

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Görcsös Gábor

Témavezető: Dr. Radócz László



DEBRECENI EGYETEM

Hankóczy Jenő Növénytermesztési, Kertészeti és  
Élelmiszertudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2015.

## 1. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

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 kéregrákosodás jelenleg is intenzíven terjed, s ma már az európai szelídgesztenyénél is a legjelentősebb betegségnek számít (ANAGNOSTAKIS, 1987).

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

A kórokozó, bár obligát sebz paraziták, 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, 1913).

A mechanikai hatásokra, valamint a természetes úton kialakuló sebzésekre, illetve kéregrepedésekre bekerülő aszkospóra vagy konídium ideális környezeti feltételek mellett kicsírázik, és megtörténik az elsődleges infekció. Számos kutatást végeztek annak a kiderítésére, hogy az egyébként rezisztens ázsiai fajok csemetéi miért fogékonyak kb. 2-3 éves korukig a *Cryphonectria parasitica* fertőzésére, valamint, arra hogy az idősebb fák fiatal kéreggel rendelkező részei is sokkal fogékonyabbak (UCHIDA, 1977).

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 számára (RADÓCZ, 1995).

A betegség elhatalmasodásával a megtámadott kéregrész 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 (RADÓCZ, 1994).

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, azt 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 gesztenyefajok esetében volt megfigyelhető (BIRAGHI, 1950).

A hipovirulens törzsekre jellemző volt a gyenge sporuláló képesség. Az ilyen törzsek megbetegítő képességükben is jelentős eltérést mutattak az addig ismert virulens törzsektől. További vizsgálatok során fény derült arra is, hogy a hipovirulencia előidézője a gombasejtek citoplazmájában megtalálható, és az könnyen átadódhat két egymással vegetatív 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 (dsRNA) citoplazmatikus jelenlétét a két francia eredetű hipovirulens törzs esetében. Az első, az egyszerűsített módon történő dsRNA izolálását a mikovírussal fertőzött *Cryphonectria parasitica* tenyészetből MORRIS és DODDS végezte el, 1979-ben.

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

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 valószínűséggel. (PENNISI et al., 1992; GRANATA et al., 1992).

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 létezését igazolták (ANAGNOSTAKIS, 1983; ANAGNOSTAKIS, 1998; HOGAN és GRIFFIN, 2002).

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 (CORTESE et al., 1998).

A magyarországi szelídgesztenye állományok felmérésekor megállapították, hogy az egyes termőhelyeken azonos VC csoportokba tartozó kórokozó törzsek vannak jelen. Ennek oka 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 (RADÓCZ, 1995).

A vegetatív kompatibilitási tesztek elvégzése mellett a szelídgesztenye kéregrák populációk genetikai jellemzésére 3 filogenetikai markert is felhasználtunk. A *tef1* gén filogenetikai kutatásokhoz való felhasználását az teszi lehetővé, hogy az EF-1 $\alpha$  fehérje, és így a fehérjét kódoló gén is erősen konzervatív az élővilágban. Ebből következik, hogy jellemzően fajok közötti filogenetikai kapcsolatokat felkutatására alkalmazzák, felhasználhatósága korlátozott a fajon belüli kapcsolatok jellemzésére (CHO et al., 1995; MOREIRA et al., 1999).

A nagy variabilitású, nem kódoló ITS génszakasz felhasználása általánosan elterjedt a taxonok közötti rokonsági viszonyok feltárásához. Segítségével az osztály, család, nemzetség, faj kapcsolatok modellezése nagy biztonsággal elvégezhető, ezért ezen 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. 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. (HILLIS és DIXON, 1991; MONCALVO et al., 1995; NICHOLSON, 1995; PINE et al., 1999;).

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 felhasználhatóak nagy felbontású genetikai térképek elkészítésére. A mikroszatellitek filogenetikai és populációgenetikai vizsgálatokban való elterjedt és széleskörű alkalmazhatóságát az teszi lehetővé, hogy nagyon könnyen amplifikálhatóak, nincsenek állandó szelekciós nyomás alatt, valamint, hogy nagy számban fellelhetőek a genomban. Fontos kiemelni azt, hogy a mikroszatellitek általánosan elterjedtek mind a prokarióta, mind az eukarióta genomban, tehát mint univerzális markerek, széles körben felhasználhatóak (HEARNE et al., 1992; PARKER et al., 1998 ZANE et al., 2002).

### **Részletes kutatási célkitűzések**

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. A KUTATÁS MÓDSZEREI

### 2.1 A mintagyűjtés részletei

Kutatásunk első lépéseként a vizsgálati területek kerültek kiválasztásra. A vizsgálatokba bevont szelídgesztenye termőterületek kiválasztásakor szem előtt tartottuk azt, hogy azok minél jobban reprezentálják a Kárpát-medence különböző *Cryphonectria parasitica* szubpopulációit. Mivel a *Cryphonectria parasitica* az EPPO besorolása szerint zárlati károsító, amely az EPPO országainak területén, így Magyarországon is megtalálható, behozatala engedélyköteles. Ennek értelmében a környező országokból behozott mintákra engedélyt kellett kérni, és a vizsgálatok számára helyet adó laborokat és eszközöket ellenőrzésnek kellett alávetni.

A területeket a mintagyűjtés alkalmával pontosan felmértük egy kézi GPS készülék segítségével, és külön rögzítettük a GPS koordinátáit azoknak a fáknek, amelyekről kéregmintát vettünk. Munkánk során 95 darab *Cryphonectria 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.

### 2.2 A minták laboratóriumi előkészítése

A laboratóriumi vizsgálatok a táptalaj elkészítésével kezdődtek. A mintákat PDA (Potato Dextrose Agar) táptalajon növesztettük. A kéregmintákat az előkészítés során 2-3 percig 70 %-os etanolban fertőtlenítettük, majd desztillált vízben lemostuk a mintákról. Az előre megcímkézett Petri csészékben kiöntött táptalajra a kéregmintákból kis darabkákat helyeztünk, és ezt követően a mintákat termosztátba kerültek, ahol egy hétig állandó 27 °C -os hőmérsékleten növesztettük. Minden nap ellenőriztük a fertőzött kéregmintákat, majd miután megjelent a *Cryphonectria parasitica* a táptalajon, újra áttoltottuk azokat és a termosztátban neveltük őket. 10 nap elteltével a gomba teljesen benőtte a Petri csészéket és alkalmassá vált a folyékony táptalajra való áttoltásra.

A VCG vizsgálatok során a PDA táptalajhoz 50 mg/l brómkrezol zöld indikátort is hozzáadtuk. 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. A táptalaj azonban az elhalt hifák esetében nem produkálja a színváltozást (POWELL, 1995).

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 táptalaj került. 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 rázattuk 125 rpm sebességen.

### **2.3 A VCG vizsgálatok kivitelezése**

A kutatásba bevont minták molekuláris biológiai vizsgálatait megelőzően elvégeztük a VC csoportokba való besorolást. A tesztvizsgálatok során POWELL 1995-ben közölt receptúráját használtuk fel: 500 ml desztillált vízhez először hozzáadtunk 20 g előre kevert PDA (Potato- Dextroz Agar) komponenst, majd kiegészítésként 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 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 perc sterilizálási idő alatt. A steril táptalajt ezután Petri-csészékbe töltöttük ki, ezekre 10x10 mm nagyságú gomba micélium szöveteket tartalmazó tápkockákat helyeztünk el. Egyszerre egy Petri-csészében 4 pár tesztet lehetett elvégezni. A mintákat Heratherm IMH 180 S típusú fűthető- hűthető mikrobiológiai inkubátorba helyeztük. Az izolátumokat 25 °C növesztettük, majd a párosítást követő második héten megtörtént a tesztek kiértékelése. A tesztek elvégzéséhez szükséges (EU 1-31) tesztterüzeteket a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Intézet valamint a Nyitrai Erdészeti- és Ökológiai Intézet bocsátotta rendelkezésünkre. A vizsgálatok első lépéseként elvégeztük a különböző mintagyűjtési helyek populációin belüli kompatibilitási teszteket. 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 prezentáltuk. A kapott eredményeket ezt követően összevetettük a korábbi vizsgálatok eredményeivel, és összegeztük az esetlegesen bekövetkezett változásokat.

## 2.4 Polimeráz-láncreakció alapuló vizsgálat előkészítése

A PCR-t 50 µl térfogatban végeztük 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).

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.

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. 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 térítéses 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.

## 2.5 A mikroszatellitek amplifikációjának részletei

Munkánk során 6 különböző mikroszatellitot választottunk ki és vontunk be a vizsgálatokba, melyeket előzőleg BREUILLIN et al., (2006) és KUBISIAK et al., (2007) írtak le. 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. Az alábbi PCR ciklust alkalmaztuk 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 lokuszoktól függően 53-56 °C között változott. A többi beállítás az első 5 ciklusával megegyezett. A záró polimerizáció 72 °C-on történt 15 percig. 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 használtunk, 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.

## **2.6 A filogenetikai elemzésekhez felhasznált programok**

A filogenetikai elemzések első lépéseként a DNS szekvenciákat ClustalX program segítségével illesztettük össze. A program elsődlegesen egy többszörös szekvencia rendező feladattal ellátott alkalmazás, mely nagyszámú nukleotid- illetve fehérjeszekvenciákkal egyaránt képes dolgozni. A program több szekvencia hasonlóságát, homológiáját azonosítja és elemzi, ezáltal felismerhetővé válik a szekvenciák közötti evolúciós kapcsolat, eltérés illetve egyezés. Miután a ClustalX program segítségével a szekvenciák illesztése megtörtént, szükség volt egy manuális finomításra. A Genedoc program szintén egy többszörös szekvencia illesztő és szerkesztő program, amely lehetővé teszi a kézi finomhangolást. A szekvencia illesztést 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 fel, amely filogenetikai törzsfák rajzolására és szerkesztésére egyaránt alkalmas. 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 vizsgálataink során kiválasztott Maximum Parsimony és Maximum Likelihood analízis elvégzésére is alkalmas.

## 2.7 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 vizsgáltuk 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  $\theta$  ( $F_{st}$ ) értéket (WEIR és COCKERHAM, 1984) a Multilocus 1.3b program segítségével. A program a  $\theta$  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  $\theta$  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).

### 3. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

#### 3.1 A VCG vizsgálatok eredményei

Vizsgálataink során mindösszesen 168 különböző mintán végeztük el a vegetatív kompatibilitási teszteket. Legnagyobb számban Magyarországról és Szlovákiából származó mintákat vontunk be a vizsgálatba. A vonatkozó szakirodalmat áttekintve ebben a két termőközvetben lehetett számítani a legnagyobb diverzitásra a vegetatív kompatibilitási csoportok között. Vizsgálataink során Magyarország 13 különböző szelídgesztenye termőterületéről, összesen 44 mintán végeztük el a vegetatív kompatibilitási vizsgálatokat. Külön csoportban kezeltük a soproni, zalai, baranyai, Dunakanyar menti, valamint az észak-magyarországi termőközvetet. Fontos kiemelni, hogy a pálházai illetve érsekvadkert szubpopulációk esetében először került sor a VC tesztek elvégzésére. Ezekről a helyekről korábbi szakirodalmak tekintetében nem ismertek eredmények. A soproni termőközvetben az EU-12 illetve EU-13 VC csoportokat sikerült kimutatni. A zalai termőközvetben az EU-12, EU-13 illetve EU-16 VC csoportok mutattak pozitív eredményt. A baranyai termőközvet teljes hasonlóságot mutatott a zalai termőközvettel a VC csoportok tekintetében. A Dunakanyarból illetve az észak-magyarországi pálházai minták az EU-12 tesztetörzsszel mutattak vegetatív kompatibilitást. Magyarország valamennyi termőközvetének 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.

A szlovákiai mintagyűjtéseink során 9 mintaterületről mindösszesen 39 mintát izoláltunk, majd elvégeztük rajtuk a vegetatív kompatibilitási teszteket. 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 pozsonyi termőközvetben jellemzően az EU-2, EU-12 illetve EU-13 VC csoportokat sikerült kimutatni. A nyitrai termőközvetben szintén az EU-2, és EU-12 valamint az EU-16 VC csoportok mutattak pozitív eredményt. Ez a két régió mutatta a legtöbb különböző VC csoportot. A kékkői termőközvetben 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. 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.

Terepi mintavételünk alkalmával Ukrajnából 3 különböző termőkörzetből, Serednje (Szerednye) mellől, Bobovyshe (Borhalom) település határából és Rostov'yatisya mellett található erdőből sikerült kéregrák mintákat izolálni. A korábban elvégzett VCG tesztek alkalmával csak az EU-12-es kompatibilitási csoport jelenlétét lehetett kimutatni. A Serednje mellett található 4 mintaterületen sikerült kimutatni az EU-12 és az EU-13 tesztörzs jelenlétét. Úgyszintén megtalálható volt, a fent említett két VC törzs a Bobovyshe (Borhalom) település határából és Rostov'yatisya mellett található erdőből származó mintákban is.

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 termőkörzetéből 21 izolátumot gyűjtöttünk, majd elvégeztük rajtuk a vegetatív kompatibilitási teszteket. A nagybányai régióban, a Veresvíz, Felsőtótfa és Kőbánya termőkörzetben dominál az EU-12 vegetatív kompatibilitási csoport. A Nagybánya mellett található Tăuții-Măgherauș (Miszmogyorós) termőkörzetben 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.

Sikeres kapcsolatfelvétel után Dr. Kiril Sotirovski professzor úr segítségével gyűjtöttünk mintákat 2011.október 4-5-én Macedónia fontosabb szelídgesztenye termőrégióiban. A gyűjtést, a főváros 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. A különböző felmérések alapján a macedóniai populációk a legnagyobb mértékben az EU-12 tesztörzsszel mutattak kompatibilitást (98%), továbbá kimutatták az EU-1, EU-2, EU-10 valamint az EU-22 vegetatív kompatibilitási csoportok minimális jelenlétét. A vizsgálatból egyértelműen kiderül, hogy minden minta az EU-12 tesztörzsszel mutatott kompatibilitást.

A Görögországból származó mintákat Dr. Charikleia Perlerou professzor asszony bocsájtotta rendelkezésünkre. Az ország különböző szelídgesztenye termőterületeiről származó minták jól reprezentálják a VC csoportok diverzitását. Ezeket a mintákat egészítettük ki az Intézet gyűjteményében megtalálható P5-1, P5-2, ME48-1 és ME 48-2 mintákkal. A eredmények alapján egyértelműen kiderül, hogy minden minta az EU-12 tesztetörzsszel mutatott kompatibilitást.

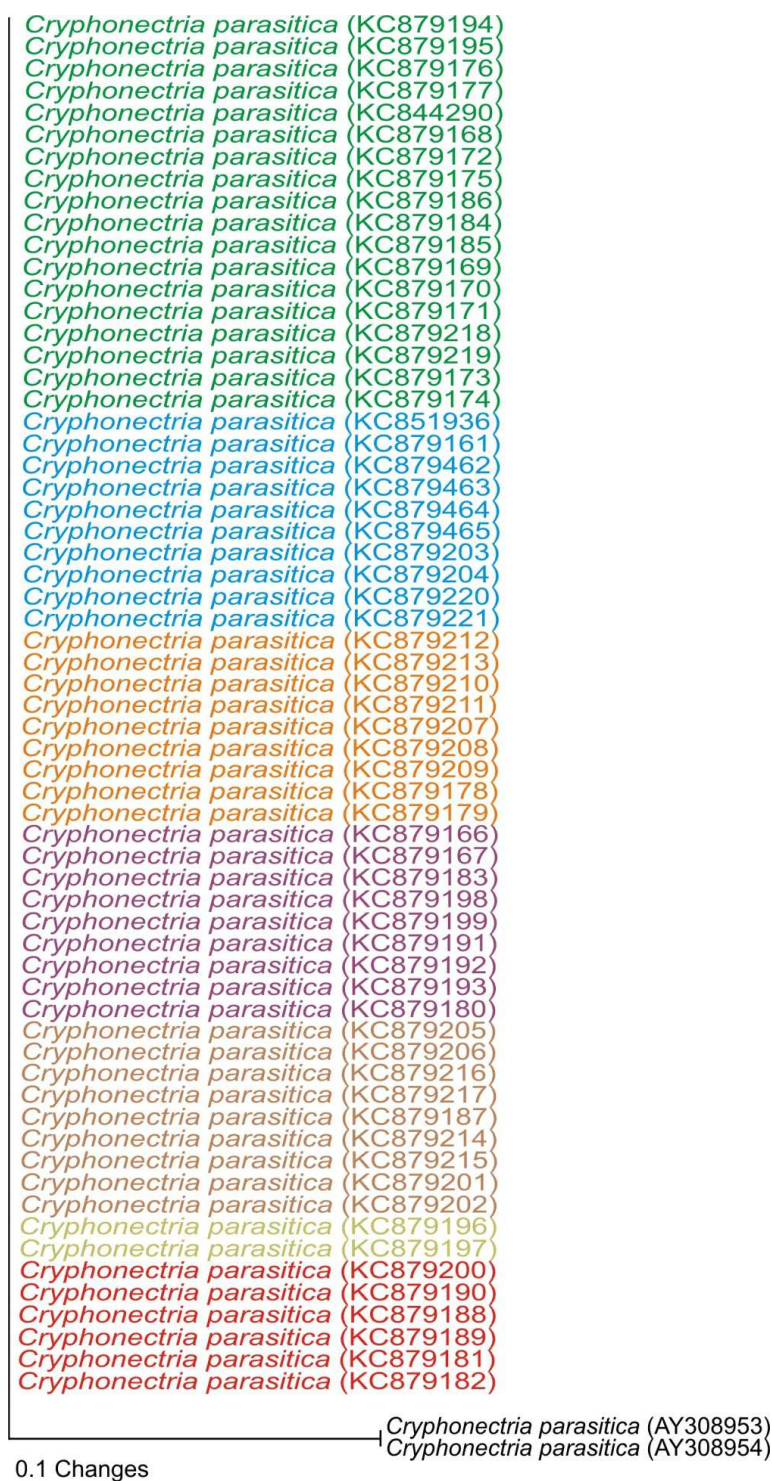
Macedóniai mintagyűjtésünk alkalmával Dr. Kiril Sotirovski professzor úr segítségével lehetővé vált, hogy Bulgáriában is folytassuk terepi munkánkat. Az ország délnyugati szegletében a görög- bulgár-macedón hármashatár közelében található Petrich szelídgesztenye állományából sikeresen mintákat gyűjtöttünk. 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 szakirodalmi adatokban közölt vegetatív kompatibilitási tesztek 80%-ban az EU-12 törzsszel mutattak pozitív eredményeket, valamint igazolták, bár nagyságrendekkel kisebb mértékben az EU-2, és EU-10 kompatibilitási csoportok jelenlétét is. A vizsgálatból egyértelműen kiderül, hogy mind az 5 minta az EU-12 tesztetörzsszel mutatott kompatibilitást.

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 délnyugati portugáliai Alentejo, egy minta az északi portugáliai Trás os Montes, és egy minta Madeira szigetről származik. Kérésünkre úgy válogatta össze a mintákat, hogy azok minél jobban reprezentálják a portugáliai *Cryphonectria parasitica* populációkat. 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. A szakirodalmi publikációkban közölt vegetatív kompatibilitási tesztek 80,2 %-ban az EU-11 törzs dominanciája volt tapasztalható, majd a 7,1%-a az EU-12 tesztetörzsszel mutatott kompatibilitást. 6,6%-ban az EU-66 jelenléte volt kimutatható, valamint detektálták az EU-1, EU-2, EU-28, EU-33, P-7 és P-9 csoport jelenlétét. Az általunk elvégzett vizsgálatok, valamint a szakirodalom által kapott eredmények összevetése után megállapítható, hogy Portugália szelídgesztenye kéreggrák populációinak nagy a diverzitása, 9 különböző VC csoport jelenléte bizonyított, és ezek struktúrája különbözik a Kárpát-medencében megtalálhatóaktól.

### 3.2 A *tef1* fragmentumok elemzése által kapott eredmények

A vizsgálatokban szereplő 95 izolátumból összesen 63 minta esetében sikerült felszaporítani, majd megszekvenálni a *tef1* szakaszokat. 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. Az összehasonlító vizsgálatok során szintén nagyon kevés *tef1* 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/>).

A Parsimony 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 *Cryphonectria parasitica* izolátumok *tef1* 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 (1. ábra) 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 *tef1* szekvenciái gyakorlatilag megegyezők. Ezzel szemben a GeneBank adatbázisból feltöltött, (a törzsfán fekete színnel feltüntetett) az USA-ból származó minták egy különálló csoportba rendeződtek. A szakirodalmi feldolgozás során már említés volt arra, hogy a *tef1* fragmentum általánosan elterjedt és használt marker fonalas gombáknál a populációgenetikai, illetve a filogenetikai vizsgálatokban. Kutatásunk során azonban bebizonyosodott, hogy nem alkalmas a *Cryphonectria 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 *tef1* szekvencia állományt sikeresen kiegészítettük 63 *Cryphonectria parasitica* szekvenciával.



**1. 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)

### 3.3 A ITS fragmentumok elemzése által kapott eredmények

A vizsgálatainkban felhasznált *Cryphonectria 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. Az összehasonlító vizsgálatok során számos *Cryphonectria 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/>).

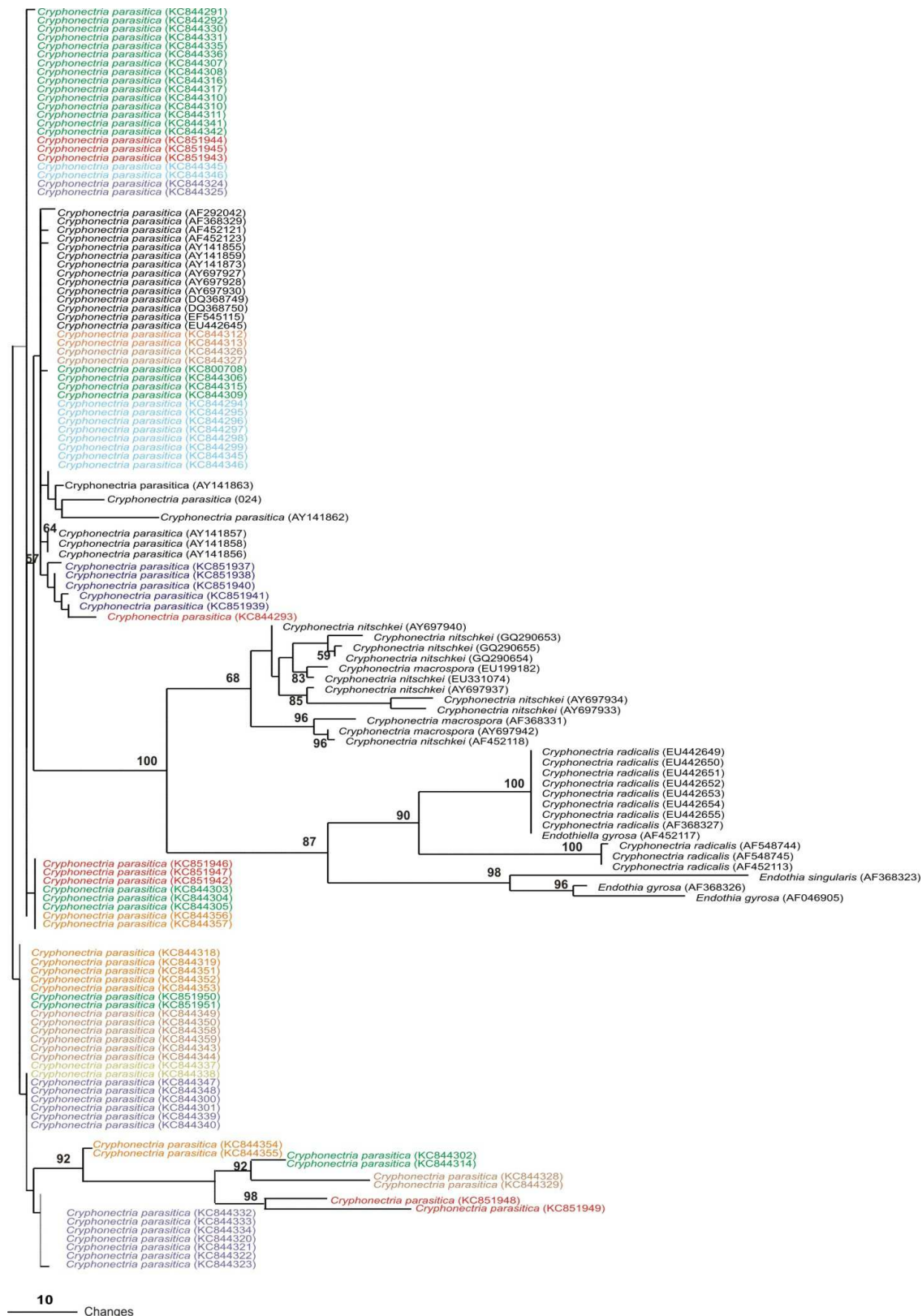
A sikeresen felszaporított és megszekvenált izolátumokat deponáltuk az általunk is használt adatbankba (GeneBank). Az adatbank a beküldött adatok feldolgozása után azonosító kóddal jelölte az izolátumokat. Az adatbankból letöltött szekvenciákat a törzsfakészítés során beépítettük a vizsgálatba, ezzel is kiszélesítve a fajon belüli és fajok közötti kapcsolatokat. Az adatbankból 45 mintát töltöttünk le. 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. A *Cryphonectria macrospora* faj esetében 3 izolátum került be a vizsgálatainkba, 1 Oroszország területéről, 2 minta Japánból, 509-591 bázispár fragment mérettel. A *Cryphonectria naterciae* faj 7 izolátummal szerepelt a kutatásban 531-532 bázispár fragmenthosszal, a származási hely minden esetben Portugália volt. A *Cryphonectria radicalis* esetében 3 izolátumot vizsgáltunk (1 Olaszországból és 2 Svájc-ból) 535-544 bázispár fragmenthosszal. Az *Endothiella gryosa* faj esetében 1 portugál izolátum állt rendelkezésünkre 535 bázispár fragmenthosszal. Szintén 1 izolátumot használtunk fel a *Endothia singularis* faj esetében, mely az USA-ból származik és 749 bázispár fragmenthosszúság jellemzi. Az *Endothia gyrosa* esetében két izolátumot vettünk górcső alá, ezek származási helye az USA volt, a fragmenthossz 450-475 bázispár között váltakozott.

Az ITS fragmentumok Parsimony elemzése alapján megrajzolt filogenetikai törzsfa a 2. 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 *Cryphonectria parasitica* izolátumok elkülönítésére.

Az eredményekből rajzolt törzsfán (2.ábra) jól elkülöníthető csoportok rajzolódtak ki. A csoportok kialakulása jellemzően a különböző fajok elkülönülése mentén alakult ki. A *Cryphonectria 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 *Cryphonectria 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. Ezen 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 *Cryphonectria parasitica* faj esetében nem tűnik alkalmasnak, de összevetve a *tefl* fragment esetében kapott eredményekkel, lényegesen jobb.



**1. 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

### 3.4 A mikroszatellit vizsgálatok eredményei

A mikroszatellitekkel elvégzett populációgenetikai vizsgálatok során a minél pontosabb eredmények eléréséhez, valamint a különböző földrajzi helyekről származó populációk minél részletesebb jellemzésének érdekében a teljes populációt a földrajzi elhelyezkedésük alapján további csoportokra osztottuk fel. Az 1.- 4. csoportokba a Kárpát-medencéből (magyar, szlovák, ukrán és román) származó minták kerültek, az 5. csoportba a Macedóniából és Bulgáriából gyűjtött minták kerültek, a 6. csoportba a görög minták, illetve a 7. csoportba a portugál minták kerültek.

A vizsgálatok során felhasznált hat különböző mikroszatellit fragment nagyságának különbözősége alapján a 95 vizsgált izolátum 71 különböző genotípusba különült el. Az allélszám ( $n_a$ ) az 1.-5. csoportok tekintetében 2,66-4,00 között változott, míg a 6. és 7. csoportok esetében ez az érték 1,50-2,00 között alakult.

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. csoportok esetében igen magas értékeket kaptunk (0,44-0,61). A kutatásaik során elvégzett VC tesztek eredményei alapján, melyeket már a korábbi fejezetben ismertettem, is jól látható volt, 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. A portugál és görög minták esetében az alacsony genetikai diverzitás a populációk zárt jellegével magyarázható (pl. Azori szigetek, Madeira ).

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 megtalálhatóak 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. Ezen mintáknál feltételezhető a legkisebb genetikai különbség a vizsgálat alapján.

A populációk allélfrekvenciáinak összehasonlítása alapján, F-statisztika segítségével kiszámítottuk a Weir & Cockerham's féle fixációs index ( $\theta$ ) értékeit. Az F-statisztika az egymásból levezethető indexek segítségével adja meg a populációk genetikai varianciáját. 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. A nagyobb egyedszámból álló 1.-5. populációk esetében ez az eltérés gyakran szignifikánsnak mutatkozott.

A génáramlás a különböző populációkban bekövetkező változások, mint például a migráció hatására bekövetkező genetikai változás a populációban. 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 ( $\theta$ ) esetében itt is külön ki kell emelni a 7. populációt, a portugál minták esetében egy nagyságrenddel alacsonyabb a génáramlás értéke. Ilyen alacsony mértékű génáramlás esetén rendszerint a genetikai differenciáltság nagyon magas, a többi vizsgált populációhoz képest nagy a genetikai különbség. A hét vizsgált populáció közül az 1. és 2. populáció esetében volt a legmagasabb a génáramlás mértéke, itt ( $N_m: 0,156-0,353$ ) között alakult. Ezen értékek arra engednek következtetni, hogy a jelzett populációk esetében a genetikai differenciáltság alacsony, a többi vizsgált populációhoz képest a genetikai különbség alacsony.

A begyűjtött különböző szubpopulációk genetikai mintázatának összehasonlítására meghatároztuk a Nei-féle genetikai azonosság ( $I$ ) illetve a genetikai távolság ( $D$ ) értékeit. Minél közelebb van  $I$  értéke 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 eltérőek a két populációban. 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 ezen populációk esetében feltételezhető a részleges genetikai azonosság.

A vizsgált populációk közötti genetikai távolságot ( $D$ ) az egyes populációkban tapasztalt allélgyakorisági értékek alapján kell kiszámítani. Ezen 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. 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. A kapott 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 támasztja alá a genetikai azonosságnál tapasztaltak is. Az 1. 2. 3. 4. illetve 5. populáció esetében a Nei-féle genetikai távolság alacsony értékeket mutatott ezért ezen populációk esetében az allélgyakoriságok azonosnak mondhatók.

A mikroszatellit eredményekből kalkulált Nei-féle genetikai távolság alapján az UPGMA módszer segítségével törzsfát készítettünk. A megrajzott törzsfa nem mutat egyértelmű összefüggést a minták begyűjtési helyeinek földrajzi elhelyezkedése és a közöttük lévő genetikai távolság között. A kutatási témánk gerincét képező a Kárpát-medencéből származó minták több csoportba (clade) különültek el. Ezzel szemben jól megfigyelhető volt a 7. populáció (portugál minták) éles elkülönülése a többi földrajzi csoporttól.

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 BAPS analízis a 29 különböző helyről begyűjtött mintát összesen 16 különböző csoportba különítette el. A 16 csoport elkülönülésének valószínűsége igen magas (0,9131) volt. Egyes távolabbi földrajzi helyekről származó csoportok (pl. Portugália, Görögország) egyértelműen elkülönültek. Az eredmények alapján a Kárpát-medence esetében több csoportra oszlott a *Cryphonectria 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.

#### 4. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ ÉS ÚJSZERŰ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

1. A Kárpát-medencei szelídgesztenye termőterületekről származó *Cryphonectria parasitica* izolátumok vegetatív kompatibilitási vizsgálatai során a Sereďnje mellett található 4 mintaterületen sikerült kimutatni az EU-12 és az EU-13 törzs jelenlétét. Úgyszintén megtalálható volt a fent említett két VC csoport a Bobovyshche (Borhalom) település határából és 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-Măgheraș (Mizmogyorós) termőkörszékben az EU-12 törzs mellett, szintén sikerült kimutatni az EU-13 vegetatív kompatibilitási csoport jelenlétét is.
2. A vizsgálatba vont szelídgesztenye kéregrák minták *tefl* szekvenciáit felhasználva megkíséreltük meghatározni a különböző termőrégiók populációinak genetikai távolságát. A kapott eredményekből készített filogenetikai törzsfá elemzése egyértelműen bebizonyította, hogy a *tefl* genetikai marker nem alkalmas a szelídgesztenye kéregrák *Cryphonectria parasitica* növénypatogén gombafaj különböző földrajzi elhelyezkedésű populációinak egymáshoz viszonyított genetikai differenciáltságának pontos meghatározására, a populációk elkülönítésére. Az általunk is használt molekuláris génbank (GenBank) adatbázisába sikeresen feltöltöttük 63 *Cryphonectria parasitica* izolátum *tefl* szekvenciáját.
3. A *tefl* genetikai markerhez hasonlóan az ITS szekvenciákkal is elvégeztük az összehasonlító vizsgálatokat. A molekuláris génbank (GenBank) adatbázisából letöltött *Cryphonectria 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 *Cryphonectria 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 feltöltöttük 85 *Cryphonectria parasitica* izolátum ITS szekvenciáját.

4. Elsők között használtuk fel a *Cryphonectria parasitica* gombafaj genomjából 6 mikroszatellit, hogy meghatározzuk a különböző termőrégiók populációinak genetikai távolságát. A *tefl* és 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 *Cryphonectria parasitica* fajon belüli populációinak genetikai alapú elkülönítésére.
5. Elsőként sikerült kimutatni a szelídgesztenye kéregrák *Cryphonectria parasitica* kórokozó kártételét kocsánytalan tölgy gazdanövényen az ukrajnai 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 *Cryphonectria parasitica* kórokozóval mutatott 100%-os homológiát.

## 5. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

1. A vegetatív kompatibilitási vizsgálatok során az ukrainai Serednje, Bobovyshe (Borhalom) és Rostov'yatisya mellett gyűjtött minták, valamint a romániai Nagybánya mellett található Tăuții-Măgherauș (Miszmogyoros) termőközetből 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 törzsfa 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.

## 6. A TÉZISFÜZET HIVATKOZÁSAI

- AGAPOW, P. M., BURT, A. (2001): Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol Ecol Notes* 1:101–2.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. (1983): Conversion to curative morphology in *Endothia parasitica* and its restriction by vegetative compatibility. *Mycologia*. 777-780 p.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. (1987): Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*. 79 p. 23-37.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. (1998): Introduction of new genotypes into ascospore progeny of *Cryphonectria parasitica* in the field. *Mycological Research*. 102(Part 6):685-686.
- ANAGNOSTAKIS, S. L., WAGGONER, P. E. (1981): Hypovirulence, vegetative incompatibility and the growth of cankers of chestnut blight. *Phytopathology*. 1198-1202 p.
- BIRAGHI, A. (1950): Caratteri di resistenza in *Castanea sativa* nei confronti di *Endothia parasitica*. *Boll. Stn. Patol. Veg. Rome*. 161-171 p.
- 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.
- 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.
- CORANDER, J., WALDMANN, P., SILLANPÄÄ, M. J. (2003): Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163: 367–374.
- CORTESI, P., RIGLING, D., HEINIGER, U. (1998): Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of *Cryphonectria parasitica* *Eur. J. For. Pathol.*, 167-176 p.
- 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.* 6B (2): 100-112.
- 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.
- 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 (1):3-10.
- GRENTÉ, J., SAURET, S. (1969): Le hypovirulence exclusive, est-elle contrôlée par des déterminants cytoplasmiques. *C.R. Seances Acad. Sci Fr.* 3173-3176 p.
- HEARNE, C. M., GHOSH, S., TODD, J. A. (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, 8. 228-294.
- HILLIS, D. M., DIXON, M. T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- HOGAN, E. P., GRIFFIN, G. J. (2002): Incomplete movement of *Cryphonectria hypovirus* I within a vegetative compatibility type of *Cryphonectria parasitica* in natural cankers on grafted American chestnut trees. *Eur. J. For. Pathol.* 32. 331-344 p.
- KIMURA, M., CROW, J. F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.

- 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.
- LEVENE, H. (1949): On a matching problem arising in genetics. Ann. Math. Stat. 20: 91-94.
- MCDERMOTT, J. M., McDONALD, B. A. (1993): Gene flow in plant pathosystems. Annu Rev Phytopathol 31:353–73.
- MERKEL, H. W. (1906): A deadly fungus on the American chestnut. N.Y. Zool. Soc. Am. Rep. 10. p. 204-210.
- MOFFITT, E. M., LISTER, R. M. (1975): Application of serological screening test for detecting double-stranded RNA mycoviruses. Phytopathology. 851-859 p.
- 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.
- MOREIRA, D., LE GUYADER, H., PHILIPPE, H. (1999): Unusually high evolutionary rate of the elongation factor-1  $\alpha$ -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 77, 1026-1033.
- 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. U.S.A. 70. 3321-3323.
- NEI, M. (1987): Molecular Evolutionary Genetics, New York: Columbia University Press, pp 187-192.
- 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. pp. 109.
- 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.
- 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.
- 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.
- RADÓCZ, L. (1994): A szelídgesztenyekór. Élet és Tudomány. 42 p. 1321-1323.
- RADÓCZ, L. (1995): 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.
- 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.
- SHEAR, C. L., STEVEN, N. E. (1913): Cultural characters of the chestnut blight fungus and its near relatives. U.S. Dept. Agr. Bull. 131 p. 3-18.

- Swofford, D. L. (2002): PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 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)
- 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. Issue 4 p. 65.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358–70.
- 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.
- 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.

## 7. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK



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. Közl.* 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 ukrainai *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.

Időgen 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 II<sup>nd</sup> 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 II<sup>nd</sup> 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. **Göröcsös, 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. **Göröcsös, 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 alapjául 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.

