán (1). A *Cryphonectria nitschkei* faj 9 izolátummal vett részt a vizsgálatban 507-669 bázispár fragmenthosszal. Ebből 5 izolátum Japánból származott, míg a fennmaradó 4 izolátum eredete nem ismert, maga kórokozó Japánban és Koreában került leírásra, ahol tölgyfákon (*Quercus sp.*) okoz a *Cryphonectria parasitica*-hoz hasonló rákos sebeket (LIU et al., 2007). A *Cryphonectria macrospora* faj esetében 3 izolátum került be a vizsgálatainkba, 1 Oroszország területéről, 2 minta Japánból, 509-591 bázispár fragment mérettel. A kórokozó a Japánban elterjedt shiifát (*Castanopsis cuspidata*) parazitálja, és rákos sebeket okoz rajta (MYBURG et al., 2004). A *Cryphonectria naterciae* faj 7 izolátummal szerepelt a kutatásban 531-532 bázispár fragmenthosszal, a származási hely minden esetben Portugália volt. Ezt a fajt 2011-ben BRAGANÇA és munkatársai írták le mint a *Cryphonectria-Endothia* fajkomplex új tagját, mely az európai szelídgesztenyét (*Castanea sativa*) és a paratölgyet (*Quercus suber*) támadja meg. A *Cryphonectria radicalis* esetében 3 izolátumot vizsgáltunk (1-et Olaszországból és 2 mintát Svájcban) 535-544 bázispár fragmenthosszal. A kórokozó a tölgyfajokon és az európai szelídgesztenyén okoz rákos sebeket (HOEGGER et al., 2002). Az *Endothiella gryosa* faj esetében 1 portugál izolátum állt rendelkezésünkre 535 bázispár fragmenthosszal mint az eukaliptuszfa (*Eucalyptus globulus*) fontos kórokozója (DAVISON és COATES, 1991). Szintén 1 izolátumot használtunk fel a *Endothia singularis* faj esetében, mely az USA-ból származik, és 749 bázispár fragmenthosszúság jellemzi. A kórokozó a gambel tölgyön (*Quercus gambelii*) okoz ág és kéregrákot (STIPES és PHIPPS, 1971). Az *Endothia gryosa* esetében két izolátumot vettünk górcső alá, ezek származási helye az USA volt, a fragmenthossz 450-475 bázispár között váltakozott. Ez a kórokozó rákos sebeket okoz az amerikai mocsártölgy (*Quercus palustris*) esetében (ROANE et al., 1974).

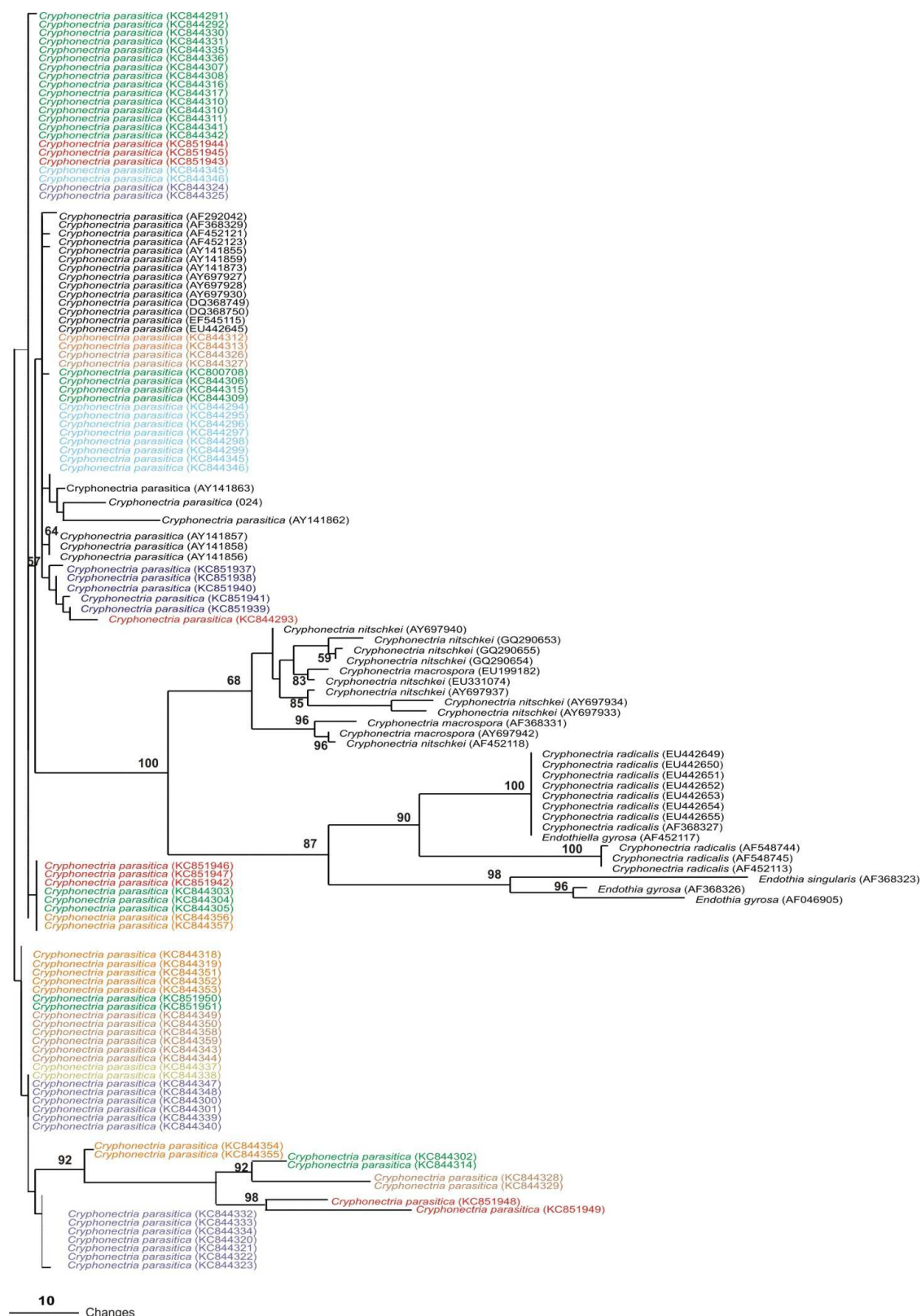
GÉNBANK KÓD	GYŰJTÉS HELYE	ORSZÁG	ORSZÁG	GYŰJTÉS HELYE	GÉNBANK KÓD
KC844345	Rostovjatica	UKRAJNA	MAGYARORSZÁG	Sopron	KC844316
KC844346					KC844317
KC844294	KC844310				
KC844295	KC844311				
KC844296	KC844341				
KC844297	KC844342				
KC844298	Ágfalva			KC844291	
KC844299				KC844292	
KC844354	Tismana			Érsekvadkert	KC844307
KC844355		KC844308			
KC844351	Nagybánya	Pálháza		KC844330	
KC844352				KC844331	
KC844353		Pécs		KC844335	
KC844356				KC844336	
KC844357		Nagymaros		KC800708	
KC844312				KC844302	
KC844313				KC844306	
KC844318				KC844309	
KC844319				KC844314	
KC844300				KC844315	
KC844301	KC851950				
KC844324	KC851951				
KC844325	Döbröce	KC844303			
KC844339		KC844304			
KC844340		KC844305			
KC844347	Svätý Jur	MACEDÓNIA	Vrutok	KC844358	
KC844348				KC844359	
KC844332	Tetovo		KC844349		
KC844333			KC844350		
KC844334	Radolishta		KC844343		
KC844320			KC844344		
KC844321	Volino		KC844326		
KC844322			KC844327		
KC844323	Osoj		KC844328		
KC844337			KC844329		
KC844338	Petrich	GÖRÖGORSZÁG	-	KC851943	
KC851941				KC851945	
KC851939	KC851944				
KC851940	KC844293				
KC851937	KC851942				
KC851938	KC851946				
	KC851947				
	KC851948				
	KC851949				

16. táblázat A vizsgálatok során sikeresen felszaporított ITS szekvenciák származási adatai és a feltöltés után kapott azonosító kódjai

GÉNBANK KÓD	FAJ	FRAMGENT HOSSZ (BP)	SZÁRMAZÁSI ORSZÁG
AF292042	<i>Cryphonectria parasitica</i>	529	USA
AF368329	<i>Cryphonectria parasitica</i>	529	USA
AF452121	<i>Cryphonectria parasitica</i>	529	USA
AF452123	<i>Cryphonectria parasitica</i>	529	USA
AY141855	<i>Cryphonectria parasitica</i>	583	USA
AY141859	<i>Cryphonectria parasitica</i>	576	Japán
AY141873	<i>Cryphonectria parasitica</i>	580	USA
AY697927	<i>Cryphonectria parasitica</i>	529	Japán
AY697928	<i>Cryphonectria parasitica</i>	529	Japán
AY697930	<i>Cryphonectria parasitica</i>	529	Japán
DQ368749	<i>Cryphonectria parasitica</i>	530	Portugália
DQ368750	<i>Cryphonectria parasitica</i>	530	Portugália
EF545115	<i>Cryphonectria parasitica</i>	628	Azerbajdzsán
EU442645	<i>Cryphonectria parasitica</i>	525	Portugália
AY141863	<i>Cryphonectria parasitica</i>	562	Kína
AY141862	<i>Cryphonectria parasitica</i>	558	Kína
AY141857	<i>Cryphonectria parasitica</i>	580	Japán
AY141858	<i>Cryphonectria parasitica</i>	579	Japán
AY141856	<i>Cryphonectria parasitica</i>	574	USA
AY697940	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	531	Japán
GQ290653	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	669	n.a
GQ290655	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	667	n.a
GQ290654	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	667	n.a
EU331074	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	603	n.a
AY697937	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	532	Japán
AY697934	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	532	Japán
AY697933	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	533	Japán
AF452118	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	507	Japán
EU199182	<i>Cryphonectria macrospora</i>	591	Oroszország
AF368331	<i>Cryphonectria macrospora</i>	509	Japán
AY697942	<i>Cryphonectria macrospora</i>	509	Japán
EU442649	<i>Cryphonectria naterciae</i>	531	Portugália
EU442650	<i>Cryphonectria naterciae</i>	532	Portugália
EU442651	<i>Cryphonectria naterciae</i>	531	Portugália
EU442652	<i>Cryphonectria naterciae</i>	531	Portugália
EU442653	<i>Cryphonectria naterciae</i>	531	Portugália
EU442654	<i>Cryphonectria naterciae</i>	531	Portugália
EU442655	<i>Cryphonectria naterciae</i>	531	Portugália
AF368327	<i>Cryphonectria radicalis</i>	535	Olaszország
AF548744	<i>Cryphonectria radicalis</i>	544	Svájc
AF548745	<i>Cryphonectria radicalis</i>	544	Svájc
AF452113	<i>Cryphonectria radicalis</i>	543	Olaszország
AF452117	<i>Endothiella gyrosa</i>	535	Portugália
AF368323	<i>Endothia singularis</i>	749	USA
AF368326	<i>Endothia gyrosa</i>	475	USA
AF046905	<i>Endothia gyrosa</i>	450	USA

17. táblázat Az ITS vizsgálatokba bevont adatbankból származó izolátumok főbb adatai és deponálási kódjai (accession number)

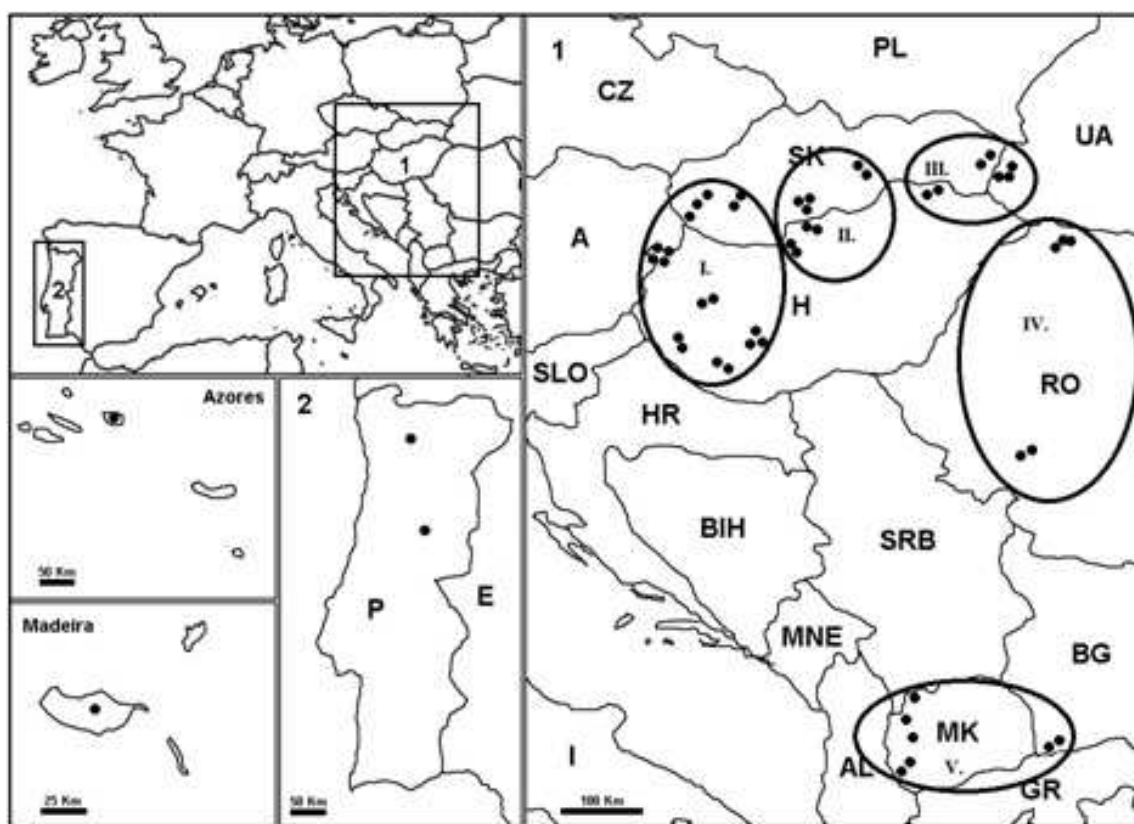
Az ITS fragmentumok Parsimony elemzése alapján megrajzolt filogenetikai törzsfá a 44. ábrán látható. Az elemzés során a program 547 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 299 karaktert konstansnak, 76 karaktert nem-informatívnak tekintett, és összesen 172 karaktert becsült informatívnak. Az informatív karakterek magas száma, ellentétben a *tefl* fragmentumoknál tapasztaltakkal, arra utal, hogy az ITS fragmentumok megbízhatósága lényegesen jobb a különböző földrajzi körzetekből származó *C. parasitica* izolátumok elkülönítésére. Az eredményekből rajzolt törzsfán jól elkülöníthető csoportok rajzolódtak ki. A csoportok kialakulása jellemzően a különböző fajok elkülönülése mentén alakult ki. A *C. parasitica* izolátumok, függetlenül attól, hogy azok saját gyűjtésből vagy az adatbankból származtak, külön csoportokat alkottak, és elkülönültek a közeli rokon *Cryphonectria*, *Endothia* és *Endothiella* fajoktól. Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a választott ITS fragment jól alkalmazható a *Cryphonectria* és *Endothia* nemzetség különböző fajainak szétválasztására. Ezzel szemben a fajon belüli szubpopulációk szétválasztása már nem tűnik ennyire egyértelműnek. Bár lényegesen komplexebb képet kapunk a különböző földrajzi helyekről származó *C. parasitica* izolátumok elhelyezkedését illetően a törzsfán, mint *tefl* fragmentek esetében, mégsem alakulnak ki egyértelmű csoportok, ahol csak egy-egy földrajzi helyről származó izolátumok szerepelnének. Jó példa erre a Magyarországról származó minták elhelyezkedése a fán. A zöld színnel jelölt izolátumok 5 különböző csoportba rendeződtek be csoportokat alkotva szinte valamennyi vizsgálatban szereplő, különböző földrajzi helyekről származó mintákkal. Fontosnak tartom kiemelni a portugál mintákat, amelyek sötétkék színnel vannak jelölve a törzsfán. E minták esetében tapasztalható az, hogy egy önálló csoportba rendeződtek, és ez tovább erősíti azt, hogy különálló csoportot képeznek a vizsgált populációkon belül, alátámasztva a mikroszatellit eredményeket. A Görögországból származó minták esetében vártunk még előzetesen markáns elkülönülést, de ezzel szemben több csoportba került besorolásra a rendelkezésünkre álló 9 minta. Itt érdemes kiemelni azt, hogy Nagymaros és Pálháza területén Görögországból származó hipovirulens törzsekkel történtek kezelések az elmúlt években, és abban a csoportban, ahol ezek a magyar izolátumok szerepeltek ott voltak görög eredetű minták is. A görögországi izolátumokhoz hasonló genetikai tulajdonsággal rendelkező egyedek jelenléte alapján feltételezhető, hogy ezek a populációba kívülről érkeztek, és a kórokozó populációban fennmaradtak. Az ITS fragment alkalmazása különböző fajon belüli szubpopulációk szétválasztására az általunk produkált eredmények alapján a *C. parasitica* faj esetében nem tűnik alkalmasnak, de összevetve a *tefl* fragment esetében kapott eredményekkel, lényegesen jobb.



44. ábra Filogenetikai kapcsolatok alakulása az ITS szekvenciák Parsimony analízissel történő vizsgálata alapján (a különböző színek a származási helyeket jelölik, feketével az adatbázisból származó mintákat jelöltük). A vonalakra írt számok az elágazások valószínűségét jelölik

4.2.3. A mikroszatellit vizsgálatokba bevont minták csoportosítása

A kutatásunkba bevont minták közül összesen 95 minta esetében sikerült felszaporítani az előre kiválasztott 6 mikroszatellit fragmentumot. A mikroszatellit-ekkel elvégzett populációgenetikai vizsgálatok során a minél pontosabb eredmények elérésére törekedtünk, valamint a különböző földrajzi helyekről származó populációk minél részletesebb jellemzésének érdekében a teljes populációt a földrajzi elhelyezkedésük alapján további csoportokra osztottuk fel. A végleges mintákat a vizsgálati eredmények kiértékelése előtt 7 különböző csoportba különítettük el a 45. ábra szerint.



45. ábra A kutatásba bevont *Cryphonectria parasitica* minták földrajzi származásuk szerinti csoportokba rendezése

Az 1- 4. csoportba a Kárpát- medencéből (magyar, szlovák, ukrán és román) származó minták kerültek, az 5. csoportba a Macedóniából és Bulgáriából gyűjtött mintákat helyeztük, a 6. csoportba a görög minták, illetve a 7. csoportba a portugál minták kerültek. A csoportok kialakításakor igyekeztünk a mintaszámokat közel azonos méreten tartani.

4.2.4. A mikroszatellit eredmények által becsült genetikai diverzitás

A vizsgálatok során felhasznált hat különböző mikroszatellit fragment nagyságának különbözősége alapján a 95 vizsgált izolátum 71 különböző genotípusba különült el (18. táblázat). Az allélszámok nagyságából megbecsülhető a genetikai diverzitás. Az allélszám alakulása függ a vizsgált csoportok mintaszámától, nagyobb mintaszám esetében nagyobb allélszámok a jellemzők. Az allélszám (n_a) az 1-5. csoport tekintetében 2,66-4,00 között változott, míg a 6. és 7. csoportok esetében ez az érték 1,50-2,00 között alakult.

Populáció ^a	n^b	n_a^c	n_e^d	h^e	MLG ^f	Max. MLG ^g	Genotípus diverzitás	r_D^h
1.	28	4,00 (1,55)	2,38 (0,88)	0,52 (0,20)	23	3	0,984	0,073**
2.	16	3,33 (1,63)	2,58 (1,40)	0,49 (0,29)	13	2	0,975	0,134**
3.	14	3,50 (0,84)	2,92 (0,94)	0,61 (0,19)	8	3	0,923	0,130*
4.	11	3,00 (0,63)	2,29 (0,38)	0,55 (0,07)	9	2	0,963	0,085*
5.	12	2,66 (0,81)	2,00 (0,83)	0,44 (0,17)	9	2	0,954	0,067
6.	9	2,00 (0,63)	1,50 (0,19)	0,29 (0,20)	7	2	0,944	0
7.	5	1,50 (0,83)	1,37 (0,58)	0,17 (0,27)	4	2	0,900	0
Összes	95	5,67 (1,63)	3,25 (0,83)	0,67 (0,12)	71	2	0,999	0,038**

18. táblázat A különböző *Cryphonectria parasitica* populációk genetikai diverzitása

A zárójelben a szórások értéke látható

^a A 45. ábra szerint

^b n : mintaszám

^c n_a : allélszám

^d n_e : effektív allélszám

^e h : Nei-féle genetikai diverzitás (Nei, 1973)

^f MLG: az eltérő genotípusok száma

^g Max, MLG: a legtöbbször előforduló eltérő genotípusok száma

^h r_D : a klónok nélküli adatokból számított standardizált asszociációs index

** $p < 0,01$

* $p < 0,1$

Az effektív allélszám az alléloszlás egyenletességét mutatja meg. Minél alacsonyabb az érték, annál egyenletesebb az allélok eloszlása. A tíznél több egyedből álló vizsgált csoportokban (1-5. populációk) hasonló volt az effektív allélszám (n_e : 2,00 – 2,92).

A populáción belüli genetikai diverzitás is eltérő mértékben alakult a vizsgált csoportok között. Minél alacsonyabb a genetikai diverzitás mértéke a populációkon belül, annál egységesebb a populáció. Az 1-5. csoport esetében igen magas értékeket kaptunk (0,44-0,61). A kutatásaink során elvégzett VC tesztek eredményei alapján, melyeket majd a későbbi fejezetekben ismertetek, jól látható lesz, hogy a Kárpát-medencei minták nagy heterogenitást mutatnak, és ezt alátámasztja a genetikai diverzitás magas értéke is. Ezzel szemben a görög és portugál mintákat tartalmazó 6-7. csoportok esetében a Nei-féle genetikai diverzitás értéke 0,17 és 0,29 volt (18. táblázat). A portugál és görög minták esetében az alacsony genetikai diverzitás a populációk zárt jellegével magyarázható (pl. Azori szigetek, Madeira).

A rendelkezésünkre álló populációk esetében megvizsgáltuk a genotípus diverzitás mértékét is. Magas genotípus diverzitás érték esetében nagy a változatosság a populációk között. A vizsgálatokba bevont populációk esetében a genotípus diverzitás magas volt, (0,900-0,984) között változott a populációk mintaszámától függetlenül. Az összes egyedre számolt genotípus diverzitás értéke (szintén) igen magas lett (0,999). Ezek az eredmények szintén megerősítik a populációk nagy változékonyságát.

Különböző, egymással nem kapcsolt szekvenciák (lokuszok) vizsgálatával meghatározható egy populáción belül az asszociációs index (I_A). Az asszociációs index teszt a populáción belüli genetikai különbségek mérésére használható (BROWN et al., 1980), hiszen megmutatja, milyen mértékű rekombináció figyelhető meg a különböző lokuszok között. Az összes vizsgált egyedre számított, klónok nélküli (csak különböző genotípusú egyedek) adatokból számolt standardizált asszociációs index (r_D) szignifikánsan különbözött a nullától ($r_D = 0,038$, $p < 0,01$), ami azt jelzi, hogy a vizsgált populációk nagymértékben különböztek egymástól.

A legnagyobb értéket a 2. populáció esetében kaptuk ($r_D = 0,134$, $p < 0,01$). Ebben a populációban vegyesen megtalálhatók szlovákiai és észak-magyarországi minták is. Az 1- 4. populációk esetében a nullától szignifikánsan különböző asszociációs index értékek (r_D : 0,073 - 0,134, $p < 0,1$) a populációkon belüli további csoportok elkülönülését valószínűsítette. A portugál és görög mintákat tartalmazó 6. illetve 7. csoportok esetében az index értéke nulla volt. E mintáknál feltételezhető a legkisebb genetikai különbség a vizsgálat alapján (18. táblázat).

4.2.5. Az F-statisztika alapján kapott eredmények értékelése

A populációk allélfrekvenciáinak összehasonlítása alapján, F-statisztika segítségével kiszámítottuk a Weir & Cockerham's féle fixációs index (θ) értékeit. Az F-statisztika az egymásból levezethető indexek segítségével adja meg a populációk genetikai varianciáját. Egy adott gén a benne megtalálható allélokhoz viszonyított arányát nevezik allélfrekvenciának. A fixációs index segítségével meghatározható, hogy egy adott populáció tagjai között átlagosan milyen mértékű a genetikai differenciálódás. Értéke meghatározható a populációrendszer szintjén tapasztalható heterozigóta-hiány, illetve az egyes populációk génfrekvenciájában mutakozó szórás segítségével is.

θ N_m	1. populáció	2. populáció	3. populáció	4. populáció	5. populáció	6. populáció	7. populáció
1. populáció		0,242**	0,124**	0,207*	0,293*	0,282**	0,387**
2. populáció	0,156		0,167**	0,263**	0,403**	0,238	0,341
3. populáció	0,353	0,249		0,130	0,263	0,185	0,350
4. populáció	0,191	0,140	0,334		0,067	0,207	0,444
5. populáció	0,120	0,074	0,140	0,696		0,336	0,561
6. populáció	0,127	0,160	0,220	0,191	0,090		0,619
7. populáció	0,028	0,096	0,092	0,062	0,039	0,030	

19. táblázat A *Cryphonectria parasitica* hét populációja közötti elkülönülés. A Weir & Cockerham-féle fixációs index értékei (θ) a vonal fölött, a génáramlás ($N_m = 0,5 (1 - \theta)/\theta$) értékei a vonal alatt találhatók. A világosszürke a populációk közötti mérsékelt (θ : 0,05-0,15), a sötétszürke a nagymértékű (θ : 0,15-0,25), a fekete a nagyon nagy (θ : > 0,25) különbséget jelöli.

** $p < 0,01$

* $p < 0,1$

A fixációs index értéke 0-1 között lehet, ahol a 0 érték esetében nincs különbség a populációk között míg, az 1 közeli érték esetében nagyon nagy különbség feltételezhető. A fent említett intervallum alapján az általunk vizsgált populációk között 12 esetben nagyon nagy ($\theta > 0,25$) különbség volt tapasztalható. Jellemzően a 7. populáció, azaz a portugál minták minden összehasonlításban nagy különbséget mutattak. További 5 esetben nagymértékű ($\theta: 0,15-0,25$) különbség volt megfigyelhető. Itt fontos kiemelni, hogy a 6. populáció, tehát a görög minták mutatták ezeket az eltéréseket. A maradék 4 esetben pedig mérsékelt ($\theta: 0,05-0,15$) elkülönülés volt megfigyelhető (19. táblázat). A nagyobb egyedszámból álló 1-5. populációk esetében ez az eltérés gyakran szignifikánsnak mutatkozott.

A 19. táblázatban látható eredmények második részében a Nei-féle génáramlás mértéke található. A génáramlás a különböző populációban bekövetkező változások, mint például a migráció hatására bekövetkező genetikai változás a populációban. A fellépő génáramlás hatása rendszerint abban mutatkozik meg, hogy a populációk genetikai összetétele egyre hasonlóbba válik egymáshoz, és ezzel párhuzamosan a differenciálódás mértéke csökken. Ebből adódóan a génáramlás esetleges elmaradása viszont a genetikai differenciálódás mértékének növekedését vonja maga után. A génáramlás (N_m) értéke 0-1 között lehet, ahol a 0 érték esetében nincs génáramlás a populációk között, tehát a genetikai differenciáltság magas, míg az 1 közeli érték esetében a génáramlás mértéke nagy, és ezzel egyidőben a genetikai differenciáltság alacsony.

A génáramlás mértékét kiszámítva a különböző általunk vizsgált populációra vonatkoztatva az alábbi megállapítások tehetők. Mint már a Weir & Cockerham-féle fixációs index (θ) esetében, itt is külön ki kell emelni a 7. populációt, a portugál minták esetében egy nagyságrenddel alacsonyabb a génáramlás értéke, ($N_m: 0,028-0,096$) között alakult. Ilyen alacsony mértékű génáramlásnál rendszerint a genetikai differenciáltság nagyon magas, a többi vizsgált populációhoz képest nagy a genetikai különbség. A hét vizsgált populáció közül az 1. és a 2. populáció esetében volt a legmagasabb a génáramlás mértéke, itt ($N_m: 0,156-0,353$) között alakult. Ezek az értékek arra engednek következtetni, hogy a jelzett populációk esetében a genetikai differenciáltság alacsony, a többi vizsgált populációhoz képest a genetikai különbség alacsony.

4.2.6. Nei-féle genetikai azonosság és genetikai távolság

A begyűjtött különböző szubpopulációk genetikai mintázatának összehasonlítására meghatároztuk a Nei-féle genetikai azonosság (I) illetve a genetikai távolság (D) értékeit. A kalkulált értékeket a 20. táblázatban összegeztük. A genetikai azonosság lényegében annak az átlagos valószínűségét fejezi ki, hogy a két populációban véletlenszerűen kiválasztott allél azonos lesz-e. A genetikai azonosság (I) értékszáma egy lókuszra vonatkoztatva n allél esetén két populáció között:

$$I_{xy} = \frac{\sum (x_i - y_i)^2}{\sum x_i^2 + \sum y_i^2}$$

ahol x_i és y_i az i-edik allél gyakorisága a vizsgált X és Y populációban.

Minél közelebb van I értéke a 0-hoz, annál kevesebb közös allélt tartalmaz a két populáció. Ha $I = 1$, akkor az allélek gyakorisága a vizsgált lókuszra vonatkozóan azonos, ha $I = 0$, akkor az adott lókuszon az allél gyakoriságok teljesen eltérők a két populációban.

A vizsgált populációk közötti genetikai távolságot (D) az egyes populációkban tapasztalt allélgyakorisági értékek alapján kell kiszámítani. E mutatószám esetében különbséget kell tenni a standard genetikai távolság (D_S) illetve a minimum genetikai távolság (D_M) között. A standard genetikai távolság számítása során feltételezzük, hogy minden allél esetében a génsodródás és a mutáció egyensúlyban van. A minimum genetikai távolság mérése esetében feltételezzük, hogy a genetikai különbségeket a génsodródás és a mutáció együttesen okozza.

A számolás első lépésében a Nei-féle genetikai hasonlóságot kapjuk meg, amelyből egy egyszerű összefüggés segítségével határozhatjuk meg a genetikai távolságot:

$$D = -1 \ln \frac{\sum \sum X_u Y_u}{l u} \sqrt{\left(\frac{\sum \sum X_u^2}{l u} \right) \left(\frac{\sum \sum Y_u^2}{l u} \right)}$$

Ha $D = 0$, akkor az allélgyakoriságok azonosak. Ha a D értéke minél jobban megközelíti a maximális értéket, az 1-et, az allélgyakoriság annál jobban eltér a két populációban. Minél nagyobb a populációk közötti távolság, annál kevésbé hatékony a génáramlás.

I D	1. populáció	2. populáció	3. populáció	4. populáció	5. populáció	6. populáció	7. populáció
1. populáció		0,598	0,742	0,606	0,519	0,626	0,442
2. populáció	0,513		0,655	0,490	0,281	0,711	0,566
3. populáció	0,297	0,422		0,650	0,476	0,724	0,414
4. populáció	0,500	0,713	0,430		0,831	0,716	0,274
5. populáció	0,655	1,267	0,740	0,184		0,606	0,151
6. populáció	0,467	0,340	0,322	0,333	0,500		0,716
7. populáció	0,814	0,568	0,880	1,293	1,886	1,099	

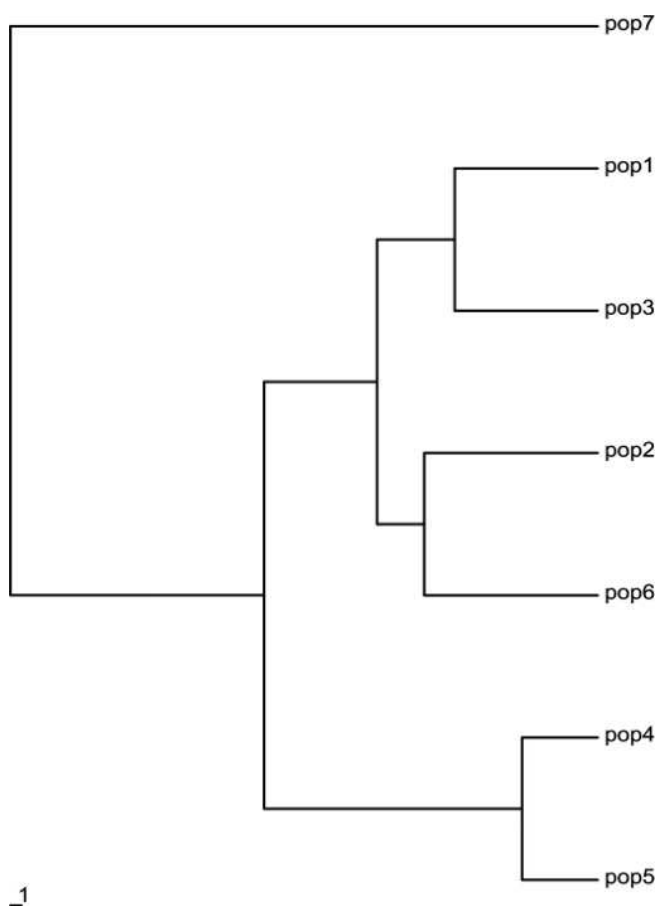
20. táblázat A mikroszatellit adatokból számított Nei-féle genetikai azonosság (I -vonal fölött) és genetikai távolság (D -vonal alatt). A szürkével kiemelt értékek esetén a genetikai hasonlóság nagy ($> 0,5$) volt. A Nei-féle (1972) genetikai azonosság a gének standard azonossága két populáció között, az értéke 0 (a két összehasonlított populáció különbözik) és 1 (a két összehasonlított populáció azonos) között változik.

A kapott eredményekből megállapítható hogy a populációk egymáshoz viszonyított genetikai azonossága a 7. populáció esetében volt a legalacsonyabb, tehát ez a populáció határozottan elkülönült a többitől. Az 1. és 2. valamint a 3. populáció esetében a Nei-féle genetikai azonosság magas értékeket mutatott, ezért e populációk esetében feltételezhető a részleges genetikai azonosság.

A 20. számú táblázatban összefoglalt adatokból megállapítható, hogy a populációk egymáshoz viszonyított genetikai távolsága a 6. illetve 7. populáció esetében volt a legnagyobb, tehát ez a két populáció határozottan elkülönült a többitől. Ezt az állítást támasztják alá a genetikai azonosságnál tapasztaltak is. Az 1. 2. 3. 4. illetve az 5. populáció esetében a Nei-féle genetikai távolság alacsony értéket mutatott, ezért e populációk esetében az allélgyakoriságok azonosnak mondhatók.

A mikroszatellit eredményekből kalkulált Nei-féle genetikai távolság alapján az UPGMA módszer segítségével törzsfát készítettünk, hogy azon keresztül szemléltessük a különböző populációk egymáshoz viszonyított távolságát. Az UPGMA módszer, vagy más néven csoportátlag módszer a két klaszter távolságát a pontok páronkénti távolságaival átlagolja. Az átlag súlyozatlan, tehát a pontokat egyenlő arányban vesszük figyelembe (RILEY, 2004).

A megrajzolt törzsfa nem mutat egyértelmű összefüggést a minták begyűjtési helyének földrajzi elhelyezkedése, és a közöttük lévő genetikai távolság között (46. ábra). A kutatási témánk gerincét képező, a Kárpát-medencéből származó minták több csoportba (clade) különültek el. Ennek valószínű oka, hogy Magyarországon több VCG csoport is előfordul, melyek különböző eredetűek, ezekre a VC eredmények kapcsán majd külön kitérek. Ezzel szemben jól megfigyelhető volt a 7. populáció (az ábrán pop7 elnevezéssel jelölt), a portugál minták éles elkülönülése a többi földrajzi csoporttól.



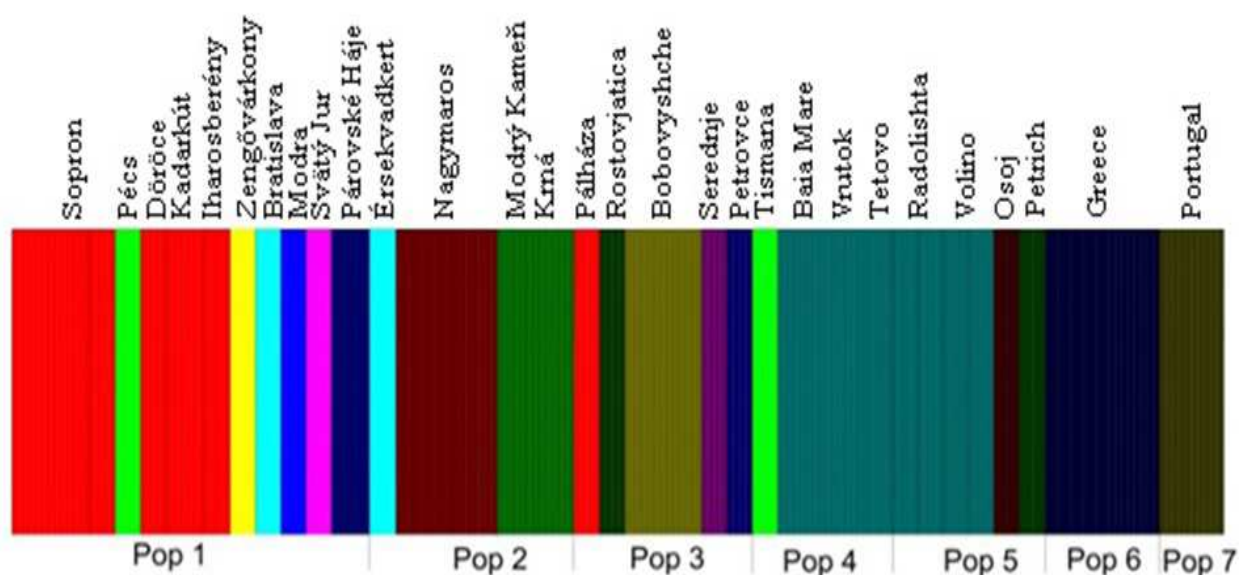
46. ábra A mikroszatellit eredményekből UPGMA módszer szerint a POPGENE program által rajzolt törzsfa a Nei-féle genetikai távolság alapján. A vonalak hossza arányos a csoportok közötti genetikai távolsággal. A pop 1- pop 7 a 1. – 7. populációkat jelöli.

4.2.7. BAPS analízis

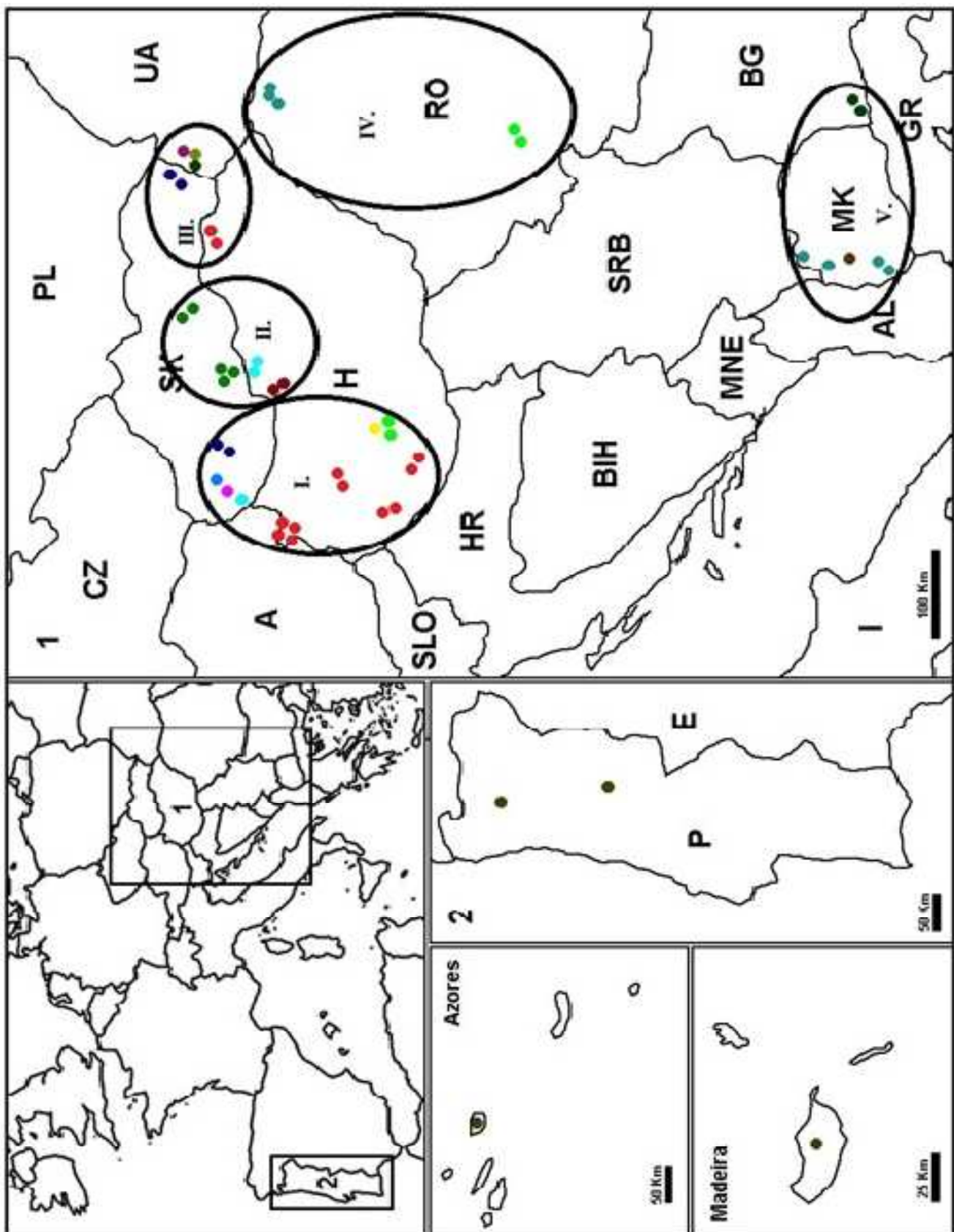
A BAPS program a Bayesian megközelítést használva határozza meg a populációban található egyedek legvalószínűbb csoportosítását. A program a molekuláris markerek (pl. DNS szekvenciák, mikroszatellit fragment hosszúság) adataiból határozza meg a populációk legvalószínűbb (posterior valószínűség) számát (k – klaszter szám), illetve megadja az egyedek csoporthoz tartozását. A megközelítés feltételezi, hogy a célpopuláció potenciálisan genetikailag strukturált úgy, hogy meghatározott körülmények korlátozzák közöttük a génáramlást.

A BAPS analízis a 29 különböző helyről begyűjtött mintát összesen 16 különböző csoportba különítette el (47. ábra). A 16 csoport elkülönülésének valószínűsége igen magas (0,9131) volt. Egyes távolabbi földrajzi helyekről származó csoportok (pl. Portugália, Görögország) egyértelműen elkülönültek.

A 48. számú ábra segítségével a földrajzi származás is láthatóvá válik. Ebből a szemléltető ábrából jól kivehető, hogy Kárpát-medence esetében több csoportra oszlott a *C. parasitica* populáció. A populációk hasonlósága, és a földrajzi elhelyezkedés között nem látható összefüggés. Az egymástól földrajzilag messzebb levő populációk közötti hasonlóság utalhat a fertőzés terjedésének emberi közreműködésére, behurcolására is, például szaporítóanyag, csemetefák által.



47. ábra A BAPS program által meghatározott populáció összetétel. Minden izolátumot egy színes oszlop jelöl. Az egyes elkülönülő klasztereket eltérő színek jelölik



48. ábra A BAPS analízis által kapott csoportok földrajzi elhelyezkedése a 47. ábrán már használt színekkel

4.3. A kutatási munkához kapcsolódó egyéb eredmények

2011. április 23-án az ukrajnai Bobovyshche, Serednje és Rostovjatica környékéről gyűjtöttünk kéregmintákat. Egy korábbi, 2009-es állapotfelméréshez képest a betegséggel fertőzött fáknál a pusztulási arány meghaladta a 90%-ot. Bobovyshche környékén a pusztuló szelídgesztenye fák mellett a kocsánytalan tölgyön is észrevettük a *C. parasitica*-ra jellemző rákos sebeket. Ezért a szelídgesztenye fákról nyert kéregminták mellé a tölgyekről is vettünk mintát. A tölgyfákról történő mintavétel során már szembetűnő jelek mutatkoztak arra, hogy valószínűleg a *C. parasitica* (MURR.) BARR gomba lehet felelős a látott sérülésekért. Ezt le is fényképeztük, amelyet a 49. ábra mutat. A fotón jól láthatók a kórokozóra jellemző narancssárga színű sztrómák is.



49. ábra A *Cryphonectria parasitica* tünetei az általunk megtalált és vizsgálatba bevont kocsánytalan tölgyön (Borhalom, Kárpátalja)

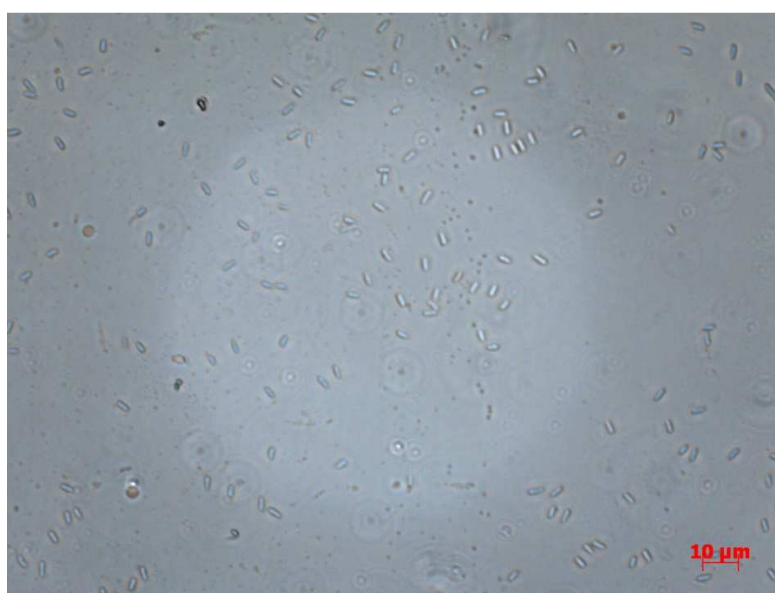
A begyűjtött kéregmintákat a tanszéki laboratóriumban 2 percig alkoholos oldatban fertőtlenítettük, hogy az esetleges bakteriális felülfertőzést megakadályozzuk, majd 1 percig steril desztillált vízben áztattuk. Ezt követően burgonya-dextróz agar táptalajt tartalmazó Petri- csészékbe helyeztük a tisztított mintákat. Már az első leoltás alkalmával látszott, hogy a kéregmintákban a *C. parasitica* van jelen. A második átoltás során a tiszta tenyészeteket burgonya-dextróz agar táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe helyeztük, és 10 napig a termosztátban 25 °C-on sötétben tartottuk az edényeket.

Miután a kórokozó jellegzetes telepei jól láthatóan kirajzolódtak a Petri-csészékben, fényképek segítségével dokumentáltuk a látottakat (50. ábra).



50. ábra A mintákból izolált *Cryphonectria parasitica* telepei PDA táptalajon (tölgyről származó izolátumok)

A táptalajra leoltott mintákat ezt követően mikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá. Célunk az volt, hogy megtaláljuk és lefotózzuk a kórokozó ivartalan szaporító képleteit, a konídiumokat. A konídiumok méretét olajimmerziós objektívvel 100x-os nagyítás mellett egy Zeiss Imager. H1 Axio típusú fénymikroszkóp segítségével határoztuk meg. A fényképeket a mikroszkóphoz tartozó Zeiss AxioCam MRc 5 típusú 5 megapixeles kamerával rögzítettük (51. ábra).



51. ábra A mintákból izolált *Cryphonectria parasitica* konídiumai fénymikroszkóp alatt

Az elkészített fotókon jól látszanak a *C. parasitica*-ra jellemző egysejtű hialin, ellipszoid vagy kissé bacillus alakú konídiumok. A szaporítóképletek mérete: 3,5µm x 1-1,5µm volt.

A konvencionális telepfotók és szaporítóképletek mikroszkopikus vizsgálatára hagyatkozó identifikálás mellett elvégeztük a minták molekuláris genetikai azonosítását is. A szakirodalom és a saját tapasztalatok alapján az ITS fragmentumra esett a választás, hogy egy nukleotid BLAST elemzéssel identifikáljuk a mintáinkat. A ITS fragment felszaporításához az SR6R és LR1 primer párt (WHITE et al, 1990) használtuk. A PCR termékek tisztítását a Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281) termékkel végeztük. A felszaporított és tisztított PCR-termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany cég végezte. Az így kapott szekvenciákat feltöltöttük a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> honlapra, ahol összehasonlítottuk az adatbankban szereplő ITS fragmentumokkal.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY309482.1	Cryphonectria parasitica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1055	1055	100%	0.0	99%	
EF545115.1	Cryphonectria parasitica strain A475 internal transcribed spacer 1, 5	1037	1037	100%	0.0	99%	
AY141855.1	Cryphonectria parasitica strain ATCC 38753 internal transcribed spac	1033	1033	97%	0.0	100%	
AY141859.1	Cryphonectria parasitica strain CB7 internal transcribed spacer 1, 5.8	1027	1027	97%	0.0	99%	
AY141858.1	Cryphonectria parasitica strain ES10 internal transcribed spacer 1, 5	1027	1027	97%	0.0	99%	
AY141856.1	Cryphonectria parasitica strain ATCC 38755 internal transcribed spac	1027	1027	97%	0.0	99%	
AY141857.1	Cryphonectria parasitica strain JA75 internal transcribed spacer 1, 5.	1020	1020	97%	0.0	99%	
AY141873.1	Cryphonectria parasitica strain DY23 internal transcribed spacer 1, 5	1014	1014	95%	0.0	100%	
AY141861.1	Cryphonectria parasitica strain 09269 internal transcribed spacer 1, 1	1005	1005	97%	0.0	99%	
GU993820.1	Cryphonectria parasitica strain 1155-2 18S ribosomal RNA gene, part	998	998	94%	0.0	99%	
AY141862.1	Cryphonectria parasitica strain 09546 internal transcribed spacer 1, 1	996	996	96%	0.0	98%	
AY141863.1	Cryphonectria parasitica strain 09154 internal transcribed spacer 1, 1	994	994	95%	0.0	99%	
AY141860.1	Cryphonectria parasitica strain 09509 internal transcribed spacer 1, 1	989	989	97%	0.0	98%	
DQ368749.1	Cryphonectria parasitica isolate CMW 14547 internal transcribed spa	972	972	91%	0.0	100%	
AY697931.1	Cryphonectria parasitica isolate CMW 8436 internal transcribed spac	972	972	91%	0.0	100%	
AY697930.1	Cryphonectria parasitica isolate CMW 10916 internal transcribed spa	972	972	91%	0.0	100%	
AY697929.1	Cryphonectria parasitica isolate CMW 13751 internal transcribed spa	972	972	91%	0.0	100%	
AY697928.1	Cryphonectria parasitica isolate CMW 13750 internal transcribed spa	972	972	91%	0.0	100%	
AY697927.1	Cryphonectria parasitica isolate CMW 13749 internal transcribed spa	972	972	91%	0.0	100%	
AF452123.1	Cryphonectria parasitica isolate CRY1509 internal transcribed spacer	972	972	91%	0.0	100%	
AF452122.1	Cryphonectria parasitica isolate CRY1512 internal transcribed spacer	972	972	91%	0.0	100%	
AF452121.1	Cryphonectria parasitica isolate CRY1558 internal transcribed spacer	972	972	91%	0.0	100%	
AF292043.1	Cryphonectria parasitica isolate CRY-1511 internal transcribed space	972	972	91%	0.0	100%	
AF292042.1	Cryphonectria parasitica isolate CRY-1507 internal transcribed space	972	972	91%	0.0	100%	
AF368330.1	Cryphonectria parasitica CRY1511/E9 internal transcribed spacer 1, 1	972	972	91%	0.0	100%	
AF368329.1	Cryphonectria parasitica CRY1507/E5 internal transcribed spacer 1, 1	972	972	91%	0.0	100%	
EU442645.1	Cryphonectria parasitica isolate C0721 internal transcribed spacer 1,	970	970	91%	0.0	100%	
EU442646.1	Cryphonectria parasitica isolate C0720 internal transcribed spacer 1,	970	970	91%	0.0	100%	

21. táblázat Az ITS szekvencia alapján végzett nukleotid BLAST összehasonlítás adatbázis táblázata

A nukleotid BLAST eredmény alapján a minta ITS szekvencia a *C. parasitica* faj ITS szekvenciájával mutatott homológiát (21. táblázat), melynek mértéke 100 % volt. A molekuláris biológiai vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a kocsánytalan tölgyek *C. parasitica* gomba által fertőzöttek.

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A kutatásunk alapját képező szelídgesztenye kéregrák, *C. parasitica* növénypatogén gomba 1904-ben történt írásos lejegyzése óta megállíthatatlanul söpört végig Észak-Amerikán, majd Európán. Több, mint 100 éve tudunk erről a kórokozóról, mégis nagyon nehéz és összetett feladat az ellene való védekezés. Fontos megemlíteni azt, hogy bármely betegségről legyen is szó, az ellene való sikeres védekezés kulcsa a kórokozó alapos biológiai ismerete. Ezen tudás birtoka nélkül nem tudunk választ adni azokra a kérdésekre, miszerint, Mikor? Milyen módon? és Hogyan? védekezzünk ellene.

Az elmúlt száz évben elvégzett nagyszámú és széleskörű kutatások nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy megismerjük a kórokozó biológiáját, számba vegyük a lehetséges tápnövények körét, a nagysebességű terjedés lehetséges okait. Ezzel egy időben megkezdődött a védekezés lehetséges módjainak felkutatása. Az évek során a növényvédelem tudásbeli és technológiai fejlődése próbált lépést tartani a kórokozóval. Napjainkban az integrált növényvédelem szemléletének terjedése segít kiaknázni a növénynevelésben, az agrotechnikában és a biológiai növényvédelemben rejlő, eddig kihasználatlan lehetőségeket. Pusztán vegyszeres növényvédelem alkalmazása a szelídgesztenye kéregrák ellen csak nehezen kivitelezhető, és hatékonysága is erősen kérdéses.

Számos kutatás és vizsgálati eredmény áll rendelkezésünkre, viszont a kórokozó elleni biológiai védekezés lehetséges módjairól. Napjainkban is a leginkább kutatott témák körébe tartozik, pedig már több mint 50 éve írták le a hipovirulencia jelenséget először. A szelídgesztenye esetében Olaszországban fedezték fel először, hogy Genova környékén egy erősen fertőzött állományban, a besüppedt rákos sebek felszínén begyógyult nekrosisok voltak találhatóak. Mint azt később kiderítették, egy kettős szálú RNS-t tartalmazó köpenyfehérjével nem rendelkező mikovírus gyengítette le a kórokozót. A védekezés alapját a vegetatív kompatibilitás határozza meg, mert hatékony felülfertőzést csak vegetatív kompatibilis törzsek között tudunk elérni. Ennek érdekében hatalmas munka árán sikerült vegetatív kompatibilitási csoportokba sorolni Észak-Amerika és Európa szelídgesztenye kéregrák populációit. Egyes szabadföldi kísérletek akár 70%-os gyógyulási arányt is képesek voltak elérni, éppen ezért nagy lehetőség rejlik ebben a módszerben. Bár a nagyszabású felmérések segítségével sikerült meghatározni az egyes szelídgesztenye termőrégiók uralkodó VC csoportjait, úgy tűnik, ez nem tekinthető állandónak, hiszen sorra jelennek meg új VC csoportok, és ezáltal az addig alkalmazott törzsek már nem képesek olyan hatékonysággal működni, mint azt addig tapasztalták.

Az általunk elvégzett hagyományos biológiai vizsgálatok a begyűjtött minták esetében a vegetatív kompatibilitási csoportok meghatározására irányultak. Itt ki kell emelni azt, hogy kisebb mintaszámmal dolgoztunk, ellentétben azokkal a kutatási munkákkal ahol ez a téma képezte a gerincét a vizsgálatoknak. A redukált mintaszámok ellenére is sikerült olyan VC csoportok jelenlétét kimutatni, amelyek eddig nem voltak megtalálhatók az adott populációban. Az ukrajnai és a nagybányai termőterületeken legutóbb 2006-ban TARCALI végezte el a felméréseket, és az azóta eltelt 4-5 év alatt jelentek meg az új VC csoportok. Ez azt bizonyítja, hogy fontos a szelídgesztenye állományok folyamatos monitoringja, mert ha nem sikerül időben felfedezni a megjelenő új vegetatív kompatibilitási csoportokat, az addig elvégzett védekezés sikeressége is veszélybe kerül. Eredményeink alapján javasoljuk a szelídgesztenye állományok legalább 5 évenkénti felülvizsgálását és állapotfelmérését. Fontosnak tartjuk, hogy nem csak a védekezésbe bevont művelt állományokat monitorozzák, hanem a nem művelt területeket is, mivel csak így kapható teljes kép az állományokról. Ebből fakadóan nagyobb szerep járul az egyetemi laborokra és a versenyszférában működő egyéb diagnosztikai központokra is.

A Kárpát-medence szelídgesztenye termőkörzetei már régóta képezik a vegetatív kompatibilitási vizsgálatok középpontját. Az általunk kapott és a szakirodalomban található eredmények alapján kijelenthető, hogy nagy diverzitás jellemzi azt. Ezzel ellentétben a Balkán-félszigeten ennek a diverzitásnak a mértéke jóval alacsonyabb. A hagyományos biológiai vizsgálatok nem tudnak kielégítő választ adni arra a kérdésre, hogy mitől alakult ki ez a nagymértékű diverzitás. Ennek esetleges okait jó hatékonysággal csak a molekuláris biológia adhatja meg. A kórokozó megismerését nagy mértékben elősegítette az is, hogy a 20. század végére teret hódított a molekuláris biológia, és azon belül is a molekuláris taxonómia. Ennek a rohamos mértékben fejlődő tudományágnak hatalmas, számítógépes kapacitás igénye van, valamint nem elhanyagolható technológiai szükséglete sem. Számos kutatás és vizsgálat eredménye alapján megállapítható, hogy a DNS szekvencia analízis által generált adatokból lehet következtetni legnagyobb biztonsággal a különböző fajok törzsfelődésének alakulására, rokoni kapcsolataira és a fajon belüli eltérő populációk genetikai távolságára. A számítógépes adatfeldolgozás segítségével törzsfák rajzolhatók amelyek nagyon jól szemléltetik a különböző minták egymáshoz való viszonyait, távolságait. A molekuláris biológiai vizsgálatok elengedhetetlen kelléke a megfelelő technológiai háttér és laboranyag-ellátás. A kutatásaink során szerencsénkre a tanszék molekuláris biológiai laborja minden feltételt biztosítani tudott. A terepi munkák során a Kárpát-medencéből és a Balkán-félszigetről gyűjtött mintákat összevetettük a Portugáliából kapott izolátumokkal, remélve azt,

hogy kimutatható és markáns genetikai különbség lesz a populációk között. A szakirodalmak alapos áttanulmányozása után a *tefl* és az ITS molekuláris markerek felhasználása volt megalapozott. E génszakaszokat sok esetben használták már fel a filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára növény-, -állat- és gombafajok esetében is. Szükség volt legalább két különböző génszakasz vizsgálatára is, mert minél több génszakaszt vizsgálunk és hasonlítunk össze, annál pontosabbá és megbízhatóbbá válik a kapott eredmény. A *tefl* gén filogenetikai kutatásokhoz való felhasználását az teszi lehetővé, hogy az EF-1 α fehérje, és így a fehérjét kódoló gén is erősen konzervatív az élővilágban. Ebből következik, hogy jellemzően fajok közötti filogenetikai kapcsolatok felkutatására alkalmazzák, felhasználhatósága korlátozott a fajon belüli kapcsolatok jellemzésére. Az általunk kapott eredmények is ezt támasztották alá, mivel a *tefl* génszakasz segítségével megrajzolt filogenetikai törzsfák nem mutatott markáns különbséget a vizsgált populációk között, nem alakultak ki a különböző kládok. További problémát okozott az is, hogy sok esetben tapasztaltunk kevert szekvenciákat, és a PCR paraméterek többszöri beállítása, megismételt tenyésztés utáni DNS izolálást követően sem sikerült értékelhető szekvencia eredményeket kapni. Ezek alapján a *tefl* génszakaszt a *C. parasitica* esetében mint identifikálást segítő génszakaszt tudjuk ajánlani. A különböző populációk filogenetikai jellemzésére eredményeink alapján nem javasolt. Fontos megemlíteni, hogy a génbanki *C. parasitica tefl* szekvenciák a tapasztalatok szerint nem voltak megbízhatók.

A nagy variabilitású, nem kódoló ITS génszakasz felhasználása általánosan elterjedt a taxonok közötti rokonsági viszonyok feltárásához. Segítségével az osztály, a család, a nemzetség, faj kapcsolatok modellezése nagy biztonsággal elvégezhető, ezért e génszakaszokat számos kutató alkalmazta munkája során. Az ITS génszakaszra kismértékű szelekció hat, ezáltal a mutációk valószínűsége nagy, a variabilitás nagy, a génszakasz evolúciósan erősen változékony. E tulajdonság lehetővé teszi a nem-kódoló régiók alkalmazását a többségében alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok vizsgálatánál, például közeli rokon fajok vagy populációk egymástól való elkülönítéséhez. Az ITS szakasz felhasználása alapján kapott eredmények ismeretében az alábbi következtetéseket tesszük. A *C. parasitica* izolátumok függetlenül attól, hogy azok saját gyűjtésből vagy az adatbankból származtak, külön csoportokat alkottak, és elkülönültek a közeli rokon *Cryphonectria*, *Endothia* és az *Endothiella* fajoktól. Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a választott ITS fragment jól alkalmazható a *Cryphonectria* és *Endothia* nemzetség különböző fajainak szétválasztására. Ezen eredmények alapján a ITS génszakaszt a *C. parasitica* esetében mint identifikálást segítő génszakaszt tudjuk ajánlani. Ezzel szemben a fajon belüli szubpopulációk

szétválasztása már nem tűnik ennyire egyértelműnek. Bár lényegesen jobb eredményt kaptunk, mint a *tef1* génszakasz esetében, de itt is jellemző volt, hogy a különböző földrajzi helyekről származó populációk egyedei keveredtek egymással, és így alakultak ki a törzsfán megfigyelhető kládok. E tapasztalatok alapján az ITS génszakasz sem alkalmas pusztán csak populációk elkülönítésére a *C. parasitica* esetében. További vizsgálatok alapját képezheti a meglévő ITS szekvenciák összevetése az Észak-Amerikából és az Ázsiából származó ITS szekvenciákkal, mert ez a génszakasz valószínűleg nagyobb léptékű, de fajon belüli genetikai távolságot jól indikálhatja.

A mikroszatellitek filogenetikai elemzésekre való alkalmazása a gombák esetében az utóbbi években általánossá vált. A más néven egyszerű szekvencia ismétlődésnek (SSR - Simple Sequence Repeat) vagy rövid tandem ismétlődésnek (STR - Short Tandem Repeat) nevezett molekuláris biológiai markerek sikeresen felhasználhatók nagy felbontású genetikai térképek elkészítésére. A mikroszatellitek filogenetikai és populációgenetikai vizsgálatokban való elterjedt és széleskörű alkalmazhatóságát az teszi lehetővé, hogy nagyon könnyen amplifikálhatók, nincsenek állandó szelekciós nyomás alatt, valamint, nagy számban fellelhetők a genomban. Fontos megemlíteni továbbá azt is, hogy a mikroszatellitek általánosan elterjedtek mind a prokarióta, mind az eukarióta genomban, tehát mint univerzális markerek széles körben felhasználhatók. A *tef1* és az ITS génmarkerek esetében a szekvenálás során kapott aminosav sorrendek alapján történt az összevetés, ezzel szemben a mikroszatelliteknel nem történt szekvenálás, itt a gélelektroforézis során kapott fragmenthosszúság képezi az összehasonlítás alapját. Az előbbi esetben egy kvalitatív, míg az utóbbi esetben egy kvantitatív jellegű vizsgálatról beszélhetünk. Az így kapott eredmények elemzése után megállapítható, hogy a mikrosatellit elemzés lényegesen érzékenyebb módszer a populációk szétválasztására. A BAPS analízis, valamint az UPGMA módszer segítségével megrajzolt törzsfák pontosabban jelezte a populációk helyét, mint azt a *tef1* és az ITS genetikai markerek esetében tapasztaltam. A BAPS analízis által generált eredményekből kitűnik, hogy a összes minta közül a legnagyobb földrajzi távolságból származó portugál minták egyértelműen külön kládba kerültek. A szelídgesztenye kéregrák populációk közötti genetikai differenciáinak elemzésére az általunk vizsgált három genetikai marker közül a mikroszatellitek a legalkalmasabbak. További vizsgálatok célját képezheti minél több mikrosatellit génszakasz felhasználása, továbbá Észak-Amerikából és Ázsiából származó minták vizsgálatba vonása. Az eredmények megbízhatóságának további pontosítása céljából érdemes lehet nem csak a fragmenthosszúság vizsgálata, hanem a szekvenálás segítségével az aminosav sorrend elemzése is.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Magyarországon, Szlovákiában, Romániában, Ukrajnában, Macedóniában és Bulgáriában elvégzett terepi mintavételezések során begyűjtött szelídgesztenye és kocsánytalan tölgy kéregmintákból sikeresen izoláltunk, majd felszaporítottuk a szelídgesztenye kéregrák *C. parasitica* kórokozót. Minden begyűjtött minta GPS koordinátáját dokumentáltuk. Ezt követően elhelyeztük a 99 külföldi és az 50 magyarországi mintát a Növényvédelmi Intézet törzsgyűjteményébe. Ezáltal lehetővé vált az általunk is vizsgált minták további kutatásokba való bevonása.
2. A Kárpát-medencei szelídgesztenye termőterületekről származó *C. parasitica* izolátumok vegetatív kompatibilitási vizsgálatai során a Serednje mellett található 4 mintaterületen sikerült kimutatni az EU-12 és az EU-13 törzs jelenlétét. Úgy szintén megtalálható volt a fent említett két VC törzs a Bobovyshe (Borhalom) település határából és a Rostov'yatisya mellett található erdőből származó mintákban is. Ezeken a termőterületeken a vonatkozó szakirodalmi adatok alapján eddig csak az EU-12 kompatibilitási csoport volt jelen. A romániai Nagybánya mellett található Tăuții-Măgherauș (Miszmogyorós) termőkörszetben az EU-12 törzs mellett szintén sikerült kimutatni az EU-13 vegetatív kompatibilitási csoport jelenlétét is. Ezek az eredmények segíthetnek a hipovirulens törzsek hatékony felhasználásában a biológiai növényvédelem keretein belül.
3. A vizsgálatba vont szelídgesztenye kéregrák minták *tefl* szekvenciáit felhasználva megkíséreltük meghatározni a különböző termőrégiók populációinak genetikai távolságát. A kapott eredményekből készített filogenetikai törzsfa elemzése egyértelműen bebizonyította, hogy a *tefl* genetikai marker nem alkalmas a szelídgesztenye kéregrák *C. parasitica* növénypatogén gombafaj különböző földrajzi elhelyezkedésű populációinak egymáshoz viszonyított genetikai differenciáltságának pontos meghatározására, a populációk elkülönítésére. Az összehasonlítást elősegítően a molekuláris génbankból letöltöttünk amerikai szelídgesztenye kéregrák szekvenciákat, de ezek megbízhatósága a kapott eredmények alapján kérdéses. Az általunk is használt molekuláris génbank (GenBank) adatbázisába sikeresen feltöltöttük 63 *C. parasitica* izolátum *tefl* szekvenciáját.

4. A *tefl* genetikai markerhez hasonlóan az ITS szekvenciákkal is elvégeztük az összehasonlító vizsgálatokat. A molekuláris génbank (GenBank) adatbázisából letöltött *C. parasitica* és más *Cryphonectria*, valamint *Endothiella* és *Endothia* nemzetség fajainak ITS szekvenciáit is beépítettük a szekvencia vizsgálatokba. A kapott eredményekből készített filogenetikai törzsfá elemzése rámutatott arra, hogy az ITS genetikai marker jól alkalmazható a *Cryphonectria* valamint *Endothiella* és *Endothia* nemzetség tagjainak szétválasztására, de nem ad pontos és megbízható eredményt a *C. parasitica* növénypatogén gombafaj különböző földrajzi elhelyezkedésű populációinak egymáshoz viszonyított genetikai differenciáltságának pontos meghatározására, a populációk elkülönítésére. Az elemzést követően az általunk is használt molekuláris génbank (GenBank) adatbázisába sikeresen feltöltöttünk 85 *C. parasitica* izolátum ITS szekvenciát.
5. Elsők között használtuk fel a *C. parasitica* gombafaj genomjából 6 mikroszatellit, hogy meghatározzuk a különböző termőrégiók populációinak genetikai távolságát. A *tefl* és az ITS genetikai markerek esetében történt vizsgálatokkal szemben itt a gélelektroforézis során kapott fragmenthosszúság képezte az összehasonlítás alapját. A kapott eredmények statisztikai elemzését követően megállapítottuk, hogy a felhasznált mikroszatellitek segítségével a portugál minták mint a legnagyobb földrajzi távolsággal bíró minták jól elkülönültek a Kárpát-medencei és a Balkán-félszigetről származó mintáktól. Ezáltal az általunk vizsgált három genetikai marker közül a mikroszatellitek tűnnek a legalkalmasabbnak a *C. parasitica* fajon belüli populációinak genetikai alapú elkülönítésére.
6. Elsőként sikerült kimutatni a szelídgesztenye kéregén *C. parasitica* kórokozó kártételét kocsánytalan tölgy gazdanövényen, az ukrain Bobovyshe (Borhalom) település határában található erdőből származó mintákban. A kórokozó jelenlétének megerősítését először a klasszikus kórtani módszerekkel, táptalajon való tenyésztéssel, majd annak vizuális vizsgálatával és a konídiumok megvizsgálásával végeztük el. Ezt követően molekuláris biológia vizsgálatokkal identifikáltuk a kórokozót. Ebben az esetben a már korábban is alkalmazott ITS génmarkert használtuk fel, és a kapott szekvenciák nukleotid BLAST elemzése során a vizsgált szekvencia a *C. parasitica* kórokozóval mutatott 100%-os homológiát.

7. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

1. A vegetatív kompatibilitási vizsgálatok során az ukrainai Serednje, Bobovyshche (Borhalom) és Rostov'yatisya mellett gyűjtött minták, valamint a romániai Nagybánya mellett található Tăuții-Măgherauș (Miszmogyoros) termőkörszétből származó minták esetében az EU-12 törzs mellett sikerült kimutatni az EU-13 vegetatív kompatibilitási csoport jelenlétét is. Ezek az eredmények segíthetnek a hipovirulens törzsek hatékony felhasználásában a biológiai növényvédelem keretein belül. Az esetleges kezelések során a fent említett VC csoportokkal kompatibilis oltóanyagokat szükséges felhasználni. A korábbi vizsgálatok megismétlése által nyilvánvalóvá vált, hogy rövid idő alatt képes megjelenni a kórokozónak más, eddig az adott területen nem jellemző VC csoportja is, ezáltal fontossá válik az állományok folyamatos monitoringja.
2. Az általunk elvégzett filogenetikai vizsgálatok során kapott szekvenciák a GenBank adatbázisba való feltöltés által nyilvánosakká váltak, a szekvencia sorrendek letölthetőek. Ezáltal, ha a kórokozó konvencionális kórtani identifikálása akadályba ütközne, molekuláris biológiai vizsgálatok, ITS valamint *tefl* markerek alkalmazásával az eredményeink összehasonlítási alapot képezhetnek. A molekuláris biológiai vizsgálatok által kapott adatok a kórokozó alapkutatását bővítik, és felhasználásuk mind a további kutatásokban mint a szabadföldi védekezésben is lehetséges.
3. A kórokozó molekuláris biológiai jellemzésére felhasznált mikroszatellitek vizsgálata során kapott törzsfá megbízható módon jellemezte a Kárpát-medencei és a Balkán félszigetről származó minták genetikai távolságát. Az eredmények azt mutatták, hogy közeli rokon populációkról beszélhetünk és ez segítséget nyújthat a kórokozó terjedési irányának a meghatározásában. A kórokozó elleni összehangolt védekezés alapját képezi, hogy megismerjük a kórokozó elterjedésének részleteit, valamint pontos irányát.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatásunk alaptémáját szolgáltató szelídgesztenye kéregrák *C. parasitica* kórokozó gombafaj Kárpát-medencei populációinak részletes feltérképezése kulcsfontosságú az ellene való védekezés megszervezésében. Munkánk során segítségül hívtuk a konvencionális növénykórtani módszerek mint például a vegetatív kompatibilitási tesztek mellett a molekuláris biológia és filogenetika nyújtotta eljárásokat is. A Kárpát-medencei populációkból származó mintákat összevetettük a Balkán-félszigetről (Macedónia, Görögország, Bulgária) valamint Portugália több pontjáról származó mintákkal. A vegetatív kompatibilitási tesztek elvégzése után sikerült olyan vegetatív kompatibilitási csoportok jelenlétét kimutatni, amelyek eddig nem voltak megtalálhatóak az adott populációban. Az ukrainai és a nagybányai termőterületeken megjelent új EU-13 vegetatív kompatibilitási csoport a 2006-ban elvégzett felmérések eredményei szerint még nem volt jelen. Tehát az eltelt 4-5 év elegendőnek bizonyult arra, hogy új csoportok jelenjenek meg a populációban. Ez azt bizonyítja, hogy fontos a szelídgesztenye állományok folyamatos monitoringja, mert ha nem sikerül időben felfedezni a megjelenő új vegetatív kompatibilitási csoportokat, az addig elvégzett védekezés sikeressége is veszélybe kerülhet.

A vonatkozó szakirodalmak alapos elemzése során a *tefl* és az ITS molekuláris markerek felhasználása a vizsgálatainkba kézenfekvőnek bizonyult. Ezen génszakaszokat számos kutatásban használták már fel a filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára növény-, -állat- és gombafajok esetében is. Szükséges volt legalább két különböző génszakasz vizsgálatára is, mert minél több génszakaszt vizsgálunk és hasonlítunk össze annál pontosabbá és megbízhatóbbá válik a kapott eredmény. A vizsgálatba vont szelídgesztenye kéregrák minták *tefl* szekvenciáit felhasználva megkíséreltük meghatározni a különböző termőrégiók populációinak genetikai távolságát. A *tefl* gén filogenetikai kutatásokban való alkalmazhatóságának alapja az, hogy az EF-1 α fehérje, és így a fehérjét kódoló gén is erősen konzervált az élővilágban. Az összehasonlításban szereplő 65 *tefl* szekvenciából generált eredmények is azt támasztották alá, hogy mivel a *tefl* génszakasz ezen tulajdonsága miatt a megrajzolt filogenetikai törzsfa nem mutatott markáns különbségeket a vizsgált populációk között, nem alakultak ki a különböző kládok. További problémát okozott az is, hogy sok esetben tapasztaltam kevert szekvenciákat, és a PCR paraméterek többszöri beállítása és megismételt tenyésztés utáni DNS izolálást követően sem sikerült értékelhető szekvencia eredményeket kapni. Ezek alapján a *tefl* filogenetikai marker a *C. parasitica* esetében mint identifikálást segítő génszakasz nem megfelelő, és ezért nem ajánlott.

Az ITS génszakasz használata mellett az szövege, hogy nagy variabilitású, és ezáltal a felhasználása általánosan elterjedt a taxonok közötti rokonsági viszonyok feltárásához. Az ITS génszakaszt kismértékű szelekció befolyásolja, ezáltal a mutációk valószínűsége nagy, a variabilitás nagy, a génszakasz evolúciósan erősen variábilis. E tulajdonság lehetővé teszi a nem-kódoló régiók alkalmazását a többségében alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok vizsgálatánál, például közeli rokon fajok vagy populációk egymástól való elkülönítéséhez. Az összehasonlítás alapját a saját gyűjtésből származó 85 *C. parasitica* ITS szekvencia, valamint 46 közeli rokon *Cryphonectria*, *Endothia* és *Endothiella* fajoktól származó szekvencia képezte. A kapott törzsfán jól látható volt hogy, a minták függetlenül attól, hogy azok saját gyűjtésből vagy az adatbankból származtak, külön csoportokat alkottak, és elkülönültek a közeli rokon *Cryphonectria*, *Endothia* és *Endothiella* fajoktól. Ez az eredmény azt támasztja alá, hogy a választott ITS fragment jól alkalmazható a *Cryphonectria* és az *Endothia* nemzetség különböző fajainak szétválasztására. Ezek alapján az ITS filogenetikai marker a *C. parasitica* esetében mint identifikálást segítő génszakasz jól alkalmazható, de a fajon belüli populációk változására nem megfelelő érzékenységgel reagál.

Az összehasonlító vizsgálatok során a fent említett genetikai markerek mellett teszteltük a mikroszatellitek alkalmazhatóságát. A mikroszatellitek filogenetikai és populációgenetikai vizsgálatokban való elterjedt és széleskörű felhasználhatóságát az teszi lehetővé, hogy nagyon könnyen amplifikálhatók, nincsenek állandó szelekciós nyomás alatt, valamint, hogy nagy számban fellelhetők a genomban. A *C. parasitica* gombafaj genomjából 6 mikroszatellitet amplifikáltunk, és a gélelektroforézis során kapott fragmenthosszúság alapján elvégeztük a populációk összehasonlítását. A kapott eredmények statisztikai elemzését követően megállapítottuk, hogy a felhasznált mikroszatellitek segítségével a portugál minták mint a legnagyobb földrajzi távolsággal bíró minták jól elkülönültek a Kárpát-medencei és a Balkán-félszigetről származó mintáktól. A BAPS analízis, valamint az UPGMA módszer segítségével megrajzolt törzsfá pontosabban jelezte a populációk helyét, mint azt a *tefl* és az ITS genetikai markerek esetében tapasztaltuk. Az általunk vizsgált filogenetikai markerek közül a mikroszatellitek mutatták a legnagyobb érzékenységet a szelídgesztenye kéregénél *C. parasitica* különböző populációinak genetikai variabilitására.

9. SUMMARY

The detailed analysis of populations of chestnut blight pathogen fungus species *C. parasitica* in the Carpathian Basin that is the core subject of the present research work is a key step for the organisation of the defence measurements against the disease. Beside conventional phytopathogenic methods just like vegetative compatibility tests molecular biology and phylogenetic methods were applied in this present work. Samples collected in the territory of the Carpathian Basin were compared with samples of populations of Balkans (Macedonian, Greek and Bulgarian) and Portuguese origin. During the execution of vegetative compatibility tests the presence of vegetative compatibility groups could be confirmed that were not identified previously in the given population. The vegetative compatibility group EU-13 detected in the production regions in Ukraine and in the surroundings of Baia Mare were not identified in the previous monitoring executed in 2006. So elapsed time of 4-5 years proved to be sufficient for the appearance of new groups in the populations. This confirms that the continuous monitoring of chestnut populations is of prior importance because in case new vegetative compatibility groups are not detected in due time, the effectivity of protection managements applied till then can be risked.

According to the thorough analysis of relative literature data the application of *tefl* and ITS molecular markers in the present research analyses proved to be obvious. These gene fragments were used in several previous research works for the analysis of phylogenetic relationships in case of plant, animal and fungi species as well. The analysis of at least two gene fragments was essential, because the more gene fragments are analysed and compared the more reliable and exact the obtained results will be. Based on the analysis of *tefl* sequences of chestnut blight samples involved in this research work the genetic distance between the populations of different production region was attempted to be determined. The use of *tefl* gene in phylogenetic research work is confirmed by the fact that the protein EF-1 α and the gene encoding this protein are strongly preserved in the ecosystem. The results obtained based on 65 *tefl* sequences involved into the comparison confirmed that, because the drawn phylogenetic tree did not show strong differences between the analysed populations, no different clades could be formed. It can be considered as a further problem that mixed sequences were found in several cases and no evaluable sequence result could be obtained after the DNA isolation and the multiplied re-setting of PCR parameters. Therefore the *tefl* phylogenetic marker is not an applicable gene fragment for identification in case of *C. parasitica*, so its use is not recommended.

Application of the ITS gene fragment in order to describe relations between taxa is supported due to its high variability and that it is commonly current. Low extent of selection affects the ITS gene fragment, therefore the probability of mutations is high, variability is high and the gene fragment is evolutionary variable. This character enables the use of non-coding regions in most of the analyses on taxonomy relationships of lower level, for example for the isolation of close relative species or populations. 85 *C. parasitica* ITS sequences of own collection, just as 46 sequences of the close relative *Cryphonectria*, *Endothia* and *Endothiella* species were the basis of the comparison. According to the phylogenetic tree drawn it can be stated that independently from their sampling origin (own collection or data bank) samples formed distinct groups and could be separated from the close relative *Cryphonectria*, *Endothia* and *Endothiella* species. This result confirms that the chosen ITS fragment can be successfully used for the separation of different species of the genera *Cryphonectria* and *Endothia*. Therefore the ITS phylogenetic marker is an applicable gene fragment for identification in case of *C. parasitica*, however it does not show adequate sensitivity towards the changes of populations within a species.

During the comparative analyses the applicability of microsatellite markers was tested beside the two genetic markers mentioned above. The common and large-scale applicability of microsatellites in phylogenetic and population-genetic analyses is enabled by the fact that they can be amplified very easily, they are not subjected to selection pressure and they can be found in high quantity in the genome. 6 microsatellites from the genome of the fungus species *C. parasitica* were amplified and used for the comparison of populations on the basis of fragment length provided by gel electrophoresis. According to the statistical evaluation of the obtained results it can be stated that Portuguese samples – as samples characterized by the longest geographical distance – could be clearly separated from the samples from the Carpathian Basin and the Balkans using the involved microsatellites. The phylogenetic tree drawn according to the BAPS analysis and the UPGMA method referred to the location of populations more exact than as observed in case of the genetic markers *tefl* and ITS. Among the phylogenetic markers studied in this present research work the highest sensitivity for the genetic variability of different chestnut blight *C. parasitica* populations was observed in case of the analysis of microsatellite markers.

10. FELHASZNÁLT IRODALOM JEGYZÉKE

- ABREU, C. (1992): A hipovirulência como forma de luta natural contra o cancro do castanheiro. *Revista das Ciências Agrárias*. **1–2**:167–169.
- AGAPOW, P. M., BURT, A. (2001): Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Notes*. **1**:101–102.
- AKDOGAN, S., ERKAN, E. (1968): Attention! Chestnut blight was seen. *Tomurcuk*. **1**:4–5.
- AKILLI, S., KATIRCIOĞLU, Y. Z., MADEN, S. (2009): Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica*, causal agent of chestnut blight, in the Black Sea region of Turkey. *Forest Pathology*. **39**: 390–396.
- ALLEMANN, C., HOEGGER, P., HEINIGER, U., RIGLING D. (1999): Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using RFLP markers. *Mol. Ecol.* **8**:843–854.
- ALLEN, T. D., DAWE, A. L. NUSS, D. L. (2003): Use of cDNA microarrays to monitor transcriptional responses of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* to infection by virulence-attenuating hypoviruses. *Eukaryotic Cell*. **2**:1263–1265.
- ÁLVAREZ, I. WENDEL, J. F. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**:417–434.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. (1977): Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. *Exp. Mycol.* **1**:306–316.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. (1983): Conversion to curative morphology in *Endothia parasitica* and its restriction by vegetative compatibility. *Mycologia*. **75**:777–780.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. (1987): Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*. **79**:23–37.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. (1992): Measuring resistance of chestnut trees to chestnut blight. *Canadian Journal of Forest Research*. **22**:568–571.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. (1998): Introduction of new genotypes into ascospore progeny of *Cryphonectria parasitica* in the field. *Mycological Research*. **102**:685–686.
- ANAGNOSTAKIS, S. L., CHEN, B., GELETKA, G. M., NUSS, D. L. (1998): Hypovirus transmission to ascospore progeny by field released transgenic hypovirulent strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*. **86**:301–310.
- ANAGNOSTAKIS, S. L., WAGGONER, P. E. (1981): Hypovirulence, vegetative incompatibility and the growth of cankers of chestnut blight. *Phytopathology*. **71**:1198–1202.
- ANDERSON, P. J., ANDERSON, H. W. (1912): The chestnut blight fungus and related saprophyte. *Phytopathology*. **2**:204–210.
- ANDERSON, P. J., BABCOCK, D. C. (1913): Field studies on the dissemination and growth of the chestnut blight fungus. *Pennsylvania Chestnut Tree Blight Comm. Bull.* **3**:46.
- ARI, E. (2012): Molekuláris filogenetikai elemzések egy diszkrét matematikai módszer, a Boole analízis segítségével. Doktori értekezés. Budapest. 111 p.
- ARI, E., ITTYES, P., PODANI, J., LE THI, Q. C., JAKO, E. (2012): Comparison of Boolean analysis and standard phylogenetic methods using artificially evolved and natural mttRNA sequences from great apes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **63**:193–202.
- AVISE, J.C. (2004): Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- BALDAUF, S. L., DOOLITTLE, W. F. (1997): Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa): Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **94**:12007–12012.
- BALDWIN, B. G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **1**:3–16.

- BARR, M. E. (1978): The *Diaporthales* in North-America. Mycologia Memoir. 7. ed: J. Cramer, Lehne, Germany. 232 p.
- BATSON, W. E., WITCHER, W. (1968): Live oak cankers caused by *Endothia parasitica*. Phytopathology. **58**:1473-1475.
- BAZZIGHER, G.(1955): Über Tannin und Phenolspaltende Fermente von *Endothia parasitica*. Phytopathol. Z. **24**:265-282.
- BAZZIGHER, G., KANZLER, E., KUHLE, T. (1981): Irreversible Pathogenitätsverminderung bei *Endothia parasitica* durch übertragbare hypovirulenz. Eur. J. For. Pathol. **11**:358-369.
- BÁTORINÉ, KUSZA, SZ. (2006): A genetikai távolság becslése cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállományok között, valamint három nem klasszikus immunogén kifejeződés és polimorfizmus vizsgálata sertés esetében. Doktori Értekezés. 2006 Debrecen.
- BIELLA, S., SMITH, M. L., AIST, J. R., CORTESI, P., MILGROOM, M. G. (2002): Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. Proc. R. Soc. Lond. B **269**:2269-2276.
- BINDER, M., HIBBETT, D.S. (2002): Higher-level phylogenetic relationships of *Homobasidiomycetes* (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. Molecular Phylogenetics and Evolution. **22**:76-90.
- BIRAGHI, A. (1950): Caratteri di resistenza in *Castanea sativa* nei confronti di *Endothia parasitica*. Boll. Stn. Patol. Veg. Rome. **7**:161-171.
- BOUNOUS, G., MARINONI, D. T. (2010): Chestnut: Botany, Horticulture, and Utilization. Horticultural Reviews. **31**:291-347.
- BRAGANÇA, H., SIMÕES, S., SANTOS, N., MARCELINO, J., TENREIRO, R., RIGLING, D. (2005): Chestnut blight in Portugal - monitoring and vc types of *Cryphonectria parasitica*. Acta Hort. **693**:627-634.
- BRAGANÇA, H., RIGLING, D., DIOGO, E., CAPELO, J., PHILLIPS, A., TENREIRO, R. (2011): *Cryphonectria naterciae*: a new species in the *Cryphonectria-Endothia* complex and diagnostic molecular markers based on microsatellite-primed PCR. Fung. Biol. **9**:852-861.
- BRAMBLE, W. C. (1936): Reactions of chestnut bark to invasion by *Endothia parasitica*. Am. J. Bot. **23**:89-99.
- BREUILLIN, F., DUTECH, C., ROBIN C. (2006): Genetic diversity of the Chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. Mycological Research. **110**:288-296.
- BROWN, A. H. D., FELDMAN, M. W., NEVO, E. (1980): Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. Genetics. **96**:523-536.
- BURNHAM, C. R. (1988): The restoration of the American chestnut. American Scientist **76**:478-487.
- CANNON, P. F., KIRK, P. M. (2007): Fungal Families of the World. CABI North American Office. Massachusetts. 456 p.
- CASTLEBURY, L. A., ROSSMAN A. Y., JAKLITSCH W. J., VASILYEVA L. N. (2002): A preliminary overview of the Diaporthales based on large subunit nuclear ribosomal DNA sequences. Mycologia. **94**:1017-1031.
- CHEN, C.A., WALLACE, C.C., WOLSTENHOLME, J. (2002): Analysis of mitochondrial 12S RNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals. Molecular Phylogenetics and Evolution. **23**:137-149.
- CHIRA, D., BOLEA, V., BOTU, M., JUVELOIU, E. (2013): Sweet chestnut in Romania: distribution, current state, management and research activities. 2nd European Congress on Chestnut, 9-12 October 2013, Univ. Debrecen, Hungary, 28 p.

- CHO, S., MITCHELL, A., REGIER, J. C., MITTER, C., POOLE, R. W., FRIEDLANDER, T. P., ZHAO, S. (1995): A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1 alpha recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution*. **12**:650-656.
- COLINAS, C., USCUPIC, M. (1999): Studies on chestnut blight *Cryphonectria parasitica* Murr.Barr in North-East Spain. *Acta Hort.* **494**:495–500.
- COOK, M. T., WILSON, G. W. (1915): The influence of the tannin content of the host plant on *Endothia parasitica* and selected species. *Bot. Gaz.* **60**:346-361.
- CORANDER, J., WALDMANN, P., SILLANPAA, M. J. (2003): Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*. **163**:367–374.
- CORTESI, P., MILGROOM, M. G., BISIACH, M. (1996): Distribution and diversity of vegetative compatibility in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycol. Res.* **9**:1087–1093.
- CORTESI, P., RIGLING, D., HEINIGER, U. (1998): Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of *Cryphonectria parasitica* Eur. J. For. Pathol. **28**:167-176.
- DALLAVALLE, E., ZAMBONELLI, A. (1999): Epidemiological role of strains of *Cryphonectria parasitica* isolated from hosts other than chestnut. *European Journal of Forest Pathology*. **29**:97-102.
- DAVISON, E. M., COATES, D. J. (1991): Identification of *Cryphonectria cubensis* and *Endothia gyrosa* from eucalypts in Western Australia using isozyme analysis. *Australian Plant Pathology*. **20**:157–160.
- DELEN, N. (1979): Studies on the control possibilities of chestnut blight (*Endothia parasitica* Murr. And.) in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*. **8**:51-76.
- DEVEY, D. S., BATEMAN, R. M., FAY, M. F., HAWKINS, J. A. (2008): Friends or relatives? Phylogenetics and species delimitation in the controversial European orchid genus *Ophrys*. *Annals of Botany*. **101**:385–402.
- DIAMANDIS, S., PERLEROU, C. (2001): The mycoflora of the chestnut ecosystems in Greece. *For. Snow. Landsc. Res.* **76**:499–504.
- DODDS, J. A. (1980): Revised estimates of the molecular weights of ds RNA segments in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *Phytopathology*. **70**:1217-1220.
- DRUZHININA, I. S., KOPCHINSKIY, A. G., KUBICEK, C. P. (2006): The first one hundred of *Trichoderma* species is characterized by molecular data. *Mycoscience*. **47**:55–64.
- DRUZHININA, I. S., KUBICEK, C.P. (2005): Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species cluster. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **2**:100-112.
- DUTECH, C., BARRÈS, B., BRIDIER, J., ROBIN, C., MILGROOM, M. G., RAVIGNÉ, V. (2012): The chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. *Mol. Ecol.* **21**:3931–3946.
- EFRON, B. (1979): Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *The Annals of Statistics* **7**:1–26.
- EKE, I., GÁL, T. (1977): Az *Endothia parasitica* (Murr.) And. aszkospóraszóródásának éves menete. *Növényvédelem*. **13**:352-358.
- EKE, I., SELMECZI, J. (1984): A gesztenye növényvédelme. In: A gesztenyetermesztés technológiája. Szerk: Gál T, Selmeczi J. Zalaegerszeg 16-30 p.
- ÉKES, M. (2003): A *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr tölgyön előforduló, hazai populációjának vizsgálata. Diplomamunka. Debrecen. 36 p.
- ELEZAJ, B. (1970): Chestnut. Tirana, Albania: Book by editor: Publishing House “Naim Frasheri”, Tirana, 79 p.
- FARRIS, J. S. (1970): Estimating phylogenetic trees from distances matrixes. *American Nature* **106**:645-668.

- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**:783–791.
- FÉSÜS, L., KOMLÓSI, I., VARGA, L., ZSOLNAI, A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroiinform Kiadó és Nyomda Kft. Budapest. 172 p.
- FINESCHI, S., TAURCHINI, D., MÜLLER-STARCK, G., CONEDERA, M. (1994): Genetic characterisation of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in southern Switzerland. III. Analysis of RAPD molecular markers. In: Proceedings of an International Congress on Chestnut, Spoleto, Italy. 309–313 p.
- FITCH, W. M. (1971): Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*. **20**:406–416.
- FLOREA, S.; POPA, I. (1984): Diseases of the edible chestnut reported in the fruit growing area of Baia Mare. In: Cercetarea stiintifica in sluibă productiei pomicole 1969–1989. Bucuresti, 1989. 365–372 p.
- FULBRIGHT, D. W. (1984): Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. *Phytopathology*. **74**:722–724.
- FULBRIGHT, D. W., MANDUJA, M., STADT, S. (2010): Chestnut production in Michigan. First European Chestnut Conference. *Acta Horticulturae*. **866**:531–537.
- FREEDMAN, D.A. (1981): Bootstrapping Regression models. *Ann. Stat.* **9**:1281–1228.
- GÁNC, S., V. (2002): A szelídgesztenye kéregtrágyáját okozó *Cryphonectria parasitica* előfordulása és patogenitása tölgyeken. Diplomamunka. NYME, Erdőmérnöki Kar, Erdő- és Faanyagvédelmi Intézet, Sopron.
- GENCSI L., VANCURA R. (1997): Dendrológia. Erdészeti növénytan II. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 728 p.
- GERBI, S. A. (1985). Evolution of ribosomal DNA.. In: Molecular evolutionary genetics. Macintyre, R. J. (Ed.) Plenum, New York. 419–517 p.
- GIRAUD, T., VILLARÉAL, L. M., AUSTERLITZ, F., LE GAC, M., LAVIGNE, C. (2006): Importance of the life cycle in sympatric host race formation and speciation of pathogens. *Phytopathology*. **96**:280–7.
- GLICS, M., FOLK, GY. (2000): Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 582 p.
- GOMES-LARANJO, J., FERREIRA-CARDOSO, J., PORTELA, E., ABREU, C. G. (2007): *Castanheiros*. Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. 380 p.
- GRANATA, G., SIDOTI A., GULLOTTO A., PENNISI A. M. (1992): Incidence of chestnut bark canker in Sicily and assay for vegetative compatibility. *Tecnica Agricola*. **44**:3–10.
- GRAVES, A. H. (1950): Relative blight resistance in species and hybrids of *Castanea*. *Phytopathology* **40**:1125–1131.
- GRETE, J. (1965): Les forme hypovirulentes d *Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre la chancre du chataigner. C.R. Seances Acad. Agric. Fr. **51**:1033–1037.
- GRETE, J., BERTHALAY-SAURET, S. (1978): Biological control of chestnut blight in France. In: Proc. Am. Chestnut Symp. Szerk: MACDONALD, W. L., CEC, F. C., LUCHOK, J., SMITH, H. C., WV University Books, Morgantown, USA. 30–34 p.
- GRETE, J., SAURET, S. (1969): Le hypovirulence exclusive, est-elle controlee par des determinants cytoplasmiques. C.R. Seances Acad. Sci Fr. **268**:3173–3176.
- GRYZENHOUT, M., MYBURG, H., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. (2006): Cryphonectriaceae (Diaporthales) a new family including *Cryphonectria*, *Chrysosporthe*, *Endothia*, and allied genera. *Mycologia*. **98**:239–249.
- GULYÁS, G., SRAMKÓ, G., MOLNÁR, VA., RUDNÓY, S., ILLYÉS, Z., BALÁZS, T., BRATEK, Z. (2005): Nuclear ribosomal ITS paralogs as evidence of recent interspecific hybridization in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. **47**:1–7.

- GUNDERSON, J. H., ELWOOD, H., INGOLD, A., KINDLE, K., SOGIN, M. L. (1987): Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **84**:5823-5827.
- HALL, P. (1989): On efficient bootstrap simulation. *Biometrika*. **76**:613-617.
- HARTIGAN, J. A. (1973): Minimum evolution fits to a given tree. *Biometrics*. **29**:53-65.
- HEALD, F. D., GARDNER, M. W. (1913): Preliminary notes on the relative prevalence of pycnosporos and ascospores of the chestnut blight fungus. *Science*. **37**:916-917.
- HEALD, F. D., STUDHALTER, R. A. (1914): Birds as carriers of the chestnut blight fungus. *J. Agr. Res.* **2**:405-422.
- HEALD, F. D., STUDHALTER, R. A. (1915): Seasonal duration of ascospore expulsion of *Endothia parasitica*. *Amer. J. Bot.* **2**:429-448.
- HEALD, F. D., WALTON, R. C. (1914): The expulsion of ascospores from the perithecia of the chestnut blight fungus. *Amer. J. Bot.* **1**:499-521.
- HEARNE, C. M., GHOSH, S., TODD, J. A. (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*. **8**:228-294.
- HEBARD, F. V., SHAIN, L. (1988): Effects of virulent and hypovirulent *Endothia parasitica* and their metabolites on ethylene production of bark of American and Chinese chestnut and scarlet oak. *Phytopathology*. **78**:841-845.
- HEBARD, F. V., GRIFFIN, G. J., ELKINS, J. R. (1984): Developmental histopathology of cancers incited by hypovirulent and virulent isolates of *Endothia parasitica* on susceptible and resistant chestnut trees. *Phytopathology*. **74**:140-149.
- HEINIGER, U., RIGLING, D. (1994): Biological control of chestnut blight in Europe. *Ann. Rev. Phytop.* **32**:581-599.
- HEINIGER, U., STADLER, B. (1990): Kastanienrindenkrebs auf der Alpennordseite. *Schweiz. Z. Forstwes.* **141**:383-388.
- HENDY, M. D., PENNY, D. (1989): A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Systematic Zoology*. **38**:297-309.
- HENNIG, W. (1966): *Phylogenetic Systematics*. Urbana, Illinois, USA: University of Illinois Press.
- HIBBET, D. S., FUKUMASA-NAKAI, Y., TSUNEDA, A., DONOGHUE, M. J. (1995): Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia*. **87**:618-638.
- HILLIS, D. M., DIXON, M. T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*. **66**:411-453.
- HILLMAN, B. I., FULBRIGHT, G. W., NUSS, D. L., VAN ALFEN, N. (1994): Hypoviridae. In: Sixth report of the International Comm. for the Tax. of Viruses. Ed: Murphy, F.A., Springer-Verlag, New York, USA. 30-65 p.
- HILLMAN, B. I., SHAPIRA, R., NUSS, D. L. (1990): Hypovirulence-associated suppression of host functions in *Cryphonectria parasitica* can be partially relieved by high light intensity. *Phytopathology*. **80**:950-956.
- HOEGGER, P. J., RIGLING, D., HOLDENRIEDER, O., HEINIGER, U. (2002): *Cryphonectria radicalis*: rediscovery of a lost fungus. *Mycologia*. **94**:105-115.
- HOGAN, E. P., GRIFFIN, G. J. (2002a): Incomplete movement of *Cryphonectria hypovirus 1* within a vegetative compatibility type of *Cryphonectria parasitica* in natural cankers on grafted American chestnut trees. *Eur. J. For. Pathol.* **32**:331-344.
- HOGAN, E. P., GRIFFIN, G. J. (2002b): Spread of *Cryphonectria hypovirus 1* into 45 vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* on grafted American chestnut trees. *Forest Pathology*. **32**:73-85.
- IRINYI, L. (2009): *Phoma*-szerű gombák taxonómiájának konvencionális és molekuláris biológiai összehasonlítása. Doktori értekezés. Debrecen. 149 p.

- IRINYI, L., KÖVICS, GY. J., SÁNDOR, E. (2009): Taxonomic re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi. *Mycological Research*. **113**:249-260.
- JANKOVSKÝ, L., HALTOFOVÁ, P., JUHASOVA, G., KOBZA, M., ADAMČIKOVA, K., PALOVČIKOVA, D. (2004): The first record of *Cryphonectria parasitica* in the Czech Republic. *Czech Mycology*. **56**:45–51.
- JANKOVSKÝ, L., HALTOFOVÁ, P., PALOVČÍKOV, D. (2010): New findings and vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci.* **1**:28–33.
- JARNE, P., LAGODA, P. J. L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology and evolution*. **11**:424-429.
- JAYNES, R. A., ELLISTON, J. E. (1980): Pathogenicity and cancer control by mixtures of hypovirulent strains of *Endothia parasitica* on American chestnut. *Phytopathology*. **70**: 453-459.
- JAYNES, R. A., VAN ALFEN, N. K. (1974): Control of American chestnut blight by trunk injection with MBC. *Phytopathology*. **64**:1479-1480.
- JEEWON, R., YEUNG, S. Y. Q., HYDE, K. D. (2009): “A novel phylogenetic group within *Thozetella* (Chaetosphaeriaceae): a new taxon based on morphology and DNA sequence analyses,”. *Canadian Journal of Microbiology*. **55**:680–687.
- JORGENSEN, R. A., CLUSTER, P. D. (1988): Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **75**:1238-1247.
- JUHÁSOVÁ, G., KULCSAROVÁ, K. (2002): A *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr előfordulása tölgyeken. 48. Növényvédelmi Tudományos Napok. Összefoglalók. Budapest. 79 p.
- JUHÁSOVÁ, G. (1976): A summary of knowledge on fungal diseases of Spanish chestnut in Slovakia. *Forestry*. **38**:449–460.
- JUHÁSOVÁ, G., ADAMČIKOVÁ, K., KOBZA, M., ONDRUŠKOVÁ, E., BARIAK, A., PLEVO, S. (2010): Ochrana a pestovanie gaštana jedlého. Učelová publikácia. 90 p.
- JUHÁSOVÁ, G., LEONTOVYČ, R. (1996): Rakovina kôry gaštana jedlého a dubov (Chestnut blight diseases on chestnuts and oaks). *Les*. **8**:12-13.
- JUHÁSOVÁ, G., RADÓCZ L. (1995): Biológiai védekezés a szelídgesztenyekórt előidéző gomba *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr ellen a kórokozó hipovirulens törzseinek felhasználásával. *Növényvédelem*. **31**:169-176.
- JURC, D. (2002): An overview of the history of the chestnut blight epidemic in Slovenia. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*. **68**:33-59.
- KAPRONCZAI, I., VUKOVICH, G., VÁGÓ, SZ., VALKÓ, G. (2012): Agrárgazdasági statisztikai zsebkönyv. Agrárgazdasági Kutató Intézet. Budapest. 128 p.
- KERESZTESI, B. (1971): Magyar erdők. Akadémiai Kiadó. Budapest. 431 p.
- KIMURA, M., CROW, J. F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. **49**:725-738.
- KLUGE, A. G., FARRIS, J. S. (1969): Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology*. **18**:1-32.
- KÖVICS, GY. (2000): Növénybetegséget okozó gombák névtára. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 255 p.
- KRISTÓ, L. (1995): Erdőműveléstan I. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó. Budapest. 175 p.
- KRSTIN, L., NOVAK-AGBABA, S., RIGLING, D., KRAJACIC, M., CURCOVIC-PERICA, M. (2008): Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus* 1. *Plant Pathology*. **57**:1086–1096.

- KUBISIAK, T. L., DUTECH, C., MILGROOM, M. G. (2007): Fifty-three polymorphic microsatellite loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology Notes*. **7**:428–432.
- LAI, Y., SUN, F. (2003): The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular biology and evolution*. **20**:2123–2131.
- LANE, D. J., PACE, B., OLSEN, G. J., STAHL, D. A., SOGIN, M. L., PACE, N. R. (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **82**:6955–6959.
- LEE, J. K., TATTAR, T. A., BERMAN, P. M., MOUNT, M. S. (1992): A rapid method for testing the virulence of *Cryphonectria parasitica* using excised bark and wood of American chestnut. *Phytopathology*. **82**:1454–1456.
- LEVENE, H. (1949): On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.* **20**:91–94.
- LEVINSON, G., GUTMAN, G. A. (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution*. **4**:203–221.
- LIU, Y. C., DOUBLE, M. L., MACDONALD, W. L., MILGROOM, G. (2002): Persistence of *Cryphonectria* hypoviruses after their release for biological control of chestnut blight in West Virginia forests. *Journal of Forest Pathology*. **32**:345–356.
- LIU, Y. C., DYNEK, J. N., HILLMAN, B. I., MILGROOM, G. (2007): Diversity of viruses in *Cryphonectria parasitica* and *Cryphonectria nitschkei* in Japan and China, and partial characterization of a new chrysovirus species. *Mycological Research*. **111**:433–442.
- LUISI, N.; GENTILE, T. M.; SICOLI, G. TURCHETTI, T. (1992): Outbreaks of *Cryphonectria parasitica* on *Quercus* species and their epidemical role. *International Congress Recent Advances in Studies on Oak Decline, Selva di Fasano (Brindisi), Italy*. 95–104 p.
- LUSHAJ, B. (1999): Chestnut blight canker (*Cryphonectria parasitica* Murr.) Barr. and biological control in Albania. *Management Committee Meeting and Scientific Workshop on "Tree Physiology" and "Pathology and Pests"*, Sopron, Hungary. 1–13 p.
- MACDONALD, W. L., FULBRIGHT, D. W. (1991): Biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. *Plant. Dis.* **75**:656–661.
- MCDERMOTT, J. M., MCDONALD, B. A. (1993): Gene flow in plant pathosystems. *Annu Rev Phytopathol.* **31**:353–373.
- MAI, J. C. COLEMAN, A. W. (1997): The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution*. **44**:258–271.
- MARÁCZI, L. (2013): Díszfák, díszcserjék védelme. Nyugat-dunántúli Díszfaiskolások Egyesülete. Szombathely. 626 p.
- MARÁZ, A., HORNOK, L. (2003): A gombák genetikája. In: Mikológia Szerk: Jakucs E., Vajna L. Agroinform Kiadó, Budapest. 224–225 p.
- MARESI, G., GIOVANNETTI, L., VENTURA, S., TURCHETTI, T. (1995): Transmission of hypovirulence agents among some *Cryphonectria parasitica* strains from Italy. *European Journal of Forest Pathology*. **25**:191–196.
- MCCARROLL, D. R., THOR, E. (1978): Death of chestnut: The host pathogen interaction. In: *Proc. Am. Chestnut. Symp.* Eds: W. L. MacDonald, F. C. Cech, J. Luchok, H. C. Smith, WV University Books, Morgantown, USA. 25–26 p.
- MERKEL, H. W. (1906): A deadly fungus on the American chestnut. *N.Y. Zool. Soc. Am. Rep.* **10**:204–210.
- MERRICK, W.C. (1992): Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological Reviews*. **56**:291–315.
- MOFFITT, E. M., LISTER, R. M. (1975): Application of serological screening test for detecting double-stranded RNA mycoviruses. *Phytopathology*. **65**:851–859.

- MOHÁCSY, M. PORPÁČZY, A. (1951): Dió, mandula, mogyoró, gesztenye termesztése és nemesítése. Mezőgazda Kiadó. Budapest.
- MOLDAVE, K. (1985): Eukaryotic protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry*. **54**: 1109-1149.
- MONCALVO, J. M., WANG, H. H., HSEU, R. S. (1995): Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*. **87**:223-238.
- MONCALVO, J. M., LUTZONI, F. M., REHNER, S. A., JOHNSON J., VILGALYS, R. (2002): Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*. **49**:278-305.
- MONTENEGRO, D., AGUIN, O., SAINZ, M. J., HERMIDA, M., MANSILLA, J. P. (2008): Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *Forest Ecol. Manage.* **256**:973-980.
- MOREIRA, D., LE GUYADER, H., PHILIPPE, H. (1999): Unusually high evolutionary rate of the elongation factor-1 α -genes from the *Ciliophora* and its impact on the phylogeny of eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. **16**:234-245.
- MORRIS, T. J., DODDS, J. A. (1979): Isolation and analyses of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*. **87**:1026-1033.
- MYBURG, H., GRYZENHOUT, M., WINGFIELD, B. D., STIPES, R. J., WINGFIELD, M. J. (2004): Phylogenetic relationships of *Cryphonectria* and *Endothia* species, based on DNA sequence data and morphology. *Mycologia*. **96**:990-1001.
- NAEIMI, S., KHODAPARAST, S. A., JAVAN-NIKKHAH, M., VÁGVÖLGYI, C., KREDICS, L. (2001): Species patterns and phylogenetic relationships of *Trichoderma* strains in rice fields of Southern Caspian Sea, Iran. *Cereal Research Communications*. **39**:560-568.
- NEI, M. (1972): Genetic distance between populations. *American Naturalist*. **106**:283-292.
- NEI, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **70**:3321-3323.
- NEI, M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*, New York: Columbia University Press. 187-192 p.
- NICHOLSON, M. S. (1995): Restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA for mapping and phylogenetic inference of *Lentinula* species. Ph.D. Thesis, Pennsylvania State University, Dept. of Plant Pathology. 109 p.
- NIENSTAEDT, H. (1953): Tannin as a factor in the resistance of chestnut *Castanea* spp., to the chestnut blight fungus *Endothia parasitica* (Murr). *Phytopathology*. **43**:32-38.
- NOVAK-AGBABA, S. (1998). Health condition of the sweet chestnut in Croatia and the protection measures in practice. *Proceeding of the Second International symposium on chestnut, Bordeaux (FR)*: Acta Hort. **494**:425-426.
- OCHIENG, J. W., HENRY, R. J., BAVERSTOCK, P. R., STEANE, D. A., SHEPHERD, M. (2007): Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs. *Mol. Phylogenet. Evol.* **44**:752-764.
- OLIVERIO, M., CERVELLI, M., MARIOTTINI, P. (2002): ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (*Caenogastropoda*, *Muricoidea*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **25**:63-69.
- PARKER, P. G., SNOW, A. A., MALCOLM, D. S., BOOTON, G. C., FUERST, P. A. (1998): What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. **79**:361-382.

- PEEVER, T. L., LIU, Y. H., MILGROOM, M. G. (1997): Diversity of Hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology*. **87**:1026-1033.
- PENNISI, A. M., MAGNANO, G., GRASSO, S. (1992): Vegetative compatibility of strains of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. isolated in chestnut orchards in Calabria region. *Petria*. **2**:1-10.
- PERLEROU, C., DIAMANDIS, S. (2006): Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. *For. Pathol.* **36**:413-421.
- PINE, E. M., HIBBETT, D. S., DONOGHUE, M. J. (1999): Phylogenetic relationships of cantharelloid and clavarioid Homobasidiomycetes based on mitochondrial and nuclear rDNA sequences. *Mycologia*. **91**:944-963.
- POWELL, W. A. (1995): Vegetative incompatibility and mycelial death of *Cryphonectria parasitica* detected by pH indicator. *Mycologia*. **87**:738-741.
- PROSPERO, S., RIGLING, D. (2012): Invasion genetics of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Switzerland. *Phytopathology*. **102**:73-82.
- RADÓCZ, L. (1994): A szelídgesztenyekór. *Élet és Tudomány*. **42**:1321-1323.
- RADÓCZ, L. (1995a): A hipovirulencia jelenségének, valamint biológiai védekezési eljárásokban való alkalmazhatóságának vizsgálata a szelídgesztenyekórt előidéző *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr gombakórokozó magyarországi izolátumainak esetében. Doktori értekezés. Debrecen. 66 p.
- RADÓCZ, L. (1995b): Adatok a szelídgesztenye kéregrákosodást előidéző *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr gombakórokozó magyarországi populációiról. V. Növényvédelmi fórum Összefoglaló. PATE, Keszthely. 36 p.
- RADÓCZ, L. (1997): A jelenségének, valamint biológiai védekezési eljárásokban való alkalmazhatóságának vizsgálata a szelídgesztenyekórt előidéző *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr gomba magyarországi izolátumainak esetében. Kandidátusi értekezés. MTA Doktori Tanács, Budapest. 99 p.
- RADÓCZ, L. (2002): A héjasok növényvédelme. Szaktudás Kiadó Ház. Budapest, 256 p.
- RADÓCZ, L. (2010): A nagymarosi szelídgesztenyések története, ápolása, védelme. Nagymaros. 151 p.
- RADÓCZ, L. (2013): Chestnut cultivation and revitalization program in Nagymaros (Hungary). Debrecen University Publishing. Debrecen. 44 p.
- RADÓCZ, L., HOLB, I. (2002): Detection of natural infection of *Quercus* spp. by the chestnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*) in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*. **8**:54-56.
- RADÓCZ, L., SZABÓ, I., VARGA, M. (1996): A hipovirulencia, mint a szelídgesztenyekór (*Cryphonectria parasitica*) elleni védekezés egyik hatékony, biológiai eszköze. In: Integrált Termesztés a Kertészetben. Szerk: APONYINÉ GARAMVÖLGYI I., ELEKES A., OLASZ ZS., KOVÁCS G., NAGY G. BFNTÁ Kiadó, Budapest. 45-57 p.
- RADÓCZ, L., TARCALI, G., IRINYI, L., GÖRCSÖS, G. (2011): Az ukrainai *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr szubpopulációk megjelenése kocsánytalan tölgyön (*Quercus petraea*). *Agrártudományi Közlemények*. **43**:70-75.
- REDDY, S. R., PINDI, P. K., REDDY, S. M. (2005): Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India: problems and prospects. *Current science*. **89**:1699-1709. p.
- RIETHMÜLLER, A., VOGLMAYR, H., GÖKER, M., WEIß, M., OBERWINKLER, F. (2002): Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*. **94**:834-849.

- RIGLING, D., HEINIGER, U., HOHL, H. R. (1989): Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Phytopathology*. **79**:219-223.
- RILEY, L. (2004): Molecular epidemiology of infectious diseases. Principles and practices. American Society of Microbiology Press Washington DC, USA.
- RISTESKI, M., MILEV, M., RIGLING, D., MILGROOM, M. G., BRYNER, S. F., SOTIROVSKI, K. (2013): Distribution of chestnut blight and diversity of *Cryphonectria parasitica* in chestnut forests in Bulgaria. *Forest Pathology*. **43**:437-443.
- ROANE, M. K., STIPES, R. J., PHIPPS, P. M., MILLER, O. K. (1974): *Endothia gyrosa*, causal pathogen of pin oak blight. *Mycologia*. **66**:1042-1047.
- ROBIN, C., ANZIANI, C., CORTESI, P. (2000): Relationship between biological control, incidence of hypovirulence and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology*. **90**:730-737.
- ROBIN, C., HEINIGER, U. (2001): Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*. **76**:361-367.
- ROGER, A. J., SANDBLOM, O., DOOLITTLE, W. F., PHILIPPE, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. **16**:218-233.
- ROSSMAN, A. Y., FARR, D. F., CASTLEBURY, L. A. (2007): A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience*. **48**:135-144.
- SAMUELS, G. J., DODD, S. L., GAMS, W., CASTLEBURY, L. A. PETRINI, O. (2002): *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*. **94**:146-170.
- SANGER, F., MICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **74**:5463-5467.
- SCHUG, M. D., MACKAY, T. F. C., AQUADRO, C. F. (1997): Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics*. **15**:99-102.
- SEEMANN, D., BOUFFIER, V., KEHR, R., WULF, A., SCHRÖDER, T., UNGER, J. (2001): Die Esskastanie (*Castanea sativa* Mill.) in Deutschland und ihre Gefährdung durch den Kastanienrindenkrebs (*Cryphonectria parasitica* [Murr.] Barr). *Nachr. bl. Dtsch. Pflanzenschutzd.* **53**:49-60.
- SELKOE, K. A., TOONEN, R. J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*. **9**:615-629.
- SHAIN, L., MILLER, J. B., SPALDING, R. J. (1994): Responses of American and Chinese chestnut to *Cryphonectria parasitica* and ethylene. In: *Proceedings of the International Chestnut Conference*. WV Univ. Press, Morgantown, WV. 97-101 p.
- SHEAR, C. L., STEVENS, N. E., TILLER, R. J. (1917): *Endothia parasitica* and Related Species. USDA Bulletin no. 380. Washington, DC, USA: US Department of Agriculture.
- SHEAR, C. L., STEVEN, N. E. (1913a): Cultural characters of the chestnut blight fungus and its near relatives. *U.S. Dept. Agr. Bull.* **131**:3-18.
- SHEAR, C. L., STEVEN, N. E. (1913b): The chestnut-blight parasite (*Endothia parasitica*) from China. *Science*. **38**:295-297.
- SHEAR, C. L., STEVEN, N. E. (1916): The discovery of the chestnut-blight parasite (*Endothia parasitica*) and other chestnut fungi in Japan. *Science*. **43**:173-176.
- SIVANESAN, A., HOLLIDAY, P. (1981): CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute KEW, Surrey, England No. **704**:71-75.

- SOLAR, A., JURC, D., ŠTAMPAR, F., KODRIČ, I., KRALJ, T., MEDVED, M., MIKULIČ, V., ŽGAJNAR, L., RENER, I. (2001): Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Forests in Slovenia: Distribution, Current State of the Resource, Management and Research Activities. National Chestnut Report. Cost Action G4: Multidisciplinary Chestnut Research. Working Group 4: Silviculture, 7 p.
- SOÓ, R. (1962): Növényföldrajz. Tankönyvkiadó. Budapest. 157 p.
- SOTIROVSKI, K. (2000): Hypovirulence, Vegetative-Compatibility Groups and Mating Types of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. in the Republic of Macedonia. PhD thesis. Skopje: University Ss. Kiril i Metodij.
- SOTIROVSKI, K., PAPAZOVA-ANAKIEVA, I., GRUNWALD, N. J., MILGROOM, M. G. (2004): Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology*. **53**:325–33.
- SÓTONYI, J., APONYINÉ, G. I. (1996): A gesztenye krifonektriás kéregelhalása, biológiai védekezés lehetősége Magyarországon. Integrált termesztés a kertészetben. Budapest. 58-76 p.
- SPRINZL, M. (1994): Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem Sci*. **19**:245-250.
- STIPES, R. J., PHIPPS, P. M. (1971): A species of *Endothia* associated with a canker disease of pin oak (*Quercus palustris*) in Virginia. *Plant Dis. Repr.* **55**:467-469.
- SWOFFORD, D. L. (2002): PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SZABADI, G., MOLNÁR, J., EKE, I., ERDŐS, GY., OCSKO, Z. (2003): Növényvédő szerek, terménynövelő anyagok 2003. I. Földművelésügyi Minisztérium. Budapest. 720 p.
- SZABÓ, I. (2003): Erdei fák betegségei. Szaktudás Kiadó ház. Budapest. 200 p.
- SZENTIVÁNYI, P., PEJOVICS, B., HORN, E. (1976): Dió; Mandula; Mogyoró; Gesztenye. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. 156 p.
- TANABE, Y., SAIKAWA, M., WATANABE, M. M., SUGIYAMA, J. (2004): Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 α and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **30**:438-449.
- TANG, J., HANAGE, W. P., FRASER, C., CORANDER, J. (2009): Identifying currents in the gene pool for bacterial populations using an integrative approach. *PLoS Comput. Biol.* **5**. e1000455. (doi:10.1371/journal.pcbi.1000455)
- TARCALI, G. (2002): A *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR Kárpát- medencei populációinak vizsgálata. Diplomamunka. Debrecen. 57 p.
- TARCALI, G. (2007): A *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr Kárpát- medencei szubpopulációinak vizsgálata. Doktori értekezés. Debrecen. 150 p.
- TARCALI, G., RADÓCZ, L. (2006): Identification of natural infection of *Quercus* spp. by the chestnut blight fungus in North-Romania, near Baie Mare, Proceedings of The 4-th International Symposium „Natural Resources and Sustainable Development”, 10-11. October, 2006. Oradea, Romania, 395-401 p.
- TAUTZ, D. (1993): Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In *DNA Fingerprinting : State of Science* (ed. S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen and A. J. Jeffreys), pp. 21-28. Birkhauser: Basel.
- TORSELLO, M. L., DAVIS, D. D., NASH, B. L. (1994): Incidence of *Cryphonectria parasitica* cankers on scarlet oak (*Quercus coccinea*) in Pennsylvania. *Plant Disease*. **78**:313-315.
- TRESTIC, T., USCUPLIC, M., COLINAS, C., ROLLAND, G., GIRAUD, A., ROBIN, C. (2001): Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow Landscape Research*. **76**:391-396.
- TURCHETTI, T. (1982): Hypovirulence in chestnut blight and some practical aspects in Italy. *Eur. J. For. Path.* **12**:414-417.

- TURCHETTI, T., MARESI, D., APONYI, I., SÓTONYI, J., HERTELENDY, L. (1996): Biológiai védekezés a szelídgesztenye kéregelhalása ellen. In: Integrált termesztés a kertészetben. Budapest. 1-23 p.
- UCHIDA, K. (1977): Studies on *Endothia* cancer of japanese chestnut trees caused by *Endothia parasitica* (Murr.) P. J. et Anderson. Bull. Ibaraki-Ken Hort. Exp. Stat. Spec. **4**: 65-69.
- USCUPIC, M., (1961): Occurrence of sweet chestnut blight in Bosnia. Narodni sumar. **12**:581-588.
- VADAS, J. (1908): Kisebb közlések: A szelídgesztenyefákon fellépett gombabetegségekről. Erdészeti Kísérletek. **10**:125-126.
- VIDÓCZI, H. (2005): A szelídgesztenye kéregrákja [*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr] a Soproni-hegységben. Doktori (PhD). Értekezés. Nyugat-Magyarországi Egyetem. Sopron. 131 p.
- VIDÓCZI, H., VARGA, M., SZABÓ, I. (2005): A szelídgesztenye- kéregrák elleni biológiai védekezés tapasztalatai a Soproni- hegységben. Növényvédelem. **41**:405-412.
- VIDÓCZI, H., VARGA, M., SZABÓ, I., RADÓCZ, L. (2000): A szelídgesztenye kéregrák elleni biológiai védekezés lehetőségei a Soproni Hegyvidéken. Növényvédelem **36**:53-59.
- WEBER, J. L., WONG, C. (1993): Mutation of human short tandem repeats. Human Molecular Genetics. **2**:1123-1128.
- WEEKERS, P. H. H., JONCKHEERE, F. J., DUMONT, H. J. (2001): Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representative of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent west European zone. Molecular Phylogenetics and Evolution. **20**:89-99.
- WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution. **38**:1358-1370.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: PCR protocols. A guide to methods and applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) Academic Press, Inc., New York.
- WOESE, C. R. (1987): Bacterial evolution. Microbiol Rev. **51**:221-271.
- WRONSKI, R., KUDERA, U., WILHELM, E. (1997): Characterization of *Cryphonectria parasitica* strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique and conventional methods. European Journal of Forest Pathology. **27**:95-103.
- YAN, Z. H., ROGERS, S. O., WANG, C. J. K. (1995): Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. Mycologia. **87**:72-83.
- YEH, F. C., YANG, R. C., BOYLE, T. B. J., YE, Z. H., MAO, J. X. (1999): POPGENE Version 1.32, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada (<http://www.ualberta.ca/fyeh/fyeh>).
- ZANE, L., BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology. **11**:1-16.

11. MELLÉKLETEK

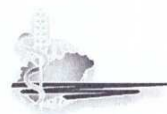
1. Melléklet: A szlovákiai minták behozatali engedélye

HUNGARIAN REPUBLIC NATIONAL PLANT PROTECTION ORGANISATION MAGYAR KÖZTÁRSASÁG NÖVÉNYVÉDELMI SZERVEZETE		 
		No. Szám: 04.2/37-2/2012.
1. Name and address of consignor/Plant protection organization of the country of origin: Feladó neve és címe/ a származási ország növényvédelmi szervezete: Dr. Gabriella Juhászová Národné Lesnícke Centrum T.G. Masaryka 22, 960 92 Zvolen Slovenská republika NPPO: Plant Commodities Department Ministry of Agriculture of the Slovak Republic	Letter of Authority HATÓSÁGI ENGEDÉLY for the introduction and/or movement of harmful organisms, plants, plant products and other objects for trial or scientific purposes and for work on varietal selections (issued under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61/EC) a növények, növényi, vagy egyéb termékek tudományos, kísérleti, vagy fajta szelekciós célokból történő behozatalához és szállításához [kiadva a 2008/61/EK irányelvnek való megfelelést szolgáló 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet értelmében]	
2. Name and address of person responsible for the approved activities: Az engedélyezett tevékenység végzéséért felelős személy neve és címe: Dr. Radócz László DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	3. Name of the responsible official body of issue: A kibocsátó hatóság megnevezése: Hungarian Agricultural Office MgSzH	
4. Address and description of the specific site or sites for quarantine containment A karantén körülményeket biztosító helyszín(ek) neve és címe: DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	5. Place of origin (documentary evidence attached for material originating in a third country): Származási hely (Közösségen kívüli országból származó anyag esetében csatolni kell az igazoló okiratot): Národné Lesnícke Centrum T.G. Masaryka 22, 960 92 Zvolen Slovenská republika	
Declared point of entry for material introduced from a third country: Budapest, Liszt Ferenc airport - Budapest, Liszt Ferenc repülőtér	6. Plant passport number: Növényútlevél száma: or Phytosanitary certificate number: Növény-egészségügyi bizonyítvány száma:	
7. Scientific name(s) of the material, including the harmful/pest organisms concerned: Az anyag (ideértve a károsítót is) tudományos elnevezése: <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) Barr	8. Quantity of material: Az anyag mennyisége: 20 Petri dishes 20 db Petri csészé.	
9. Type of material: Az anyag típusa: Inoculated to growing medium in Petri dishes Petri csészében táptalajra oltva		
10. Additional declaration : Kiegészítő nyilatkozat: This material is moved within the Community under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61 Az anyag szállítása a Közösség területén belül a 2008/61/EK irányelvet megvalósító 7/2001 (I.17) FVM rendelet szerint történik		
11. Additional information: Kiegészítő információ:		
12. Endorsement by the responsible official body of Member State / third country of origin of the material: Az anyag származási helye szerint illetékes hatóság jóváhagyása: Place of endorsement: A bejegyzés helye: Date: Dátum: Name and signature of authorized officer: A köztisztviselő neve és aláírása:	13. Stamp of the responsible official body of issue A kiadó hatóság pecsétje: Place of issue: Budapest A kiadás helye: Date: 5. 01. 2012. Dátum: Name and signature of authorized officer: Jordán László A köztisztviselő neve és aláírása:	

2. Melléklet: Az ukrainai minták behozatali engedélye

HUNGARIAN REPUBLIC NATIONAL PLANT PROTECTION ORGANISATION MAGYAR KÖZTÁRSASÁG NÖVÉNYVÉDELMI SZERVEZETE		 
		No. Szám: 04.2/37-6/2012.
1. Name and address of consignor/Plant protection organization of the country of origin: Feladó neve és címe/ a származási ország növényvédelmi szervezete: Dr.Vasil Krochko Uzghorod State University, Uzghorod Zakarpattia Oblast 46, Ukraine NPPO: Main State Plant Quarantine Inspection of Ukraine	Letter of Authority HATÓSÁGI ENGEDÉLY for the introduction and/or movement of harmful organisms, plants, plant products and other objects for trial or scientific purposes and for work on varietal selections (issued under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61/EC)	
2. Name and address of person responsible for the approved activities: Az engedélyezett tevékenység végzéséért felelős személy neve és címe: Dr.Radócz László DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	a növények, növényi, vagy egyéb termékek tudományos, kísérleti, vagy fajta szelekciós célokból történő behozatalához és szállításához [kiadva a 2008/61/EK irányelvnek való megfelelést szolgáló 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet értelmében]	
	3. Name of the responsible official body of issue: A kibocsátó hatóság megnevezése: Hungarian Agricultural Office MgSzH	
4. Address and description of the specific site or sites for quarantine containment A karantén körülményeket biztosító helyszín(ek) neve és címe: DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	5. Place of origin (documentary evidence attached for material originating in a third country): Származási hely (Közösségen kívüli országból származó anyag esetében csatolni kell az igazoló okiratot): Uzghorod State University, Uzghorod Zakarpattia Oblast 46, Ukraine	
Declared point of entry for material introduced from a third country: Budapest, Liszt Ferenc airport - Budapest, , Liszt Ferenc repülőtér	6. Plant passport number: Növényútlevél száma: or Phytosanitary certificate number: Növény-egészségügyi bizonyítvány száma:	
7. Scientific name(s) of the material, including the harmful/pest organisms concerned: Az anyag (ideértve a károsítót is) tudományos elnevezése: <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) Barr	8. Quantity of material: Az anyag mennyisége: 15 Petri dishes 15 db Petri csésze.	
9. Type of material: Az anyag típusa: Inoculated to growing medium in Petri dishes Petri csészében táptalajra oltva		
10. Additional declaration : Kiegészítő nyilatkozat: This material is introduced into and moved within the Community under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61 EC Az anyag szállítása a Közösség területére és területén belül a 2008/61/EK irányelvet megvalósító 7/2001 (I.17) FVM rendelet szerint történik		
11. Additional information: Kiegészítő információ:		
12. Endorsement by the responsible official body of Member State / third country of origin of the material: Az anyag származási helye szerint illetékes hatóság jóváhagyása: Place of endorsement: A bejegyzés helye: Date: Dátum: Name and signature of authorized officer: A köztisztviselő neve és aláírása:	13. Stamp of the responsible official body of issue A kiadó hatóság pecsétje: Place of issue: Budapest A kiadás helye: Date: 5. 01.2012. Dátum: Name and signature of authorized officer: Jordán László A köztisztviselő neve és aláírása:	

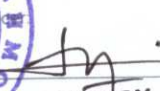
3. Melléklet: A romániai minták behozatali engedélye

HUNGARIAN REPUBLIC NATIONAL PLANT PROTECTION ORGANISATION MAGYAR KÖZTÁRSASÁG NÖVÉNYVÉDELMI SZERVEZETE		 
		No. Szám: 04.2/37-3/2012.
1. Name and address of consignor/Plant protection organization of the country of origin: Feladó neve és címe/ a származási ország növényvédelmi szervezete: Dr. Csep Nikolae Universitatea din Oradea Universitatii str.1, Oradea 410087, Romania NPPO: Ministry of Agriculture, Forests and Rural Development Phytosanitary Department	Letter of Authority HATÓSÁGI ENGEDÉLY for the introduction and/or movement of harmful organisms, plants, plant products and other objects for trial or scientific purposes and for work on varietal selections (issued under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61/EC) a növények, növényi, vagy egyéb termékek tudományos, kísérleti, vagy fajta szelekciós célokból történő behozatalához és szállításához [kiadva a 2008/61/EK irányelvnek való megfelelést szolgáló 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet értelmében]	
2. Name and address of person responsible for the approved activities: Az engedélyezett tevékenység végzéséért felelős személy neve és címe: Dr.Radócz László DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	3. Name of the responsible official body of issue: A kibocsátó hatóság megnevezése: Hungarian Agricultural Office MgSzH	
4. Address and description of the specific site or sites for quarantine containment A karantén körülményeket biztosító helyszín(ek) neve és címe: DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	5. Place of origin (documentary evidence attached for material originating in a third country): Származási hely (Közösségen kívüli országból származó anyag esetében csatolni kell az igazoló okiratot): Universitatea din Oradea Universitatii str.1, Oradea 410087, Romania	
Declared point of entry for material introduced from a third country: Budapest, Liszt Ferenc airport - Budapest, , Liszt Ferenc repülőtér	6. Plant passport number: Növényútlevél száma: or Phytosanitary certificate number: Növény-egészségügyi bizonyítvány száma:	
7. Scientific name(s) of the material, including the harmful/pest organisms concerned: Az anyag (ideértve a károsító is) tudományos elnevezése: <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) Barr	8. Quantity of material: Az anyag mennyisége: 20 Petri dishes 20 db Petri csészé.	
9. Type of material: Az anyag típusa: Inoculated to growing medium in Petri dishes Petri csészében táptalajra oltva		
10. Additional declaration : Kiegészítő nyilatkozat: This material is moved within the Community under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61 Az anyag szállítása a Közösség területén belül a 2008/61/EK irányelvet megvalósító 7/2001 (I.17) FVM rendelet szerint történik		
11. Additional information: Kiegészítő információ:		
12. Endorsement by the responsible official body of Member State / third country of origin of the material: Az anyag származási helye szerint illetékes hatóság jóváhagyása: Place of endorsement: A bejegyzés helye: Date: Dátum: Name and signature of authorized officer: A köztisztviselő neve és aláírása:	13. Stamp of the responsible official body of issue A kiadó hatóság pecsétje: Place of issue: Budapest A kiadás helye: Date: 5. 01.2012. Dátum: Name and signature of authorized officer: Jordán László A köztisztviselő neve és aláírása: 	

4. Melléklet: A macedón és bulgár minták behozatali engedélye

HUNGARIAN REPUBLIC NATIONAL PLANT PROTECTION ORGANISATION MAGYAR KÖZTÁRSASÁG NÖVÉNYVÉDELMI SZERVEZETE		 
		No. Szám: 04.2/37-5/2012.
1. Name and address of consignor/Plant protection organization of the country of origin: Feladó neve és címe/ a származási ország növényvédelmi szervezete: Dr.Kiril Sotirovski Universitet Sv Kiril i Metodij, Faculty of Forestry, 1000 Skopje, Macedonia NPPO: Ministry of Agriculture, Forestry and Water Economy, Phytosanitary Directorate	Letter of Authority HATÓSÁGI ENGEDÉLY for the introduction and/or movement of harmful organisms, plants, plant products and other objects for trial or scientific purposes and for work on varietal selections (issued under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61/EC)	
2. Name and address of person responsible for the approved activities: Az engedélyezett tevékenység végzéséért felelős személy neve és címe: Dr.Radócz László DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	a növények, növényi, vagy egyéb termékek tudományos, kísérleti, vagy fajta szelekciós célokból történő behozatalához és szállításához [kiadva a 2008/61/EK irányelvnek való megfelelést szolgáló 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet értelmében]	
	3. Name of the responsible official body of issue: A kibocsátó hatóság megnevezése: Hungarian Agricultural Office MgSzH	
4. Address and description of the specific site or sites for quarantine containment A karantén körülményeket biztosító helyszín(ek) neve és címe: DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	5. Place of origin (documentary evidence attached for material originating in a third country): Származási hely (Közösségen kívüli országból származó anyag esetében csatolni kell az igazoló okiratot): Universitet Sv Kiril i Metodij, Faculty of Forestry, 1000 Skopje, Macedonia	
Declared point of entry for material introduced from a third country: Budapest, Liszt Ferenc airport - Budapest, , Liszt Ferenc repülőtér	6. Plant passport number: Növényútlevél száma: or Phytosanitary certificate number: Növény-egészségügyi bizonyítvány száma:	
7. Scientific name(s) of the material, including the harmful/pest organisms concerned: Az anyag (ideértve a károsítót is) tudományos elnevezése: <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) Barr	8. Quantity of material: Az anyag mennyisége: 10 Petri dishes 10 db Petri csésze.	
9. Type of material: Az anyag típusa: Inoculated to growing medium in Petri dishes Petri csészében táptalajra oltva		
10. Additional declaration : Kiegészítő nyilatkozat: This material is introduced into and moved within the Community under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61 EC Az anyag szállítása a Közösség területére és területén belül a 2008/61/EK irányelvet megvalósító 7/2001 (I.17) FVM rendelet szerint történik		
11. Additional information: Kiegészítő információ:		
12. Endorsement by the responsible official body of Member State / third country of origin of the material: Az anyag származási helye szerint illetékes hatóság jóváhagyása: Place of endorsement: A bejegyzés helye: Date: Dátum: Name and signature of authorized officer: A köztisztviselő neve és aláírása:	13. Stamp of the responsible official body of issue A kiadó hatóság pecsétje: Place of issue: Budapest A kiadás helye: Date: 5. 01. 2012. Dátum: Name and signature of authorized officer: Jordán László A köztisztviselő neve és aláírása:	

5. Melléklet: A görög minták behozatali engedélye

HUNGARIAN REPUBLIC NATIONAL PLANT PROTECTION ORGANISATION MAGYAR KÖZTÁRSASÁG NÖVÉNYVÉDELMI SZERVEZETE		No. Szám: 04.2/3352-6/2011	
1. Name and address of consignor/Plant protection organization of the country of origin: Feladó neve és címe/ a származási ország növényvédelmi szervezete: Dr. Charikleia Perlerou NAGREF-Forest Research Institute GR- 57006 Vassilika Thessaloniki, Greece NPPO: Ministry of Rural Development and Food Directorate of Plant Produce Protection Department of Phytosanitary Control		Letter of Authority HATÓSÁGI ENGEDÉLY for the introduction and/or movement of harmful organisms, plants, plant products and other objects for trial or scientific purposes and for work on varietal selections (issued under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61/EC) a növények, növényi, vagy egyéb termékek tudományos, kísérleti, vagy fajta szelekciós célokból történő behozatalához és szállításához [kiadva a 2008/61/EK irányelvnek való megfelelést szolgáló 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet értelmében]	
2. Name and address of person responsible for the approved activities: Az engedélyezett tevékenység végzéséért felelős személy neve és címe: DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.		3. Name of the responsible official body of issue: A kibocsátó hatóság megnevezése: Hungarian Agricultural Office MgSzH	
4. Address and description of the specific site or sites for quarantine containment A karantén körülményeket biztosító helyszín(ek) neve és címe: DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.		5. Place of origin (documentary evidence attached for material originating in a third country): Származási hely (Közösségen kívüli országból származó anyag esetében csatolni kell az igazoló okiratot): NAGREF-Forest Research Institute GR- 57006 Vassilika Thessaloniki, Greece	
Declared point of entry for material introduced from a third country: Budapest, Liszt Ferenc airport - Budapest, , Liszt Ferenc repülőtér		6. Plant passport number: Növényútlevél száma: or Phytosanitary certificate number: Növény-egészségügyi bizonyítvány száma:	
7. Scientific name(s) of the material, including the harmful/pest organisms concerned: Az anyag (ideértve a károsítót is) tudományos elnevezése: <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) Barr		8. Quantity of material: Az anyag mennyisége: 5 Petri dishes 5 db Petri csésze.	
9. Type of material: Az anyag típusa: Inoculated to growing medium in Petri dishes Petri csészében táptalajra oltva			
10. Additional declaration : Kiegészítő nyilatkozat: This material is moved within the Community under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61 Az anyag szállítása a Közösség [területén belül] a 2008/61/EK (irányelvet megvalósító 7/2001 (I.17) FVM rendelet szerint történik Delete if not applicable – A nem kívánt rész törölendő			
11. Additional information: Kiegészítő információ:			
12. Endorsement by the responsible official body of Member State / third country of origin of the material: Az anyag származási helye szerint illetékes hatóság jóváhagyása: Place of endorsement: THESSALONIKI GREECE A bejegyzés helye: Date: 2011-06-11 Datum: Name and signature of authorized officer:  A köztisztviselő neve és aláírása: ΠΟΛΥΜΕΡΟΥ ΒΑΙΟΣ ΓΕΩΠΟΝΟΣ		13. Stamp of the responsible official body of issue A kiadó hatóság pecsétje: Place of issue: Budapest A kiadás helye: Date: 3. 06. 2011 Datum: Name and signature of authorized officer: Jordán László A köztisztviselő neve és aláírása: 	

6. Melléklet: A portugál minták behozatali engedélye

HUNGARIAN REPUBLIC NATIONAL PLANT PROTECTION ORGANISATION MAGYAR KÖZTÁRSASÁG NÖVÉNYVÉDELMI SZERVEZETE		 
		No. Szám: 04.2/37-4/2012.
1. Name and address of consignor/Plant protection organization of the country of origin: Feladó neve és címe/ a származási ország növényvédelmi szervezete: Helena Bragança Unidade de Silvicultura e Produtos Florestais Instituto Nacional de Recursos Biológicos Quinta do Marquês, 2780-159 Oerias, Portugal NPPO: Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural	Letter of Authority HATÓSÁGI ENGEDÉLY for the introduction and/or movement of harmful organisms, plants, plant products and other objects for trial or scientific purposes and for work on varietal selections (issued under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61/EC) a növények, növényi, vagy egyéb termékek tudományos, kísérleti, vagy fajta szelekciós célokból történő behozatalához és szállításához [kiadva a 2008/61/EK irányelvnek való megfelelést szolgáló 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet értelmében]	
2. Name and address of person responsible for the approved activities: Az engedélyezett tevékenység végzéséért felelős személy neve és címe: Dr.Radócz László DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	3. Name of the responsible official body of issue: A kibocsátó hatóság megnevezése: Hungarian Agricultural Office MgSzH	
4. Address and description of the specific site or sites for quarantine containment A karantén körülményeket biztosító helyszín(ek) neve és címe: DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet Debrecen University DE AGTC MÉK Plant Protection Institute 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.	5. Place of origin (documentary evidence attached for material originating in a third country): Származási hely (Közösségen kívüli országból származó anyag esetében csatolni kell az igazoló okiratot): Unidade de Silvicultura e Produtos Florestais Instituto Nacional de Recursos Biológicos Quinta do Marquês, 2780-159 Oerias, Portugal	
Declared point of entry for material introduced from a third country: Budapest, Liszt Ferenc airport - Budapest, , Liszt Ferenc repülőtér	6. Plant passport number: Növényútlevél száma: or Phytosanitary certificate number: Növény-egészségügyi bizonyítvány száma:	
7. Scientific name(s) of the material, including the harmful/pest organisms concerned: Az anyag (ideértve a károsítót is) tudományos elnevezése: <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) Barr	8. Quantity of material: Az anyag mennyisége: 5 Petri dishes 5 db Petri csésze.	
9. Type of material: Az anyag típusa: Inoculated to growing medium in Petri dishes Petri csészében táptalajra oltva		
10. Additional declaration : Kiegészítő nyilatkozat: This material is moved within the Community under Ministerial Decree 7/2001 implementing Directive 2008/61 Az anyag szállítása a Közösség területén belül a 2008/61/EK irányelvet megvalósító 7/2001 (I.17) FVM rendelet szerint történik		
11. Additional information: Kiegészítő információ:		
12. Endorsement by the responsible official body of Member State / third country of origin of the material: Az anyag származási helye szerint illetékes hatóság jóváhagyása: Place of endorsement: A bejegyzés helye: Date: Dátum: Name and signature of authorized officer: A köztisztviselő neve és aláírása:	13. Stamp of the responsible official body of issue A kiadó hatóság pecsétje: Place of issue: Budapest A kiadás helye: Date: 5. 01.2012. Dátum: Name and signature of authorized officer: Jordán László A köztisztviselő neve és aláírása:	

7. Melléklet: A vizsgálatok elvégzését jóváhagyó engedély (2011)



Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság
✉ 1118 Budapest, Budaörsi út 141-145.
☎ 1/309-1000; Fax: 1/246-2942

Ikt.sz.: 04.2/3352-8/2011
Tárgy: Hatósági engedély kiadása
Ügyintéző: Dancsházy Zsuzsanna
Mellékletek 2

Dr. Radócz László úr
egyetemi docens
Debreceni Egyetem
AGTC MÉK Növényvédelmi Intézeté
Debrecen
Böszörményi út 138.
4032

Tisztelt Dr. Radócz László Úr!

Az Ön PhD hallgatójának, Görösös Gábornak 2011. május 9-én kelt kérelmére mellékelten megküldöm a behozatalra és fenntartásra tilalmazott *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr károsító zárlati körülmények közötti, kutatási célú felhasználására vonatkozó, 04.2/3352-7/2011. iktatószámú határozatot (melléklet). A kísérleti anyag behozatala Kínából a 04.2/3352-5/2011, Görögországból pedig a 04.2/3352-6/2011 iktatószámú engedély (melléklet) alapján történik.

A kísérletek végzését a 04.2/3352-7/2011 iktatószámú határozatban előírt feltételek mellett jóváhagyom.

A növény-egészségügyi feladatok végrehajtásának részletes szabályairól szóló 7/2001. (I.17.) FVM rendelet 16.§-ának megfelelően a kutatási anyaggal folytatott valamennyi tevékenységet zárlati körülmények között kell végezni.

A fenti zárlati károsítókkal folytatott kutatásra csak ellenőrzött laboratóriumi körülmények között kerülhet sor, más élő növényvel nem kerülhet kapcsolatba, a szabadföldre való kerülése tilos.

A rendelet 8. számú mellékletében meghatározott zárlati intézkedések betartását, a kutatási anyag növény-egészségügyi követelményeknek megfelelő kezelését a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Növény- és Talajvédelmi Igazgatósága ellenőrzi.

Budapest, 2011. június 9.

Üdvözlettel:



Jordán László
igazgató

8. Melléklet: A vizsgálatok elvégzését jóváhagyó engedély (2012)



Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság
✉ 1118 Budapest, Budaörsi út 141-145.
☎ 1/309-1000; Fax: 1/246-2942

Ikt.sz.: 04.2/37-7/2012
Tárgy: Engedély kiadása
Ügyintéző: Kelen Petra
Mellékletek 5

Dr. Radócz László úr
egyetemi docens
Debreceni Egyetem
AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet

Debrecen
Böszörményi út 138.
4032

Tisztelt Dr. Radócz László Úr!

Az Ön PhD hallgatójának, Görcsös Gábornak 2011. december 5-én kelt kérelmére mellékelten megküldöm a *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. izolátumoknak Szlovákiából (ikt.sz.:04.2/37-2/2012), Romániából (ikt.sz.:04.2/37-3/2012), Portugáliából (ikt.sz.:04.2/37-4/2012), Macedóniából (ikt.sz.:04.2/37-5/2012) és Ukrajnából (ikt.sz.:04.2/37-6/2012) történő beszerzéséhez és szállításához szükséges engedélyeket.

A kísérletek végzését (2012. június 1-ig) a 2011. június 9-én kelt 04.2/3352-7/2011 iktatószámú határozatban előírt feltételek mellett jóváhagytam.

A növényegészségügyi feladatok végrehajtásának részletes szabályairól szóló 7/2001. (I.17.) FVM rendelet 16.§-ának megfelelően a kutatási anyaggal folytatott valamennyi tevékenységet zárlati körülmények között kell végezni.

A fenti zárlati károsítókkal folytatott kutatásra csak ellenőrzött laboratóriumi körülmények között kerülhet sor, más élő növényvel nem kerülhet kapcsolatba, a szabadföldre való kerülése tilos.

A rendelet 8. számú mellékletében meghatározott zárlati intézkedések betartását, a kutatási anyag növény-egészségügyi követelményeknek megfelelő kezelését a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Növény- és Talajvédelmi Igazgatósága ellenőrzi.

Budapest, 2012. január 5.

Üdvözlettel:

Jordán László
igazgató

9. Melléklet: A vizsgálatok elvégzését jóváhagyó határozat



Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság
✉ 1118 Budapest, Budaörsi út 141-145.
☎ 1/309-1000; Fax: 1/246-2942

Ikt.sz.: 04.2/3352-7/2011
Tárgy: Hatósági engedély zárlati
kórokozó fenntartására
Ügyintéző: Dancsházy Zsuzsanna
Mellékletek -

A Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, mint növényvédelmi jogkörben eljáró elsőfokú hatóság (a továbbiakban: elsőfokú hatóság) a Debreceni Egyetem AGTC MÉK Növényvédelmi Intézetének (4032 Debrecen, Böszörményi út 138.) mint ügyfélnek (a továbbiakban: ügyfél) az *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr zárlati károsítóval kapcsolatos kísérleti engedélyezése ügyében meghozta az alábbi

HATÁROZATot:

Az elsőfokú hatóság az *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr zárlati károsítóval folytatott kísérletek végzését, az alábbiak szerint

ENGEDÉLYEZI.

Jelen határozat alapján a fentebb írt kísérleteket az ügyfél a DE AGTC MÉK Növényvédelmi Intézetének laboratóriumában (4032 Debrecen, Böszörményi út 138.) végezheti 2012. június 1. napjáig.

Az ügyfél köteles a fertőzés veszélyét magába rejtő anyagokat a vizsgálat befejezését követően, a továbbterjedést megakadályozva, biztonságosan megsemmisíteni.

Jelen határozat ellen a kézhezvételtől számított 30 napon belül keresetet indíthat a Fővárosi Bírósághoz címezve, de az engedélyező hatóságnál előterjesztve jogszabálysértésre hivatkozással. A keresetlevél benyújtásának a határozat végrehajtására nincs halasztó hatálya, azonban a keresetlevélben a végrehajtás felfüggesztése kérhető.

Jelen eljárásban eljárási költség nem merült fel.

INDOKLÁS:

Az ügyfél 2011. május 9-én kelt, 04.2/3352-1/2011 iktatószámú beadványában a szelídgesztenye kéregrákot okozó *Cryphonectria parasitica* gomba tenyészetek zárt körülmények közötti **fenntartásának** és vizsgálatának engedélyezését kérte. A vizsgálatokhoz szükséges magyarországi izolátumokat a hazai szelídgesztenye állományokból kívánja begyűjteni, majd a kórokozó tisztított tenyészetét táptalajon fenntartani. A külföldi tenyészeteket Petri csészében táptalajra oltva kívánja behozni a környező országokból (Szlovákia, Románia, Ukrajna), valamint Görögországból és Kínából. A vizsgálat maga az előkészített mintákból izolált DNS anyagból történik.

Az elsőfokú hatóság a 04.2/3352-3/2011. számú megkeresésében felhívta a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Növény- és Talajvédelmi Igazgatóságát (NTI), hogy a növény-

egészségügyi feladatok végrehajtásának részletes szabályairól szóló 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet (a továbbiakban: R.) 16.§-a alapján ellenőrizze a kutatási anyaggal folytatott tevékenység feltételeinek meglétét.

Az NTI 2011. május 27-én szemlét tartott a Debreceni Egyetem AGTC MÉK Növényvédelmi Intézetének laboratóriumában. A szemle során megállapítást nyert, hogy az ügyfél a kutatási anyaggal folytatott tevékenység jogszabályi feltételeinek megfelel. A helyszíni szemle során jegyzőkönyv készült, mely kimondja, hogy az ügyfél az ellenőrzési listában foglalt szempontokat figyelembe véve eleget tud tenni az előírt higiéniai és 1. szintű elszigetelési (zárlati) követelményeknek és tárolási előírásoknak. Fentiek alapján az NTI a vizsgálati hely alkalmasságáról szóló 2257/2-NOVF/2011 iktatószámon szakvéleményt állított ki, miszerint a laboratórium a kísérleti anyaggal folytatott tevékenység személyi és tárgyi feltételeinek megfelel.

A *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr a szaporítóanyag termesztésben a behozatalra tilalmazott fajok listáján szereplő károsító, a szelídgesztenye állományokban azonban már elterjedt. A Debreceni Egyetem laboratóriumában a különböző származású izolátumok összehasonlítására végzendő kísérletek célja az összefüggések felfedése a földrajzi távolság és az esetleges filogenetikai különbségek között a kárpát-medencei *Cryphonectria parasitica* szubpopulációkban. Az így szerzett ismeretek hozzájárulhatnak a kórokozó elleni védekezés kidolgozásában és fejlesztésében. Mindezek alapján a kérelem engedélyezése mellett döntöttem. A Debreceni Egyetem AGTC MÉK Növényvédelmi Intézetének laboratóriuma a vizsgálatokat saját anyagi felelőssége mellett köteles végezni.

A növényvédelmi jogkörben eljáró hatóság a kísérlettel érintett terület vonatkozásában külön határozatban zárlatot rendelhet el a károsító továbbterjedésének megakadályozása érdekében.

A fenti tényállás, a R. 16.§ (1) bekezdés rendelkezései alapján a növényvédelmi jogkörben első fokon eljáró hatóság a kérelemmel érintett kísérlet végrehajtását 2012. június 1. napjáig engedélyezte. A kísérletek további engedélyezéséhez az engedély megújítása iránti, a feltételek megváltozása esetén pedig új, módosító kérelem beadása szükséges.

Közigazgatási eljárásban a fellebbezési jog kizártságáról az élelmiszerláncról és hatósági felügyeletről szóló 2008. évi XLVI. törvény 39. § (4) bekezdés o) pontja rendelkezik. A jogorvoslat lehetőségéről és feltételeiről a Ket. 109.§ és 110.§ (1) bekezdése rendelkezik. A hatáskörrel és az illetékességről a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatalról szóló 327/2010 (XII. 27.) Korm. rendelet 3. § (1) bekezdése, 5. § c) pontja 8. § (1) bekezdése, az illetékekről pedig az 1990. évi XCIII. törvény 43.§ (3) bekezdése és a 62.§ (1) h) pontja rendelkezik.

Budapest, 2011. június 9.




Jördán László
igazgató

Kapják:

1. Ügyfél
2. Ügyintéző
3. Irattár
4. Illetékes megyei Kormányhivatal NTI vezetője

10. Melléklet: 2011. évi jegyzőkönyv zárlati kártevő növényegészségügyi vizsgálatának tárgyi feltételeiről a Növényvédelmi Intézet laboratóriumaiban

JEGYZŐKÖNYV növény-egészségügyi vizsgálatról					
Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Növény és Talajvédelmi Igazgatóság				Sorszám: J 023182	
Címe: 4032, Debrecen, Böszörményi u. 146.					
Tel./Fax: 52/525-925 / 52/417-613 E-mail: ntsz@hajdu.ontsz.hu					
Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma					
2. Pontos címe: 4032 Debrecen Böszörményi út 138.					
3. Tel./Fax/e-mail:			4. Növ.eü. nyilvántartási szám:		
5. Költségviselő neve:					
6. Pontos címe:					
7. Tel./Fax/e-mail:			8. Növ.eü. nyilvántartási szám:		
A jogokra, kötelezettségekre vonatkozó tájékoztatást tudomásul vettem, nyilatkozatot teszek / nem teszek (a megfelelő rész aláhúzandó!):					
9. Vizsgálat helye (település, telep) megnevezése: Debrecen			10. Vizsgálat / mintavétel ideje: 2011-05-27		
11.a. Növény-egészségügyi vizsgálat jellege: Cryphonectria parasitica károsító			11.b. Növény-egészségügyi ellenőrzés jellege:		
kísérleti célú behozatala előtti előzetes szemle					
12. Vizsgált hely adatai:					
Sorsz.	Hrsz., tábla, raktár, szállítóeszköz azonosítója			GPS koor. kódja	Növ.eü. szállítólevél száma
1.	Böszörményi út 138. B épület II. emelet Növényvédelmi Intézet				
2.					
3.					
13. Vizsgált növény, termék adatai:			14. Mintavétel laboratóriumi vizsgálat céljából:		
Sorsz.	Növény, termék megnevezése	Növényfajta	Területe (ha, m ²)	Menny. (kg, t, db)	Mintázott tétel jelzése azonosító adatai*
1.	Molekuláris biológiai labor				22 m2
2.	Táptalaj labor				25 m2
3.					
4.					
15. Fenológiai állapot:					
16. Származási ország:			18. Egyéb adatok:		
17. Rendeltetési ország (export esetén):					
19. Az eljáró növényvédelmi felügyelő a helyszíni vizuális vizsgálat során a növényállományban, növényi terméken, természetű közegben az alábbi fertőzést (fertőzés gyanúját) állapította meg:					
Károsító megnevezése		Növény (faj, fajta), termék megnevezése		Fertőzés (% db, db/kg)	Labor.vizs. igényei*
20. Hatóság megállapítása, rendelkezése: A laboratóriumok a 7/2001 (I.17.) FVM rendelet 16 §, illetve annak 8. számú mellékletében foglaltak alapján meghatározott tárgyi és személyi feltételeknek megfelel. A kísérleti célú kórokozók csak laboratóriumi, zárt körülmények között kerülnek felhasználásra. A vizsgálatok befejezése után a kórokozók autoklávban megsemmisítésre kerülnek.					
					
Debrecen		20. 2011-05-27			
A jegyzőkönyvet 1 példányban átvettem: <i>Bujdosó Tibor</i>					
P.H.		termelő v. megbízottja		Bujdosó Tibor növényvédelmi felügyelő	

11. Melléklet: 2012. évi jegyzőkönyv zárlati kártevő növényegészségügyi vizsgálatának tárgyi feltételeiről a Növényvédelmi Intézet laboratóriumaiban

JEGYZŐKÖNYV
növény-egészségügyi vizsgálatról



Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Növény és Talajvédelmi Igazgatóság
Sorszám: **J 050177**
Címe: 4032, Debrecen, Böszörményi u. 146.
Tel./Fax: 52/525-925 / 52/417-613 E-mail: ntsz@hajdu.ontsz.hu

1. Termelő (tulajdonos, bérlet, forgalmazó) neve: **Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma**
2. Pontos címe: 4032 Debrecen Böszörményi út 138.
3. Tel./Fax/e-mail: 4. Növ. eü. nyilvántartási szám:
5. Költségviselő neve:
6. Pontos címe:
7. Tel./Fax/e-mail: 8. Növ. eü. nyilvántartási szám:

A jogokra, kötelezettségekre vonatkozó tájékoztatást tudomásul vettem, nyilatkozatot **teszek / nem teszek** a megfelelő rész aláhúzandó!

9. Vizsgálat helye (település, telepi megnevezés): **Debrecen**
10. Vizsgálat / mintavétel ideje: **2012-06-21**
11. a. Növény-egészségügyi vizsgálat jellege: **Cryphonectria parasitica károsító**
11. b. Növény-egészségügyi ellenőrzés jellege:
12. Vizsgálat hely adatai:
Sorsz. Hrsz., tábla, raktár, szállítóeszköz azonosítója GPS koor. kódja Növ. eü. szállítólevél száma Terület/Menny. (db, t, ha)
1. Böszörményi út 138. B épület II. emelet Növényvédelmi Intézet
2.
3.

13. Vizsgált növény, termék adatai:
Sorsz. Növény, termék megnevezése Növényfajta Területe (ha, m²) Menny. (kg, t, db) Mintázott tétel jelzése azonosító adatai* Minta sz. (db) Növényi rész Menny. (kg, db)
1. Molekuláris biológiai labor
2. Táptalaj labor
3.
4.

14. Mintavétel laboratóriumi vizsgálat céljából:
15. Fenológiai állapot:
16. Származási ország:
17. Rendeltetési ország (export esetén):
18. Egyéb adatok:

19. Az eljáró növényvédelmi felügyelő a helyszíni vizuális vizsgálat során a növényállományban, növényi terméken, termesztő közegben az alábbi fertőzést (fertőzés gyanúját) állapította meg:
Károsító megnevezése Növény ifaj, fajtái, termék megnevezése Fertőzés (% db, db/kg) Laborviz. igényel* Minta azonosító

20. Hatóság megállapítása, rendelkezése: A laboratóriumok a 7/2001 (I.17.) FVM rendelet 16 §, illetve annak 8. számú mellékletében foglaltak alapján meghatározott tárgyi és személyi feltételeknek megfelel. A kísérleti célú kórokozók csak laboratóriumi, zárt körülmények között kerülnek felhasználásra. A vizsgálatok befejezése után a kórokozók autoklávban megsemmisítésre kerülnek.

Debrecen, 2012-06-21

A jegyzőkönyvet 1 példányban a Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Növény- és Talajvédelmi Igazgatóság, a Növényvédelmi Intézet, a termelő v. megbízottja



Bujdosó Tibor
növényvédelmi felügyelő

12. Melléklet: 2013. évi jegyzőkönyv zárlati kártevő növényegészségügyi vizsgálatának tárgyi feltételeiről a Növényvédelmi Intézet laboratóriumaiban

JEGYZŐKÖNYV
növény-egészségügyi vizsgálatról

Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal
Növény- és Talajvédelmi Igazgatóság
4032 Debrecen, Bőszörményi út 146.
2. 4015 Debrecen, Pf. 21.

Sorszám: **J 070267**

Címe: _____
Tel./Fax: _____ E-mail: _____

1. Termelő (tulajdonos, bérlet, forgalmazó) neve: **Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma**
4032 Debrecen Bőszörményi út 138.

2. Pontos címe: _____
3. Tel./Fax/e-mail: _____ 4. Növ.ü. nyilvántartási szám: _____
5. Költségviselő neve: _____
6. Pontos címe: _____ 8. Növ.ü. nyilvántartási szám: _____
7. Tel./Fax/e-mail: _____

A jogokra, kötelezettségekre vonatkozó tájékoztatást tudomásul vettem, nyilatkozatot **teszek / nem teszek** a megfelelő rész aláhúzásával:

9. Vizsgálat helye (település, telepi megnevezése): **Debrecen** 10. Vizsgálat / mintavétel ideje: **2013-12-03**
11.a. Növény-egészségügyi vizsgálat jellege: **Behozatali engedély lejárta követő ellenőrzés**
11.b. Növény-egészségügyi ellenőrzés jellege: _____

12. Vizsgált hely adatai:

Sorsz.	Hrsz., tábla, raktár, szállítóeszköz azonosítója	GPS koor. kódja	Növ.ü. szállítólevél száma	Terület/Menny. (db, t, ha)
1.	Bőszörményi út 138. B épület II. emelet Növényvédelmi Intézet			
2.				
3.				

13. Vizsgált növény, termék adatai:

Sorsz.	Növény, termék megnevezése	Növényfajta	Területe (ha, m ²)	Menny. (kg, t, db)	Mintázott tétel jelzése azonosító adatai*	Minta sz. (db)	Növényi rész	Menny. (kg, db)
1.	Cryphonectria parasitica							
2.	gombával fertőzött petri							
3.	csészék							
4.								

14. Mintavétel laboratóriumi vizsgálat céljából:

15. Fenológiai állapot: _____
16. Származási ország: _____
17. Rendeltetési ország (export esetén): _____

18. Egyéb adatok: _____

19. Az eljáró növényvédelmi felügyelő a helyszíni vizuális vizsgálat során a növényállományban, növényi terméken, termesztő közegben az alábbi fertőzést (fertőzés gyanúját) állapította meg:

Károsító megnevezése	Növény (faj, fajta), termék megnevezése	Fertőzés (%, db, db/kg)	Labor vizs. igényei*	Minta azonosító

20. Hatóság megállapítása, rendelkezése:

A vizsgálatok befejezése után a gombával fertőzött petri csészék és a DNS izolálás során megmaradt gomba maradványok autoklávban kerültek megsemmisítésre, magas nyomás és hőmérséklet körülmények mellett.

Debrecen 20. 2013-12-03
A jegyzőkönyvet 1 példányban átvettem:
P.H. _____
termelő v. megbízottja

Bodnár-Szabolcs
növényvédelmi felügyelő

255.
Plant Protection Inspector

15-6

13. Melléklet: A begyűjtött minták főbb adatai

ORSZÁG	HELYSÉGNÉV	MINTANÉV	SZÉLESSÉG	HOSSZÚSÁG	GYŰJTÉS IDEJE
MAGYARORSZÁG	Érsekvadkert	ÉRSEK 1	48° 0'11.70"É	19°11'52.44"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Érsekvadkert	ÉRSEK 3	48° 0'11.52"É	19°11'52.50"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Ágfalva	AGF 2	47°41'6.12"É	16°31'20.10"K	2012 május 9
MAGYARORSZÁG	Ágfalva	AGF 4	47°41'12.06"É	16°31'22.62"K	2012 május 9
MAGYARORSZÁG	Sopron	BF 1	47°40'29.94"É	16°33'5.40"K	2012 május 9
MAGYARORSZÁG	Sopron	BF 3	47°40'29.46"É	16°32'57.00"K	2012 május 9
MAGYARORSZÁG	Döbröce	DOBR 1	46°55'36.18"É	17°11'34.86"K	2012 május 10
MAGYARORSZÁG	Döbröce	DOBR 3	46°55'35.52"É	17°11'36.18"K	2012 május 10
MAGYARORSZÁG	Döbröce	DOBR 5	46°55'33.84"É	17°11'37.86"K	2012 május 10
MAGYARORSZÁG	Sopron	FBR 1	47°39'55.98"É	16°32'53.82"K	2012 május 9
MAGYARORSZÁG	Sopron	FBR 3	47°40'3.30"É	16°32'54.30"K	2012 május 9
MAGYARORSZÁG	Iharosberény	IHB 1	46°21'59.88"É	17° 4'42.61"K	2012 május 10
MAGYARORSZÁG	Iharosberény	IHB 3	46°21'51.42"É	17° 4'39.00"K	2012 május 10
MAGYARORSZÁG	Sopron	PRINC 1	47°40'20.82"É	16°34'5.88"K	2012 május 9
MAGYARORSZÁG	Sopron	PRINC 3	47°40'20.96"É	16°34'4.07"K	2012 május 9
MAGYARORSZÁG	Pálháza	PAL2	48°29'35.58"É	21°30'16.02"K	2012 május 18
MAGYARORSZÁG	Pálháza	PAL3	48°29'34.11"É	21°29'58.32"K	2012 május 18
MAGYARORSZÁG	Kadarkút	KAD1	46°14'23.40"É	17°39'10.80"K	2012 augusztus 7
MAGYARORSZÁG	Kadarkút	KAD3	46°14'10.44"É	17°39'13.80"K	2012 augusztus 7
MAGYARORSZÁG	Zengővárkony	ZENG2	46°10'9.56"É	18°25'33.60"K	2012 szeptember 22
MAGYARORSZÁG	Zengővárkony	ZENG3	46°10'8.52"É	18°25'31.02"K	2012 szeptember 22
MAGYARORSZÁG	Pécs	PECS1	46° 6'50.04"É	18°14'44.04"K	2012 szeptember 22
MAGYARORSZÁG	Pécs	PECS3	46° 6'51.66"É	18°14'43.92"K	2012 szeptember 22
MAGYARORSZÁG	Nagymaros	B1	47°48'33.42"É	18°57'42.96"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Nagymaros	C1	47°48'34.56"É	18°57'41.40"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Nagymaros	E3	47°48'34.02"É	18°57'37.98"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Nagymaros	F4	47°48'33.36"É	18°57'37.50"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Nagymaros	J2	47°48'33.18"É	18°57'41.58"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Nagymaros	N2	47°48'34.74"É	18°57'41.46"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Nagymaros	MV 1/4	47°48'34.50"É	18°57'41.64"K	2011 május 13
MAGYARORSZÁG	Nagymaros	MV 1/6	47°48'34.20"É	18°57'41.82"K	2011 május 13
UKRAJNA	Serednje	S 1	48°32'12.41"É	22°29'13.26"K	2011 április 23
UKRAJNA	Serednje	S 3	48°32'13.18"É	22°29'12.35"K	2011 április 23
UKRAJNA	Bobovyshe	BOB 1-1	48°32'12.32"É	22°39'17.23"K	2011 április 23
UKRAJNA	Bobovyshe	BOB 1-3	48°32'12.79"É	22°39'16.95"K	2011 április 23
UKRAJNA	Bobovyshe	BOB 2-2	48°32'19.99"É	22°39'24.71"K	2011 április 23
UKRAJNA	Bobovyshe	BOB 2-4 T	48°32'19.87"É	22°39'26.38"K	2011 április 23
UKRAJNA	Bobovyshe	BOB 3-1	48°32'23.19"É	22°39'2.18"K	2011 április 23
UKRAJNA	Bobovyshe	BOB 3-3	48°32'24.80"É	22°39'1.52"K	2011 április 23
UKRAJNA	Rostovjatica	RO 4	48°34'49.20"É	22°38'0.78"K	2011 április 23
UKRAJNA	Rostovjatica	RO 6	48°34'48.17"É	22°38'2.30"K	2011 április 23
ROMÁNA	Nagybánya	Vevi 1	47°40'34.14"É	23°33'41.04"K	2011 szeptember 7

ROMÁNA	Nagybánya	Vevi 2	47°40'33.94"É	23°33'41.61"K	2011 szeptember 7
ROMÁNA	Nagybánya	TG 1	47°40'22.44"É	23°29'53.10"K	2011 szeptember 7
ROMÁNA	Nagybánya	TG 2	47°40'22.68"É	23°29'52.53"K	2011 szeptember 7
ROMÁNA	Nagybánya	TG 4 T	47°40'23.14"É	23°29'51.38"K	2011 szeptember 7
ROMÁNA	Nagybánya	FEL 1 T1	47°39'58.42"É	23°37'14.08"K	2011 szeptember 7
ROMÁNA	Nagybánya	FEL 4	47°39'59.94"É	23°37'17.34"K	2011 szeptember 7
ROMÁNA	Nagybánya	KOBA 2	47°40'19.74"É	23°34'54.66"K	2011 szeptember 7
ROMÁNA	Nagybánya	KOBA 4T	47°40'19.14"É	23°34'52.26"K	2011 szeptember 7
ROMÁNA	Tismana	TIS 3	45° 4'53.52"É	22°56'44.88"K	2012 szeptember 2
ROMÁNA	Tismana	TIS 5	45° 5'10.44"É	22°56'19.68"K	2012 szeptember 2
ROMÁNA	Modrý Kameň	MDK 1	48°14'27.24"É	19°19'46.74"K	2011 december 8
SZLOVÁKIA	Modrý Kameň	MDK 2	48°14'29.52"É	19°19'46.44"K	2011 december 8
SZLOVÁKIA	Modrý Kameň	MDK 4	48°14'49.20"É	19°20'2.10"K	2011 december 8
SZLOVÁKIA	Modrý Kameň	MDK 6	48°14'44.22"É	19°19'59.58"K	2011 december 8
SZLOVÁKIA	Párovské Háje	PAR 1T	48°16'43.86"É	18° 0'34.74"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Párovské Háje	PAR 3	48°16'44.04"É	18° 0'33.66"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Párovské Háje	PAR 5	48°16'44.94"É	18° 0'32.04"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Modra	MOD 1	48°20'27.44"É	17°17'10.51"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Modra	MOD 4	48°20'26.46"É	17°17'8.16"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Svätý Jur	SVA 1	48°15'3.43"É	17°11'43.72"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Svätý Jur	SVA 3	48°15'2.28"É	17°11'41.46"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Bratislava	BRA 1	48°10'7.50"É	17° 6'16.74"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Bratislava	BRA 3	48°10'8.10"É	17° 6'17.52"K	2012 január 18
SZLOVÁKIA	Krná	KRNÁ 1	48°30'42.66"É	19°44'24.00"K	2012 augusztus 3
SZLOVÁKIA	Krná	KRNÁ 5	48°30'41.69"É	19°44'22.13"K	2012 augusztus 3
SZLOVÁKIA	Petrovce	PETROVCE 1	48°42'17.43"É	22°20'23.05"K	2012 szeptember 19
SZLOVÁKIA	Petrovce	PETROVCE 3	48°42'18.90"É	22°20'22.98"K	2012 szeptember 19
BULGÁRIA	Petrich	PET 1	41°22'14.46"É	23°11'15.30"K	2011 október 5
BULGÁRIA	Petrich	PET 3	41°22'32.83"É	23°12'22.36"K	2011 október 5
MACEDÓNIA	Vrutok	VRUT 1	41°46'33.00"É	20°51'7.98"K	2011 október 4
MACEDÓNIA	Vrutok	VRUT 3	41°46'23.46"É	20°50'38.64"K	2011 október 4
MACEDÓNIA	Osoj	OSOJ 2	41°31'50.04"É	20°56'4.80"K	2011 október 4
MACEDÓNIA	Osoj	OSOJ 7	41°31'46.92"É	20°56'2.70"K	2011 október 4
MACEDÓNIA	Volino	VOL 1	41°12'41.88"É	20°46'23.94"K	2011 október 4
MACEDÓNIA	Volino	VOL 4	41°12'43.20"É	20°46'24.42"K	2011 október 4
MACEDÓNIA	Radolishta	RAD 1	41° 9'38.58"É	20°37'14.88"K	2011 október 5
MACEDÓNIA	Radolishta	RAD 5	41° 9'40.68"É	20°37'18.12"K	2011 október 5
MACEDÓNIA	Tetovo	TET 3	42° 1'18.60"É	20°57'40.26"K	2011 október 4
MACEDÓNIA	Tetovo	TET 9 hpv	42° 1'16.86"É	20°57'42.00"K	2011 október 4
PORTUGÁLIA	Terceira (Azores)	C 0722			2003
PORTUGÁLIA	Trás os Montes	C 0003			2003
PORTUGÁLIA	Alentejo	C 0006			2002
PORTUGÁLIA	Terceira (Azores)	C 0008			2003
PORTUGÁLIA	Madeira	C 0009			2003
GÖRÖGORSZÁG	Pieria	FRI PIR 1			

GÖRÖGORSZÁG	Arcadia	FRI ARK 14			
GÖRÖGORSZÁG	Pistaria	FRI P 73			
GÖRÖGORSZÁG	Kalivrise	FRI KAV 5h _{pv}			
GÖRÖGORSZÁG	Hortiatia	FRI HOR 10h _{pv}			
GÖRÖGORSZÁG	Prpones	P 5-1			
GÖRÖGORSZÁG	Prpones	P 5-2			
GÖRÖGORSZÁG	Melivoia	ME 48-1			
GÖRÖGORSZÁG	Melivoia	ME 48-2			

14. Melléklet: A Nucleospin plant II. protokoll

1. Minta homogenizálása

Homogenizáljunk 100 mg nedves tömegű vagy 20 mg száraz tömegű mintát.

2. Sejt feltárása

A keletkezett homogenizátumhoz egy tesztcsőbe helyezzük és hozzáadunk 400 µl PL1 puffert. Majd vortex segítségével alaposan összekeverjük. Ezután 10 µl RNase A oldatot adunk a mintához és alaposan összekeverjük majd a kapott oldatot 10 percig 65 °C-on inkubáljuk.

3. A durva lizátum szűrése és tisztítása

Minden egyes minta esetében a centrifuga csőbe egy NucleoSpin Filtert (lila cső) helyezünk és rápipettázuk a mintákat. Ezután 2 percen keresztül 11000 g-n centrifugáljuk a mintát majd a tiszta átfolyót összegyűjtjük és a hulladék NucleoSpin Filtert kidobjuk. Ha nem az összes folyadék halad át a filteren a centrifugálást meg kell ismételni. Ha szilárd részecske látszódik az átfolyó mintában, a tiszta felülúszó folyadékot egy új centrifuga csőbe helyezzük bele és ismételjük meg a centrifugálást.

4. A DNS kötés beigazítása

450 µl PC puffert adunk a mintához és pipetta segítségével keverjük össze az elegyet. (5X pipettával felszívjuk az oldatot.)

5. A DNS kötése

Egy új tesztcsőbe belehelyezzük a NucleoSpin Plant II Column (zöld cső) és maximum 700 µl mintát belepipettázunk a mintából. Ha több mint 700 µl mintánk van akkor a lépést ismételjük meg. Ezután 1 percen keresztül 11000 g-n centrifugáljuk a mintát majd a tiszta átfolyót összegyűjtjük és a hulladék NucleoSpin Plant II Column kidobjuk.

6. A szilika membrán mosása és szárítása

A szilika membránt háromszor mossuk át. Az első mosás alkalmával 400 µl PW1 puffert pipettázunk a NucleoSpin Plant II oszlopra, majd 1 percig 11000 g-n centrifugáljuk. Az átfolyót ezután kidobjuk. Bár a pufferrel történő mosás során

növekszik a minta tisztasága, néhány esetben kissé csökken a végső kihozatal. A második mosás során 700 µl PW2 puffert pipetázunk a NucleoSpin Plant II oszlopra, majd 1 percig 11000 g-n centrifugáljuk. Az átfolyót ezután kidobjuk. A harmadik mosásnál további 200 µl PW2 puffert pipetázunk a NucleoSpin Plant II oszlopra, majd 2 percig 11000 g-n centrifugáljuk, hogy az oszlop teljesen megszáradjon.

7. A DNS leoldása

A NucleoSpin Plant II oszlopot egy új centrifuga csőbe helyezzük és 50 µl PE 65 °C-ra előmelegített elúciós puffert pipetázunk az oszlopra és a mintát 5 percig 65 °C-on inkubáljuk. Ezt követően a mintát 11000 g-n centrifugáljuk 1 percig.

15. Melléklet: A Bulgáriából származó minták konverziós tesztjének eredményei

	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4	PET 5
PET 1					
PET 2	+				
PET 3	+	+			
PET 4	+	+	+		
PET 5	+	+	+	+	

16. Melléklet: A Görögországból származó minták konverziós tesztjének eredményei

	FRI PIR 1	FRI ARK 14	FRI P 73	FRI KAV 5h _{pv}	FRI HOR 10h _{pv}	P 5-1	P 5-2	ME 48-1	ME 48-2
FRI PIR 1									
FRI ARK 14	+								
FRI P 73	+	+							
FRI KAV 5h _{pv}	+	+	+						
FRI HOR 10h _{pv}	+	+	+	+					
P 5-1	+	+	+	+	+				
P 5-2	+	+	+	+	+	+			
ME 48-1	+	+	+	+	+	+	+		
ME 48-2	+	+	+	+	+	+	+	+	

17. Melléklet: A Macedóniából származó minták konverziós tesztjének eredményei

	VRUT 1	VRUT2	VRUT 3	VRUT 4	OSOJ 1	OSOJ 3	OSOJ 5	OSOJ 6	VOL 1	VOL 2	VOL 4	VOL 5	RAD 2	RAD 3	RAD 5	RAD 7	TET 1	TET 2	TET 5	TET 7
VRUT 1																				
VRUT 2	+																			
VRUT 3	+	+																		
VRUT 4	+	+	+																	
OSOJ 1	+	+	+	+																
OSOJ 3	+	+	+	+	+															
OSOJ 5	+	+	+	+	+	+														
OSOJ 6	+	+	+	+	+	+	+													
VOL 1	+	+	+	+	+	+	+	+												
VOL 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+											
VOL 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+										
VOL 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
RAD 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
RAD 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
RAD 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
RAD 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
TET 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
TET 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
TET 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
TET 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

18. Melléklet: A Portugáliából származó minták konverziós tesztjének eredményei

	C 0722	C 0003	C 0006	C 0008	C 0009
C 0722	-	-	-	-	-
C 0003	-	-	-	-	-
C 0006	-	-	-	-	-
C 0008	-	-	-	-	-
C 0009	-	-	-	-	-

19. Melléklet: A Romániából származó minták konverziós tesztjének eredményei

	VEVI 1	VEVI 2	VEVI 3	TG 1	TG 2	TG 3	TG 4	FEL 1	FEL 2	FEL 3	FEL 4	KOBA 1	KOBA 2	KOBA 3	KOBA 4	KOBA 5	TIS 1	TIS 2	TIS 3	TIS 4	TIS 5
VEVI 1		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VEVI 2	+		+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VEVI 3	+	+		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TG 1	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TG 2	-	-	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TG 3	+	+	+	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TG 4	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FEL 1	+	+	+	-	-	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FEL 2	+	+	+	-	-	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FEL 3	+	+	+	-	-	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FEL 4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KOBA 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
KOBA 2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
KOBA 3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
KOBA 4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
KOBA 5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
TIS 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
TIS 2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
TIS 3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
TIS 4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
TIS 5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

20. Melléklet: Az Ukrajnából származó minták konverziós tesztjének eredményei

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	BOB 1-1	BOB 1-2	BOB 1-3	BOB 1-4	BOB 2-1	BOB 2-2	BOB 2-3	BOB 2-4	BOB 3-1	BOB 3-2	BOB 3-3	RO 1	RO 2	RO 3	RO 4	RO 5
S 1		+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
S 2	+		+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
S 3	+	+		-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
S 4	-	-	-		+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
S 5	-	-	-	+		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
BOB 1-1	+	+	+	-	-		+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BOB 1-2	+	+	+	-	-	+		+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BOB 1-3	+	+	+	-	-	+	+		+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BOB 1-4	+	+	+	-	-	+	+	+		+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BOB 2-1	+	+	+	-	-	+	+	+	+		-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BOB 2-2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
BOB 2-3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-		-	+	+	+	+	+	+	-	-
BOB 2-4	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	+	+
BOB 3-1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-		+	+	+	+	+	-	-
BOB 3-2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+		+	+	+	+	-	-
BOB 3-3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+		+	+	+	-	-
RO 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+		+	+	-	-
RO 2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+		+	-	-
RO 3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+		-	-
RO 4	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-		+
RO 5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	

21. Melléklet: A Szlovákiából minták konverziós tesztjének eredményei I.

	MDK 1	MDK 2	MDK 4	MDK 5	MDK 6	MDK 7	PAR 1	PAR 3	PAR 4	PAR 5	PAR 6	PAR 7	MOD 1	MOD 2	MOD 3	MOD 4	MOD 5	SVA 1	SVA 2	SVA 3	SVA 4	SVA 5
MDK 1		+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MDK 2	+		-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MDK 4	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
MDK 5	+	+	-		+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MDK 6	+	+	-	+		+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MDK 7	+	+	-	+	+		+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PAR 1	+	+	-	+	+	+		+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PAR 3	+	+	-	+	+	+	+		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PAR 4	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAR 5	+	+	-	+	+	+	+	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PAR 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAR 7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOD 1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+	-	+	+	-	+	+	-	+
MOD 2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		-	+	+	-	+	+	-	+
MOD 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-
MOD 4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-		+	-	+	+	-	+
MOD 5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+		-	+	+	-	+
SVA 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-
SVA 2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-		+	-	+
SVA 3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+		-	+
SVA 4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
SVA 5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	

	BRA 1	BRA 2	BRA 3	BRA 4	BRA 5	KRNÁ 1	KRNÁ 2	KRNÁ 3	KRNÁ 4	KRNÁ 5	KRNÁ 6	PETR 1	PETR 2	PETR 3	PETR 4	PETR 5	PETR 6
BRA 1		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
BRA 2	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
BRA 3	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
BRA 4	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BRA 5	-	-	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
KRNÁ 1	-	-	-	-	+		+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
KRNÁ 2	-	-	-	-	+	+		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
KRNÁ 3	-	-	-	-	+	+	+		+	+	+	+	+	-	+	+	+
KRNÁ 4	-	-	-	-	+	+	+	+		+	+	+	+	-	+	+	+
KRNÁ 5	-	-	-	-	+	+	+	+	+		+	+	+	-	+	+	+
KRNÁ 6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	-	+	+	+
PETR 1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+	+	+
PETR 2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		-	+	+	+
PETR 3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
PETR 4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		+	+
PETR 5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+
PETR 6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	

23. Melléklet: A Magyarországról minták konverziós tesztjének eredményei I.

	PRINC 1	PRINC 2	PRINC 3	PAL 1	PAL 2	PAL 3	PAL 4	KAD 1	KAD 2	KAD 3	KAD 4	ZENG 1	ZENG 2	ZENG 3	ZENG 4	PECS 1	PECS 2	PECS 3	PECS 4	B1	C1	J2
PRINC 1		+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
PRINC 2	+		+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
PRINC 3	+	+		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
PAL1	-	-	-		+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
PAL2	-	-	-	+		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
PAL3	-	-	-	+	+		+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
PAL4	-	-	-	+	+	+		+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
KAD1	-	-	-	+	+	+	+		+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
KAD2	-	-	-	+	+	+	+	+		-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
KAD3	+	+	+	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
KAD4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-		+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
ZENG1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+		+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
ZENG2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+		-	+	-	-	+	-	+	+	+
ZENG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
ZENG4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-		-	-	+	-	+	+	+
PECS1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		+	-	+	-	-	-
PECS2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+		-	+	-	-	-
PECS3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-		-	+	+	+
PECS4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-		-	-	-
B1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-		+	+
C1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+		+
J2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	

24. Melléklet: A Magyarországról minták konverziós tesztjének eredményei II.

	ÉRSEK 1	ÉRSEK 2	ÉRSEK 3	AGF 1	AGF 2	AGF 3	AGF 4	BF 1	BF 2	BF 3	DOBR 1	DOBR 2	DOBR 3	DOBR 4	FBR 1	FBR 2	FBR 3	FBR 4	IHB 1	IHB 2	IHB 3	IHB 4
ÉRSEK 1		+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
ÉRSEK 2	+		+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
ÉRSEK 3	+	+		-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
AGF 1	-	-	-		+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
AGF 2	-	-	-	+		-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
AGF 3	+	+	+	-	-		-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
AGF 4	-	-	-	+	+	-		-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BF 1	+	+	+	-	-	+	-		+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
BF 2	+	+	+	-	-	+	-	+		+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
BF 3	+	+	+	-	-	+	-	+	+		-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
DOBR 1	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DOBR 2	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DOBR 3	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+		+	+	-	-	-	-	-	-	-
DOBR 4	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-
FBR 1	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+		-	-	-	-	-	-	-
FBR 2	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-		+	+	-	-	+	+
FBR 3	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-		-	-	-	-	-
FBR 4	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-		-	-	-	-
IHB 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+	-	-
IHB 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		-	-
IHB 3	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-		+
IHB 4	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezető konzulensemnek Dr. Radócz Lászlónak, hogy lehetővé tette a kutatásaim és vizsgálataim kivitelezését, és számos észrevétellel javaslattal segítette doktori dolgozatom elkészültét.

Személy szerint köszönöm Dr. Irinyi László munkatársamnak és barátomnak, Dr. Sándor Erzsébetnek és Dr. Tarcali Gábornak a hasznos észrevételeiket a kutatásommal kapcsolatban.

Köszönöm a Növényvédelmi Intézet minden dolgozójának a nekem nyújtott segítségét.

Végezetül köszönöm családomnak, a szüleimnek a feleségemnek valamint a barátaimnak a nekem nyújtott segítséget, hogy elkészítsem a dolgozatot.

13. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/214/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Görcsös Gábor

Neptun kód: ABA8KF

Doktori Iskola: Hankóczy Jenő Növénytermesztési, Kertészeti és Élelmiszertudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) hazai folyóiratban (1)

1. **Görcsös, G.**, Irinyi, L., Radócz, L., Tarcali, G., Sándor, E.: Diversity of *Cryphonectria parasitica* populations from the Carpathian Basin.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 62 (3), 247-266, 2015. ISSN: 1217-8950.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.62.2015.3.3>
IF:0.778 (2014)

Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) külföldi folyóiratban (1)

2. Radócz, L., Irinyi, L., **Görcsös, G.**, Egyed, K.: Molecular studies of Hungarian *Cryphonectria parasitica* isolates.
Anal. Univ. Oradea Fac. Protect. Med. 16, 274-279, 2011. ISSN: 1224-6255.

Magyar nyelvű konferencia közlemény(ek) (6)

3. **Görcsös G.**, Irinyi L., Tarcali G., Radócz L., Sándor E.: Kárpát medencei *Cryphonectria parasitica* (MURRILL) M.E BARR izolátumok mikroszatellit vizsgálata BAPS program segítségével.
Georgicon Agric. 19 (1), 57-62, 2014. ISSN: 0239-1260.
4. Radócz L., **Görcsös G.**, Tarcali G., Kovács G., Qin L.: A *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr kórokozó gomba 75 éve Európában.
Agrártud. Kózl. 62 (különszám), 82-85, 2014. ISSN: 1587-1282.





5. **Görcsös G.**, Tarcali G., Irinyi L., Radócz L.: Genetikai markerek alkalmazása a szelídgesztenye kéregrák (*Cryphonectria parasitica*) populációinak jellemzésére.
Agrártud. Közl. 53 (különszám), 16-21, 2013. ISSN: 1587-1282.
6. **Görcsös G.**, Irinyi L., Sándor E., Tarcali G., Radócz L.: Közép európai *Cryphonectria parasitica* izolátumok mikroszatellit vizsgálata.
In: XXIII. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum : 2013. január 23-25., Keszthely. PE GK Növényvédelmi Int., Keszthely, 205-210, [2013].
7. Radócz L., Tarcali G., Irinyi L., **Görcsös G.**: Az ukrajnai *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr szubpopulációk megjelenése kocsánytalan tölgyön (*Quercus petraea*).
Agrártud. Közl. 43, 70-75, 2011. ISSN: 1587-1282.
8. Irinyi L., **Görcsös G.**, Radócz L.: Molekuláris biológiai vizsgálatok a Kárpát-medencéből származó *Cryphonectria parasitica* izolátumokon.
Agrártud. Közl. 43, 76-80, 2011. ISSN: 1587-1282.
- Idegen nyelvű konferencia közlemény(ek) (5)
9. Radócz, L., **Görcsös, G.**, Tarcali, G., Irinyi, L., Egyed, K., Krochko, V.: First detection of chestnut blight fungus on sessile oak in Ukraine.
In: Proceedings of the Fifth International Chestnut Symposium. Ed.: M. L. Double, W. L. MacDonald, ISHS, Leuven, 199-204, 2014. ISBN: 9789462610064
10. Radócz, L., Egyed, K., Qin, L., Bürgés, G., Tarcali, G., **Görcsös, G.**: Curative treatment with hypovirulent strains of chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) fungus.
In: Proceedings of the IInd European Congress on Chestnut [elektronikus dokumentum] : Debrecen, Hungary, Baia Mare, Romania, Modry Kamen, Slovakia, October 9-12, 2013. Ed.: L. Radócz, M. Botu, M. Bolvansky, ISHS, Leuven, Belgium, 5-6, [2014]. ISBN: 9789462610323
11. **Görcsös, G.**, Tarcali, G., Irinyi, L., Radócz, L.: New data of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr sub-populations in the Carpathian-Basin.
In: Proceedings of the IInd European Congress on Chestnut [elektronikus dokumentum] : Debrecen, Hungary, Baia Mare, Romania, Modry Kamen, Slovakia, October 9-12, 2013. Ed.: L. Radócz, M. Botu, M. Bolvansky, ISHS, Leuven, Belgium, 7-8, [2014]. ISBN: 9789462610323



12. **Görcsös, G.**, Tarcali, G., Irinyi, L., Radócz, L.: Molecular biology characterization of *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR isolates from different Carpathian-Basin plots. *J. Agric. Sci. 50 Suppl.*, 84-91, 2012. ISSN: 1588-8363.
13. **Görcsös, G.**, Irinyi, L., Tarcali, G., Radócz, L.: Molecular studies on *Cryphonectria parasitica* isolates from different Central-European plots.
In: International Symposium on Current Trends in Plant Protection. Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, 242-250, 2012. ISBN: 9788691095116

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 0,778

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 0,778

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, 2015.10.12.



14. NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

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

Debrecen, 20.....

.....

a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy doktorjelölt 20.....-20..... 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, 20.....

.....

a témavezető aláírása