

**Tülevelű fákban élő, európai elterjedésű *Bursaphelenchus*-
fonálféregfajok kimutatása és azonosítása Magyarországon**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Tóth Ágnes

Gödöllő

2013

A doktori iskola

megnevezése: **Növénytudományi Doktori Iskola**
tudományága: **Növénytermesztési és kertészeti tudományok**
vezetője: **Dr. Helyes Lajos**
egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezető: **Dr. Kiss József**
egyetemi tanár, intézetigazgató, PhD
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A fenyőrontó fonálféreg, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner és Buhner, 1934) Nickle, 1970 a túlevelű növények hirtelen fenyőhervadás betegségének okozója (Kiyohara és Tokushige 1971), azonban képes fennmaradni élő fákbán is. A *B. xylophilus* életmódja sajátos, életciklusa és terjedése szoros összefüggésben van rovarokkal, elsősorban a *Monochamus*-fajokkal (COLEOPTERA: Cerambycidae), amelyek a fenyőrontó fonálféreg terjesztő vektorai túlevelű tápnövényeken.

Világszerte a *B. xylophilus* tekinthető az egyik legjelentősebb károsítónak az erdei ökoszisztémákban. Magyarország területén jelenleg nem fordul elő.

A súlyos környezeti és gazdasági következményeket előidéző kártevőt és néhány terjesztő vektor rovarát az EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization, Európai és Földközi-tenger Melléki Növényvédelmi Szervezet) 1985-ben, mint nagyon magas kockázatú károsítót sorolta zárlati listájára. A fenti regionális növény-egészségügyi szervezet besorolása szerint az EPPO-régióban előfordul, de nem terjedt el széles körben, és felderítését a nemzeti növényegészségügyi hatóságok végzik. Az EPPO Tanács 2010 szeptemberében a zárlati A1 listáról az A2 listára helyezte át, ugyanis a fenyőrontó fonálféreg az EPPO-régióban helyenként már jelen van. A károsító bekerülése, megtelepedése és terjedése ellen védekezési irányelv érvényes az Európai Unió (EU) teljes területén. A tagországok jogalkotásában zárlati növény-egészségügyi státuszú, így Magyarországon is annak minősül. A 7/2001. (I.17.) FVM rendelet 2. melléklete szerint a *B. xylophilus* Magyarországra behurcolása és terjedésének elősegítése tilos, ha meghatározott növényeken vagy növényi termékeken előfordul.

Az Európai Bizottság kutatási keretéből támogatott DAISIE (Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe) program az Invazív idegen fajok európai jegyzékét ismerteti. Az adatbázis a fenyőrontó fonálférget a biodiverzitásra, a gazdaságra és egészségügyre legrosszabb hatású, azaz „a 100 legrosszabb” (100 of the Worst) besorolású fajlistán szerepelteti, mint az európai diverzitásra potenciális veszélyt jelentő fajt (DAISIE 2012).

Az Észak-Amerikában endemikus és ott kártételt nem okozó, általánosan elterjedt fonálférget a XX. század elején import amerikai fa- és fűrészáru szállítmányokkal Japánba is behurcolták, ahol gyors elterjedésének következményeként az egyik legjelentősebb erdőkárosítóvá vált, katasztrofális pusztítást okozva az érzékeny, őshonos japán fenyőfajokon (*Pinus thunbergii*, *P. densiflora*, *P. luchuensis*) (Yano 1913; Nickle et al. 1981; Mamiya 1983). A kezeletlen, fertőzött faanyagok nemzetközi kereskedelmével a *B. xylophilus* Japánból Kelet-Ázsiába és Nyugat-Európába is eljutott és megtelepedett.

Az őshonos elterjedési területeket kivéve, világszerte e fonálféreg az egyik legfontosabb károsítója

a fenyőknek és egyéb tűlevelűeknek, mivel a fertőzött, fogékony tápnövények elpusztulnak (Kobayashi et al. 1984; Kishi 1995; Evans et al. 1996).

Az első beszámoló a *B. xylophilus* európai előfordulásáról Portugáliából, 1999-ből származik (Mota et al. 1999), majd 2008-ban Spanyolország jelentette (Anonymous 2008), hogy a portugál határ mellett fenyőrontó fonálférget azonosítottak. A *B. xylophilus* további megtelepedése e doktori értekezés lezárásáig (2013 augusztusáig) nem ismert Európában. Azokon a területeken adott betelepülésének veszélye, ahol a tűlevelű erdőkben a vektor rovarok előfordulnak.

A fenyőrontó fonálféreg európai észlelésétől kezdve az EU teljes területén szigorú növény-egészségügyi intézkedéseket vezettek be a fonálféreg és a vektor rovarainak jelenlétének felderítésére. A lehetséges *B. xylophilus* okozta kártétel mortalitási kockázatát több mint 50%-ra becsülik Dél-Európa fenyveseiben.

Magyarországon az elmúlt közel fél évszázadban, a biotikus eredetű erdőkárokhoz hasonlóan, az abiotikus károk is növekvő trendet mutatnak (Hirka és Csóka 2010). A legtöbb erdőkár, valamint kárláncolat kialakulása leggyakrabban a nagy területű, egykorú, monokultúra jellegű állományokra jellemző. A fenyő fafajcsoporttal borított összes terület 210 600 ha, amely a teljes faállomány 11,3 %-a (KSH 2011). Magyarországon a XIX. századtól telepítettek tűlevelű növényeket, valamint az 1970-es években egy újabb fenyőtelepítési programot hajtottak végre. A fenyőállomány mára elöregedett, egészségi állapota megrendült, ökológiailag instabil (Koltay 2001), ezáltal fokozott érzékenységet mutat a fenyőrontó fonálféregfajokkal szemben is, bizonytalanná, kockázatosá téve az erdőgazdálkodás eredményességét a fenyvesekben. Nemzetgazdasági szinten is fontos, hogy a hazai fenyvesek növény-egészségügyi ellenőrzése – a folyamatosan csökkenő erdőfelület ellenére – a *B. xylophilus* és egyéb *Bursaphelenchus*-fajok, valamint a terjesztő rovarok jelenlétére is kiterjedjen. A fertőzöttségi eredmények ismerete, illetve a fonálféregfajok diagnosztikai kimutatási módszereinek adaptálása e zárlati károsító elleni eredményes védekezés végrehajtásához járulhat hozzá.

A *Bursaphelenchus*-genus azonosított fajszáma a világon eddig mintegy 110. Európában tűlevelűekből közel 40 fajt azonosítottak. A fajok morfológiailag rendkívül nagy hasonlóságot mutatnak. Emiatt faji szintű határozásuk nehéz, mégis szükséges. A számos, kártételt nem okozó faj között a *B. xylophilus* kétséget kizáró meghatározása az alapja a rendkívül költséges és az ökoszisztémára is komoly hatást gyakorló felszámolási intézkedéseknek.

A legtöbb faj fásszárú növényekben él – leggyakrabban tűlevelűben (*Coniferales*) – életmódjuk mikofág, csak néhány faj fitofág. A kimutatott fajok – a *B. xylophilus* kivételével – nem okoztak gazdaságilag jelentős kárt természetes környezetükben (Braasch 2001).

A *B. xylophilus* potenciális gazdasági kártételt okozó zárlati károsító. A kártevő magyarországi helye, szerepe, lehetséges károsítási foka még nem ismert. Az egész országot érintő felderítése 2003 óta folyik ugyan, de ennek mennyisége és minősége a károsító veszélyességéhez és betelepülésének kockázatához mérve nem elégséges.

Kutatómunkám célkitűzései a következők voltak:

- Nemzetközi felderítési protokoll bevezetése Magyarországon.
- Laboratóriumi kimutatási módszerek adaptálása.
- A fonálférgék morfológiai és molekuláris biológiai identifikációjára való előkészítés módszereinek adaptálása.
- Új, vagy a hazai faunára nézve új *Bursaphelenchus*-fajok klasszikus morfológiai azonosítása fénymikroszkóppal és pásztázó elektronmikroszkóppal.
- Új, vagy a hazai faunára nézve új *Bursaphelenchus*-fajok molekuláris biológiai azonosítása.
- Javaslat a *B. xylophilus* diagnosztikájának pontosítására.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A *Bursaphelenchus*-fajok és rovarterjesztőik felvételezési módszerei

Magyarországon 2003-tól irányítja és végzi a fenyőrontó fonálféreg, valamint terjesztő vektor rovarainak országos felderítését a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratóriuma (jogelőd: Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ, Növény- és Talajvédelmi Igazgatóság, Központi Károsító Diagnosztikai Laboratórium (KKDL)). A KKDL Nematológiai Laboratórium munkatársaként 2005-től végeztem a terepi mintavételek egy részét a laboratórium által kiadott módszertani protokoll szerint, illetve a laboratóriumi vizsgálatokat és a fonálféreg-identifikációt.

A magyarországi felderítési protokollt a FAO (1998, 1999), az EPPO (EPPO 2009a,b, 2012, 2013), az Európai Bizottság (2000, 2009) által kiadott szabványok, útmutatók, valamint Schröder és mtsai (2009) közleménye alapján dolgoztuk ki.

A B. xylophilus és a vektor rovarok vizsgálatok helye:

- fenyőfélékben, erdészeti területeken
- veszélyeztetett területeken található fenyőfélékben
- vágásterületeken, depókban lévő kivágott faanyagból és hántolt kéregből

A mintavétel időpontja:

A felderítést minden évben júniustól szeptemberig végeztük fenyőerdőkben, veszélykörzetekben és vágásterületeken, 2003-tól 2011-ig.

A mintavétel módszere:

- faanyagú minták gyűjtése és mintavétele
- hántolt kéreg gyűjtése és mintavétele

Rovargyűjtés a faanyag-mintavételi helyszínek környezetében.

2.2. A *Bursaphelenchus*-fajok laboratóriumi kimutatása és fenntartása

A fonálférgek kinyerését Baermann-tölcséres (Baermann 1917) eljárással – kisméretű faapríték, faforgács vízbe merítése – végeztem, átlagmintánként négy ismétlésben (25 g faanyag/tölcsér). A kinyert fonálférgeket TAF-oldatban tartósítottuk és “lassú glicerines” módszerrel preparáltam (Goodey 1963; Southey 1970; Elekes 1981).

A *Bursaphelenchus*-fajok tenyésztése, standard kontroll fajok fenntartása PCR-vizsgálatokhoz

Amennyiben kizárólag lárva stádiumú, vagy lárva és nőtény fonálféreg fordult elő a mintákban, vagy több példány volt szükséges a határozáshoz, illetve PCR-vizsgálattal is elvégeztük a fajhatározást, akkor a kinyert élő *Bursaphelenchus*-fajnak vélt egyedeket *Botrytis cinerea* gombával fertőzött PDA-táptalajon (Potato Dextrose Agar) szaporítottam a megfelelő egyedszám és fejlődési stádium eléréséig (Futai 1980).

A PCR-vizsgálathoz szükséges standard kontroll fonálféreg egyedeket (*B. xylophilus*, *B. mucronatus*, *B. fraudulentus*) Portugáliából rendeltem meg és PDA-táptalajon folyamatosan fenntartottam.

2.3. Az európai *Bursaphelenchus*-fajok alaktani bélyegei és azonosításának módszerei

A súlyos fapusztulást előidéző *B. xylophilus* egyértelmű azonosítása érdekében szükséges a fajszerű diagnózis, amelyben a morfológiai vizsgálat a rutindiagnosztika standard módszere (Coomans 2002). A *Bursaphelenchus*-fajok különböző kritériumok szerinti kisebb alcsoportokra különítését sok kísérlet, tanulmány előzte meg.

Annak ellenére, hogy a *xylophilus*-csoport tagjai egyértelműen elkülöníthetők a többi csoport fajaitól a spiculum formája alapján, nehéz fajszerű azonosításuk. E csoport bizonyos fajainak több morfometriai értéke egymást átfedő mérettartományba esik, és ez a populációk eltérő földrajzi helye szerint is változékony.

A *B. xylophilus* és a *B. mucronatus* nőtények közötti morfológiai hasonlóság miatt a határozást tovább nehezíti, ha a vizsgálandó mintában kizárólag hím vagy juvenil életszakaszú egyedek vannak, akkor a fajszerű identifikáció rendkívül nehéz és gyakran megbízhatatlanná válhat önmagában a morfológiai adatok alapján (Bolla és Wood 1999; Braasch 2004). Továbbá e két faj képes a genetikai állományuk egymás közötti kicserélésére (De Gurian és Bruguier 1989), ezzel is veszélyeztetve a klasszikus, morfológiai identifikáció eredményének megbízhatóságát, valamint a különböző földrajzi izolátumok elkülönítését.

A *xylophilus*-csoport fajok azonosítási nehézségei miatt Braasch 2008-ban új rendszert dolgozott ki. Szerinte a *xylophilus*-csoport fajai a *Bursaphelenchus*-genus többi fajától a négy oldalvonal megléte, a nőtényeknél a vulvalebeny megléte, a hímeknél a jellegzetes alakú spiculum, és a hét kaudális papilla elrendeződése alapján különböztethetők meg.

Morfológiai fajhatározás fénymikroszkóppal

A fajhatározást Leica DM LB2 kutatómikroszkóppal (N=800-1000), a morfometriai adatok felvételével, Leica IM 50 képanalizáló program alkalmazásával végeztük. A mikroszkópi határozás a *Bursaphelenchus*-fajok nőtény és hím egyedeinek alaktani bélyegei alapján, az eredeti fajleírások

alaktani és morfometriai (földrajzi lelőhely szerint eltérő populációk) adatainak összevetésével történt.

Morfológiai határozás elektronmikroszkóppal

A pásztázó elektronmikroszkóppal (scanning electron microscope, SEM) végzett morfológiai vizsgálat nélkülözhetetlen a *Bursaphelenchus*-fajok csoportba sorolásához, mivel az alapvető csoportképző morfológiai bélyegek, mint pl. az oldalvonalak száma, lefutása, vagy a farokpapillák fénymikroszkóppal nem, vagy csak nehezen láthatók.

Az európai *Bursaphelenchus*-fajok molekuláris biológiai azonosításának módszerei

A molekuláris vizsgálatokat a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Növényvédelmi Intézet Mikrobiológiai és Környezettoxikológiai Laboratóriumában végeztük. Az összehasonlító kontroll *Bursaphelenchus*-fajok portugál *Bursaphelenchus* tiszta tenyészetekből származó *B. xylophilus*-, *B. mucronatus*- és *B. fraudulentus*-izolátumok voltak.

A molekuláris vizsgálati minták a magyarországi hatósági mintagyűjtés növénymintái (NTAI KKDL) és portugál *Bursaphelenchus*-izolátumok (NemaLab-ICAM) voltak.

A DNS-izolálást a vélhetően (előzetes morfológiai vizsgálat alapján) *Bursaphelenchus* sp. egyedeket tartalmazó – vagy morfológiailag bizonytalan eredményt adó – magyarországi növénymintákból kinyert fonálférgekből és a portugáliai összehasonlító standard *Bursaphelenchus*-populációk különböző fejlődési stádiumú fonálféreg egyedeiből (kifejlett nőstény és hím, lárva) végeztük. 1, 5, 10 és 30 fonálféreg egyed alkotott egy mintamennyiséget. A DNS-izolálás első lépéseként a sejtek feltárására több módszert kipróbáltunk. A lízis modifikációt Burgermeister et al. (2009) alapján végeztem. A fonálférgek molekuláris azonosítását több indítószekvenciával végeztem Ferris et al. (1993) és Vrain (1993) közleménye alapján.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A magyarországi fenyvesekben felderített *Bursaphelenchus*-fajok azonosítása

A morfológiai határozás eredménye

A *Bursaphelenchus*-fajok felderítése céljából Magyarországon 2003 és 2012 között összesen 1356 helyszínen 1813 mintavétel történt. Kutatómunkám időszakában (2005-től 2011-ig) a vizsgálati helyek és a laboratóriumi határozásra begyűjtött minták száma évről évre emelkedett. A mintákban előforduló számos szaprofita fonálféreg mellett *Aphelenchoides* spp., *Laimaphelenchus* sp. és *Tylenchina* alrendbe tartozó fonálférgeket is azonosítottunk. A mintavételi és határozási eredményeket a **I. táblázat** tartalmazza.

I. táblázat: A *Bursaphelenchus*-fajok országos felderítésének mintavételi adatai és határozási eredménye (2003-2012) (Tóth et al. 2012).

A vizsgálat éve	Vizsgálati helyek száma (db)		Mintaszám (db)		<i>Bursaphelenchus</i> -fajokkal fertőzött minták száma (db) és az azonosított <i>Bursaphelenchus</i> -fajok
	Erdő ¹	Veszélykörzetben található erdő ¹	Erdő ¹	Veszélykörzetben található erdő ¹	
2003	71	0	123	0	0
2004	58	24	92	38	0
2005	69	19	120	22	0
2006	76	20	118	24	0
2007	114	33	149	51	0
2008	128	25	226	36	0
2009	140	30	267	38	6, <i>B. mucronatus</i> 3, <i>B. vallesianus</i>
2010	146	27	221	31	4, <i>B. mucronatus</i> 2, <i>B. vallesianus</i>
2011	121	22	140	25	4*, <i>B. mucronatus</i> **
2012	224	9	83	9	0**

Jelmagyarázat:

¹= lábön álló fa, illetve a területen depóban tárolt, egy évnél nem régebben kivágott vagy kidőlt fa

*= NÉBIH NTAI szóbeli közlése

**= CIRCA közlés (CIRCA 2012, 2013)

Az országos hatósági felderítés során 2003-tól 2009-ig gyűjtött növénymintákból nem volt kimutatható *B. xylophilus*, illetve más európai *Bursaphelenchus*-faj. 2005-től mintavételi és fonálféreg-kinyerési eszközpark-fejlesztést hajtottunk végre, valamint elsősorban az abiotikus és

biotikus eredetű erdőkárosítási helyszínekre (erdőrészlet) koncentráltuk a terepi mintavételt, illetve meghatároztuk a mintázandó veszélyforrásokat. Évente újabb erdőrészleteket is mintáztunk.

A Nematológiai Laboratórium a 2009-ben erdőterületeken gyűjtött Veszprém megyei famintákból Magyarországon túlevelűekből eddig még nem izolált *B. mucronatus*-t és egy, a magyar faunára új fajt, a *B. vallesianus*-t határozott meg. A gyűjtött fonálféreg preparálva, meghatározva és archiválva a NÉBIH NTAI Nematológiai Laboratóriumában elérhető (Nematológiai Referencia Gyűjteménytár). A Bakonyerdő Erdészeti és Faipari Zrt. kezelésében lévő nyugat-magyarországi **káptalanfai** lelőhelyen, *P. sylvestris* erdőben, vihar által kidőlt fából gyűjtöttem mintákat, amelyeken a kékülést okozó gombák (*Ceratostomella*-fajok) tünetei is jól kivehetőek voltak a rovarkárosítás (*Scolitydae*, *Cerambycidae*) nyomai mellett. A kifuttatott mintából megközelítőleg 30 000, tehát tömeges mennyiségben jelen lévő *B. mucronatus* fonálféreg egyedét azonosítottunk és közel 5000 *Rhabditidae* szaprofita fonálférget. A 2009. szeptember 28-án elvégzett ismételt mintavételkor e fertőzött fából és környezetéből begyűjtött *Pinus nigra* forgácsmintákból is kimutatható volt a *B. mucronatus*.

A HM VERGA Veszprémi Erdőgazdaság Zrt. kezelésében lévő nyugat-magyarországi **tótvázsonyi** lelőhelyen, ugyancsak rovar- és gombfertőzés tüneteit mutató *P. nigra* fenyőből gyűjtöttem mintát. A mintából 40 *B. vallesianus* és több száz *Rhabditidae* szaprofita fonálférget identifikáltunk. A 2009. szeptemberi ismételt mintavételkor, ugyanezen erdő részletből *B. mucronatus*-t határozottam meg, valamint a pusztuló, kiszáradt fenyők kérge alatt *Rhagium inquisitor* lárvát és imágót bábbölcsőben.

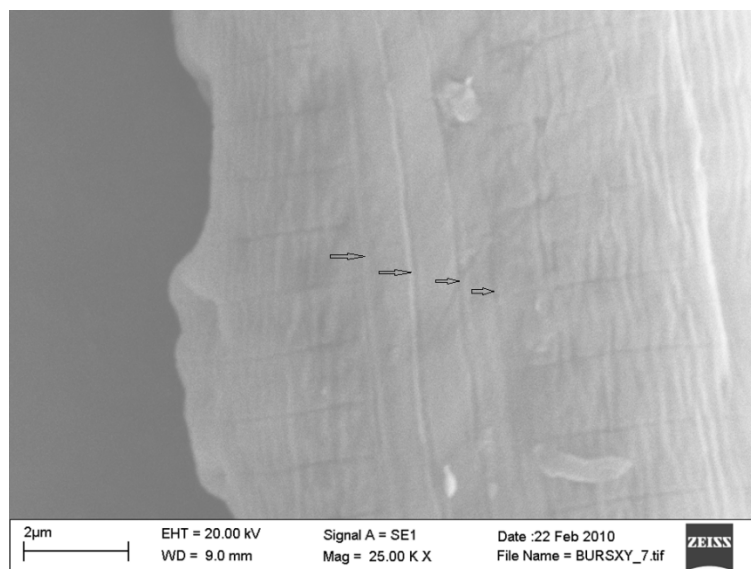
A kimutatott két faj morфомetriai adatait a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat: A *Bursaphelenchus mucronatus* és *B. vallesianus* morфомetriai adatai.

Fajok	BURSMU	BURSV A	BURSMU	BURSV A
Jellemzők	Káptalanfa <i>P. sylvestris</i> 2009.08.11	Tótvázsony <i>P. nigra</i> 2009.08.19	Brzeski és Baujard, 1997 (n=29♂; n=46♀)	Braasch et al., 2004 (n=30)
Testhossz (mm) ♂	0,72	0,71	0,70 (0,48-1,03)	0,75 (0,51-1,05)
a	36,60	40,88	41,3 (24,5-56,0)	38 (22-48)
b	6,97	11,44	10,0 (6,6-14,7)	10 (7,8-14,1)
c	29,29	35,77	24,7 (14,6-35,6)	29 (20-37)
Szuronyhossz (µm)	12,5-15,0	12,5	13,4 (11,5-17,5)	13 (12-15)
Spiculum (µm)	25,70	17,5	25 (16-32)	16 (14-19)

Fajok	BURSMU	BURSVÁ	BURSMU	BURSVÁ
Jellemzők	Káptalanfa <i>P. sylvestris</i> 2009.08.11	Tótvázsony <i>P. nigra</i> 2009.08.19	Brzeski és Baujard, 1997 (n=29♂; n=46♀)	Braasch et al., 2004 (n=30)
Testhossz (mm) ♀	0,71	0,71	0,78 (0,56-1,05)	0,83 (0,57-1,08)
a	36,20	36,50	39,5 (25-51)	39 (30-47)
b	7,24	9,23	10,6 (6,1-15,9)	11 (9,1-12,99)
c	31,50	35,0	25,1 (16,9-35)	34 (26-43)
Szuronyhossz (µm)	13,75-15,0	11,25-13,75	13,8 (12-16)	13 (11-15)
Vulva %	76	74	73,2 (66-78)	73 (71-76)

A *B. vallesianus* a morfológiai csoportosítás (Braasch et al. 2004; Lange et al. 2007) szerint a *sexdentati*-csoport tagja, Ryss és mtsai (2005) pedig e fajok körét *piniperdae*-csoportnak nevezi. Mind a *xylophilus*-, mind a *sexdentati/piniperdae*-csoportnak jellemző diagnosztikai tulajdonsága a négy oldalvonal, három oldalmező megléten (**1. ábra**).



1. ábra: A *xylophilus*- és *sexdentati/piniperdae*-csoportokra jellemző négy oldalvonal *Bursaphelenchus xylophilus*-on (SEM felvétel).

A *xylophilus*-csoport fajainak jellemző bélyege a hím farok papilláinak száma és elhelyezkedése: egy páratlan preanális, egy pár adanális, egy vagy két pár posztanális papilla közvetlenül a bursa előtt. Erősen ívelt spiculum cucullus-sal, a capitulum a condylus és rostrum között. A vulvalebeny hosszu.

A mintavételi időszakban gyűjtött lehetséges vektorok különböző rovarfejlődési alakjai együtt fordultak elő, így laboratóriumi kinevelés nem történt. A legnagyobb egyedszámban *Monochamus galloprovincialis*, *M. sutor*, valamint *Rhagium inquisitor* egyedeket gyűjtöttünk. A rovarokat a vizsgálat erdőrészekben, elsősorban a mintázott faanyagban, farönkökön, farakásokon észleltük. A rovarcsapdázás nem volt általános és elterjedt rovargyűjtési módszer a felderítés kezdeti időszakában.

Magyarországon korábban külföldi kutatók lomblevelű fából hím és nőstény *B. mucronatus* fonálférget azonosítottak (Nematol GIS System; <http://nematol.unh.edu/GIS/index.php>) Tass és Szalkszentmárton közötti területen. 2009-ben a helyszínhez megadott GPS-koordináták által jelölt zónában a *Bursaphelenchus*-genus tápnövényeit nem találtuk meg, így a *B. mucronatus* korábban publikált jelenléte az adott területen nem volt megerősíthető.

A *B. xylophilus*-hoz morfológiai és biológiai szempontból rendkívül hasonló *B. mucronatus* az Európában honos fenyőféléken nem idéz elő fapusztulást, ám európai jelenléte a fenyőrontó fonálféreg hazai betelepülésének lehetőségét jelzi.

Schauer-Blume és Sturhan 1989-ben *B. fraudulentus*-t detektált *Quercus petraea*-n Sopronban, melynek izolátumát használta fel molekuláris vizsgálatában.

A molekuláris azonosítás eredménye

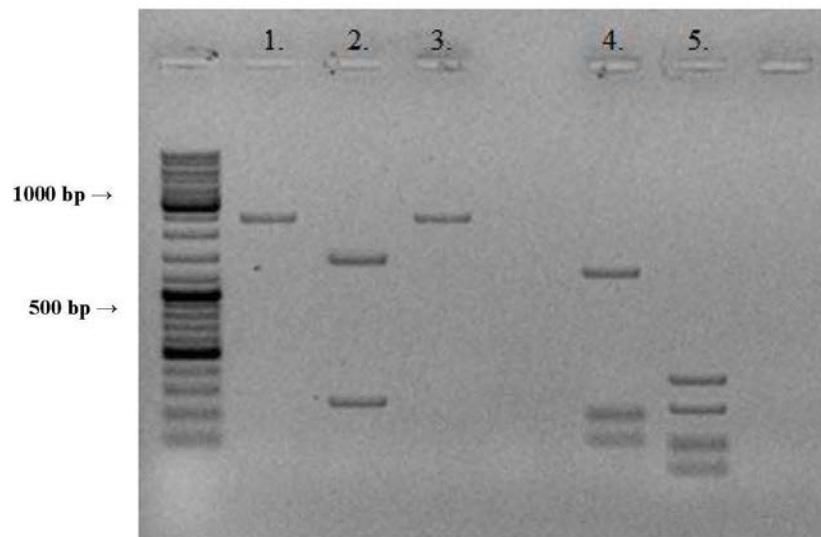
A DNS-izolálás első lépéseként a sejtek feltárására több módszert kipróbáltunk, kiindulásként 30 fonálféreg egyedet használva. A fonálféreg sejtjeinek feltárására használt CTAB (hexadeciltrimetil-ammónium-bromid) alapú módszer sokkal több sikeres feltárást eredményezett.

A Roche kittel végzett nukleinsav tisztítással kaptuk a legjobb eredményt, de itt is a megfelelő feltárású minta adta csak a PCR-reakciókat. Ezért lízis modifikációt végeztük Burgermeister et al. (2009) ajánlása alapján. A feltárási sikerességétől függően, de minden esetben a várt méretnek megfelelő (900-1100 bp) amplifikátumokat kaptuk a PCR-reakciók során.

Többnyire a kis egyedszámú fonálféreg minták mutattak tisztább képet. A 30 egyedet tartalmazó PCR vizsgálatnál gyakran tapasztaltunk plusz amplifikátumot, mely a primer nem teljes mértékű specifikusságára utal, illetve azt feltételezzük, hogy több egyed esetén növekszik a fajon belüli mikroheterogenitás valószínűsége. Az ITS-szekvencia mikroheterogenitást már több *Bursaphelenchus*-faj esetén megállapították, így Burgermeister és mtsai (2009) a *B. corneolus*, a *B. lini* és *B. singaporensis* fajoknál, Lange et al. (2007) a *B. sexdentati*, valamint Kanzaki és mtsai (2008) a *B. doui* fajoknál.

Az összehasonlító tiszta tenyészetből származó fajok (BURSXY-Pt-1, BURSMU-Pt-2, BURSFRA-Pt-3) F194+1-5368-1 primer párral történő, PCR segítségével amplifikált, megfelelő méretű termékeinek három restrikciós enzimmel történő emésztési képét mutatják a **2. ábra**.

A **2. ábrán** jól látszik, hogy az F194+1-5368-1 primer párral végzett PCR-reakció kivitelezése után, a termék *AluI* enzimmel történő emésztésekor két kisebb DNS keletkezik 250, illetve 1200 bp körüli méretben. *HaeIII* és *Hinfi* emésztésekor három, négy kisebb méretű DNS-szakasz keletkezik, melyek eltérő méretűek, és a várt, szakirodalomban publikált eredményekkel megegyezők.



2. ábra: A kontroll *Bursaphelenchus mucronatus* (BURSMU-Pt-2) ITS-RFLP mintázata az F194+1-5368-1 primer párral. **1, 3:** PCR-termék futtatása. **2:** Emésztés *AluI* enzimmel. **4:** Emésztés *HaeIII*. **5:** Emésztés *Hinfi* enzimmel.

Megjegyzés: **1:** ~900 bp **2:** ~650 bp és ~250 bp **3:** ~900 bp **4:** ~600 bp, ~200 bp és ~100 bp **5:** ~400 bp, ~250 bp, ~100 bp és ~50 bp

Néhány növényi minta PCR-vizsgálatakor plusz amplifikátumok jelentek meg, kevésbé adott tiszta mintázatot a kontroll fajokhoz képest. Mindez igen megnehezítette a pontos besorolást.

3.2. A különböző molekuláris eljárások adaptálása és összehasonlítása

A legmegbízhatóbb eredményt, a Roche kit segítségével végzett nukleinsav-tisztítás, illetve a Burgermeister és mtsai (2009) közleménye alapján alkalmazott lízis modifikáció adta.

Az F194+5368 primer pár alkalmazásakor gyakran csak a klónozás után derült ki, hogy az oligonukleotid nem volt eléggé specifikus, ezért nem javasoljuk használatát. Így például a klónozás és szekvenáltatás után 89% azonosságú AY969639.1 Uncultured basidiomycete isolate M177664.1 Uncultured compost fungust (fonálféreg-táptalajjal bevitt véletlen gombafertőzés) kaptunk.

Az F194+1-5368-1 primer párral végzett PCR esetén sokkal megbízhatóbb eredményekről tudunk beszámolni, ezek az indítószekvenciák valamennyi mintánál megfelelő terméket adtak. A K1f+K2r primer kombináció nem működött, nem adott minden esetben értékelhető eredményt,

mintázatot. Ha a negatív eredményt adó DNS-mintát újra lefuttattuk a F194+1-5368-1 primer párral, akkor a megfelelő méretű fragmentumok megjelentek.

A kapott mintázatok jól reprodukálhatók, azonban a PCR-RFLP-analízis diszkriminációs képességét jelentősen befolyásolja az alkalmazott restrikciós enzimek specifikussága és száma. A PCR-RFLP-kép kialakításakor több enzim használata ajánlott. Vizsgálatainkban az *AluI*, *HinfI* és *HaeIII* enzimek használatakor, a *HaeIII* enzim esetén ITS-szekvencia mikroheterogenitást tapasztaltunk, mely megnehezítette az eredmények értékelését. A fajon belüli mikroheterogenitás több fonálféreg egyedet tartalmazó minták esetén volt jellemző.

3.3. Új tudományos eredmények

A 2003-tól országosan és rendszeresen végzett szemle és az ahhoz minden esetben kapcsolódó diagnosztikai munka a *B. mucronatus* és *B. vallesianus* első hazai kimutatását eredményezte, információt szolgáltatva arra nézve is, hogy mely területeken szükséges intenzívebbé tenni a felderítési munkát. Ez a felderítési és diagnosztikai munka bizonyította, hogy Magyarországon 2013-ig a zárlati státuszú fenyőrontó fonálféreg nem fordult elő (Tóth és Elekes 2013).

- A magyarországi faunára nézve új fajt, a *B. vallesianus*-t mutattam ki.
- A Magyarországon túlevelűekből eddig még nem izolált *B. mucronatus*-t mutattam ki. Ez a faj túlevelűekben – mint új tápnövényben – újdonság Magyarországon. Kizárólag közvetett bizonyíték van a korábbi előfordulásra. Nincs olyan közlemény, amely a megtalálóját és/vagy az első hazai előfordulását tárgyalná. A szakirodalom (Nematol GIS System adatbázis; Nematol Specimens Geographic Distribution) PCR vizsgálati anyagként tünteti fel.
- Megállapítottam, hogy a *Bursaphelenchus*-fonálféreg morfológiai bélyegek alapján történő meghatározásának csak kiegészítő eleme lehet a 2013-ban megjelent EPPO Diagnosztikai Protokollban (PM 7/4 (3)) ajánlott molekuláris módszer.
- Kimutattam, hogy a növénymintákból kinyert fonálféreg molekuláris vizsgálatakor az eredményességet leginkább a lízis módszerének megválasztása befolyásolja. PDA-táptalajon fenntartott tiszta fonálféreg-tenyészetnél a lízis módszere nem kritikus pont.
- A *Bursaphelenchus*-fajok elkülönítésére a F194+1-5368-1 primer párral végzett PCR-reakció után az RFLP-analízis elvégzése legalább három enzimmel (*AluI*, *HinfI*, *HaeIII*) szükséges.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. Az alkalmazott magyarországi felderítés

A vizsgált időszakban a *B. xylophilus* felderítésére vonatkozó nemzetközi protokoll követelményeit Magyarország teljesítette.

A kimutatott *B. mucronatus*, *B. vallesianus* és a *Monochamus* vektorok magyarországi jelenléte, a hazai telepített fenyvesek növény-egészségügyi állapota, a viharkárok okozta fakidőlések, a melegedő éghajlat, a külföldi eredetű fa csomagolóanyagok, és így a vektor rovarok vándorlása annak a valószínűségét növeli, hogy a *B. xylophilus* Magyarországra bekerül és számára kedvező életfeltételeket talál. E zárlati károsító természetes továbbterjedése, valamint fa- és csomagolóanyagokkal történő nagyfokú behurcolási veszélyessége miatt szükséges a hazai felderítések fokozott figyelemmel történő végrehajtása. Az eredményesség (károsító-mentesség fenntartása) érdekében kellő számú – évente legalább 170-200 ellenőrzési helyszín – országos szemle, mintavétel tervezése és elvégzése szükséges Magyarországon, az erdészeti hatóság közreműködésével. A felderítéskor túlevelű erdőkben feltétlenül indokolt elvégezni a vektor rovarok csapdázását is, amely eddig a vizsgált időszakban csak esetleges volt (főleg egyedi rovargyűjtés történt).

A *B. xylophilus* kártétele ellen egyetlen védekezési mód egyelőre a megelőzés, a rovarcsapdázás, a korai észlelés. Ahol jelenléte bizonyított, ott a legszigorúbb zárlati intézkedések lépnek életbe, vagyis a hatóság a fertőzési helytől számított több száz méter sugarú körben a túlevelűek totális megsemmisítését rendeli el.

A környező országok közül Csehország és Románia tett közzé részletes felderítési adatokat. Csehország teljes erdőterületének mintegy 74%-a (1,91 millió ha), Románia erdőterületének pedig közel 31%-a (1,95 millió ha) túlevelű. Az őshonos túlevelű fafajokban gazdag szomszédos országok (Csehország, Románia) felderítési rendszerében 2006-tól végrehajtott növényi mintázás során a magyarországi mintaszámokkal közel megegyező mennyiségű mintát gyűjtöttek.

A *Monochamus*-fajok másodlagos erdei kártevők, főként legyengült vagy pusztuló fákon élnek (Evans et al. 2004). Felderítésük kiemelt fontosságú, mert világszerte a *B. xylophilus* fő terjesztői (Akbulut és Stamps 2012). A magyarországi *Bursaphelenchus*-genus teljes faji változatosságának és eloszlásának meghatározása érdekében indokolt a vektor rovarok mintaszámainak növelése és azok nematológiai vizsgálata.

4.2. Az azonosítási módszerek alkalmazhatósága és megbízhatósága

A *Bursaphelenchus*-fonálférgék fajsztintú meghatározása nem minden esetben lehetséges morfológiai, morfometriai vizsgálatokkal. Az alaktani vizsgálatok kiegészítésére, illetve megerősítésére a DNS-alapú molekuláris technikák közül legeredményesebb az ITS-RFLP-eljárás.

A vizsgálathoz a szakirodalom többféle specifikus primert javasol. Bizonyos primer pár nem teljesen specifikus, pl. a mintában lévő gombaképleteket is felszaporította a nagy tisztasági fokú Roche kit DNS-izolálás után is. A hatósági diagnosztikai protokoll (EPPO 2013a) a Burgermeister-féle leírások (2005, 2009) használatát javasolja az EPPO-régióban. Megállapítottuk, hogy a primerek közül az F194+1-5368-1 primer pár optimális. A leginkább specifikusnak jellemzett K1f igen gyakran nem adott amplifikátumot, illetve nem volt megismételhető az eredmény. A legkorábbi (1993) primer kombináció pedig nem bizonyult elég specifikusnak, *Basidiomycetes*, illetve más gombák riboszomális egységeinek felszaporítását idézte elő.

Az elvégzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a rendelkezésre álló hazai, valamint a portugál kontroll minták vizsgálata a nemzetközi hatósági protokollban javasolt molekuláris eljárással (PCR-RFLP-analízis) megfelelőnek tűnik, de nagyon fontos az alkalmazandó primer, illetve restrikciós endonukleáz meghatározása.

A nem kontroll fajok molekuláris azonosítása nem volt ilyen sikeres. Ezek PCR-vizsgálatakor plusz amplifikátumok jelentek meg. Ezért a Burgermeister és mtsai (2009) által publikált és leginkább elfogadott PCR-RFLP-eljárást elsősorban a klasszikus mikroszkópos identifikáció pozitív vagy kétséges eredményeinek megerősítésekor érdemes használni a rutin diagnosztikában.

Fontos azt is hangsúlyozni, hogy nem szükséges a szakirodalomban gyakran használt öt enzim mindegyikének tesztelése, hanem elegendő három enzim kiválasztása és tesztelése.

Megállapítható továbbá, hogy nagyobb egyedszám esetén gyakran jelentős eltérés volt a PCR-termék mérete, illetve az RFLP-kép alapján számított méret között. Erre a jelenségre már Burgermeister és mtsai (2009) is felhívták a figyelmet, de tapasztalataink szerint természetes közegből származó minták esetén ez az arány igen jelentősen megnőtt, megnehezítve az eredmények értékelését. A méretbeli eltérés valószínűleg a szekvenciában tapasztalható mikroheterogenitásnak köszönhető.

4.3. Javaslatok

A felderítéshez kapcsolódó *Bursaphelenchus*-fajokat terjesztő rovarok intenzívebb erdészeti vizsgálata érdekében javasolt a *Monochamus*-fajok monitorozásának bevezetése elterjedési területükön. Azokon az erdészeti területeken, ahol a fonálféreg vektorai nem fordulnak elő, ott a *Bursaphelenchus* nem képes terjedni, még akkor sem, ha fertőzött faanyaggal (pl. fa

csomagolóanyag) behurcolták. A fenyőrontó fonálféreg elleni védekezési stratégia kidolgozását nehezíti, hogy a Magyarország területén leírt *Monochamus*-fajok jelen időszakban való elterjedési területéről és populációsűrűségéről nincs aktuális közölt adat.

Az ismert magyarországi *Monochamus* előfordulási helyeken a csapdaelhelyezés helyszínének kiválasztásakor ajánlott figyelembe venni, hogy e fajok az erdőtüzeket követő évben rendszerint az elsőként betelepülő rovarok közé tartoznak. Az imágókat vonzzák a fiziológiailag legyengült fák (szél- vagy erdőtűzkár). Azok a növények is kedvelt tojásrakási helyek, amelyek már egyéb rovarfajokkal fertőzöttek, valamint a frissen kivágott fák és azok zöld vágási hulladékai (Hellriegel 1971; Scwenke 1974). A növénypusztulást követő 6-12 hónapon belül érdemes a kivágott vagy elpusztult fát mintázni. Az ilyen területeken álló és kivágott fák rovarcsapdázása attraktáns csalétektartalmú (ipsenol, alpha pine lure, ethanol lure) csapdatestek kihelyezésével javasolt. Szintén javasolt a bogarak repülési időszakában a kivágott fák fogófékét (csapdázásra használt farönk) történő felhasználása. Ha ősszel szállítják a farönköt a laboratóriumba, ezzel felgyorsítható a bogarak fejlődése. Így több héttel előbb kirepülnek, mint természetes körülmények között (Schönfeld et al. 2008).

A vektorokból történő fonálféreg-izolálás érdekében a rovarokat vágjuk és összezúzzuk, ezután vízben vagy Baermann-tölcséres eljárással, 24-48 órán át 24 °C-on tartva a fonálféreg dauerlárvák elhagyják a rovarok testét (Mamiya és Enda 1972; Bowers et al. 1992; Sousa et al. 2001). A fajhatározás érdekében a dauerlárvák táptalajon (burgonya-dextróz agaron tenyésztett *Botrytis cinerea*) tenyészthetők.

Az utóbbi fél évszázadban a magyarországi erdőkben bekövetkező biotikus és abiotikus károk trendje növekvő. Amennyiben a klímaváltozásra vonatkozó előrejelzések akár csak részben is igazolódnak, akkor a behurcolt és inváziós fajok növekvő mértékű károkat fognak okozni (Csóka 2011). Európához hasonlóan a magyarországi erdőkben is nagy veszélyt jelent a károsítók és kórokozók gyorsuló ütemű globalizációja. A klímaváltozás várható negatív ökológiai hatásai komoly veszélyt jelenthetnek az erdőgazdálkodásra. Magyarországon a mono- és oligofág jövevény károsító fajok zöme a *Picea*- és *Pinus*-nemzetségeken jelent meg (Csóka et al. 2012).

5. IRODALOMJEGYZÉK

- 7/2001. (I.17.): FVM rendelet a növény-egészségügyi feladatok végrehajtásának részletes szabályairól. *Magyar Közlöny*, 6, 267-356. p.
- AKBULUT S., ELEKÇIOGLU H., KETEN A. (2008): First record of *Bursaphelenchus vallesianus* Braasch, Schönfeld, Polomski, and Burgermeister in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32, 273-279. p.
- ANONYMOUS (2008): Resolución de 12 de noviembre de 2008, de la Dirección General de Explotaciones y Calidad Alimentaria, por la que se declara contaminada por el nematodo de la madera del pino *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. Determinada a área forestal del término municipal de Villanueva de la Sierra y se establece una zona demarcada de 20 kilómetros de radio, adoptándose en ella diversas medidas fitosanitarias tendentes al control y erradicación del agente patógeno. *Diario Oficial de Extremadura Numero 233, Martes, 2 de diciembre de 2008*, 32028-32036. p.
- BAERMANN G. (1917): Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum- (Nematoden)-Larven In Erdproben. [A simple method for the detection of Ankylostomum (nematode) larvae in soil tests.] *Mededelingen uit het Geneeskundig Laboratorium te Weltevreden*, 41-47. p.
- BOWERS W.W., HUDAK J., RASKE A.G. (1992): Host and vector surveys for the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle (NEMATODA: Aphelenchoididae) in Canada. *Information Report Newfoundland and Labrador Region, Forestry Canada (N-X-285)*, 55. p.
- BRAASCH H. (2001): *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: distribution and morphological relations. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 31, 127-142. p.
- BURGERMEISTER W., METGE K., BRAASCH H., BUCHBACH E. (2005): ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (NEMATODA: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology*, 13, 29-42. p.
- BURGERMEISTER W., BRAASCH H., METGE K., GU J., SCHRÖDER T., WOLDT E. (2009): ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of *Bursaphelenchus* species. *Nematology*, 11 (5) 649-668. p.
- CIRCA (2012): Communication and Information Resource Centre Administrator: <http://circa.europa.eu/>
- CIRCA (2013): Communication and Information Resource Centre Administrator: <http://circa.europa.eu/>

- COOMANS A. (2002): Present status and future of nematode systematic. *Nematology*, 4, 573-582. p.
- CSÓKA GY. (2011): Megszálló rovarok a magyar erdőkben. Mit hozhat még a klímaváltozás? *Erdészeti Lapok*, 146 (5) 150-151. p.
- CSÓKA GY., HIRKA A., SZŐCS L. (2012): Rovarglobalizáció a magyar erdőkben. *Erdészettudományi Közlemények*, 2 (1) 187-198. p.
- DAISIE (2012): Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe: <http://www.europe-aliens.org/>
- ELEKES A. (1981): Nematológiai praktikum. Mezőgazdasági és Élelmezésügyi Minisztérium Információs Központ, Budapest: Agroinform. 387. p.
- EPPO (2009a): Diagnostics PM 7/4 (2) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 39, 344-353. p.
- EPPO (2009b): Report of a Pest Risk Analysis for *Bursaphelenchus xylophilus*. 09/15450
- EPPO (2012): National regulatory control systems PM 9/1 (5) *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors: procedures for official control. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 42 (3) 477-485. p.
- EPPO (2013): Diagnostics PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 43 (1) 105-118. p.
- EUROPEAN COMMISSION (2000): EC Pinewood Survey Protocol. *SANCO B/1 D(00)*, 18. p.
- EUROPEAN COMMISSION (2009): EU Pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Survey Protocol 2009. *European Commission Health and Consumers Directorate-General, Safety of the Food Chain Biotechnology and Plant Health*, Brussels, 28 September 2009.
- EVANS H.F., MCNAMARA D.G., BRAASCH H., CHADOEUF J., MAGNUSSON C. (1996): Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 26, 199-249. p.
- EVANS H.F., MORAAL L.G., PAJARES J.A. (2004): *Buprestidae* and *Cerambycidae*. In: LIEUTIER F., DAY K.R., BATTISTA A., GREGOIRE J.C., EVANS H.F. (Eds.): *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. Dordrecht: Kluwer, 447-474. p.
- FAO (1998): International Standards for Phytosanitary Measures, Guidelines for Surveillance. ISPM No. 6. *Secretariat of the International Plant Protection Convention, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*, 12. p.
- FAO (1999): International Standards for Phytosanitary Measures, Determination of pest status in an area. ISPM No. 8. *Secretariat of the International Plant Protection Convention. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*, 18. p.

- FERRIS V.R., FERRIS J.M., FAGHIHI J. (1993): Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*, 16, 177-184. p.
- FUTAI K. (1980): Developmental rate and population-growth of *Bursaphelenchus lignicolus* (NEMATODA: Aphelenchoididae) and *Bursaphelenchus mucronatus*. *Applied Entomology and Zoology*, 15, 115-122. p.
- GOODEY J.B. (1963): Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. *Technical Bulletin, No. 2. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London*, 72. p.
- HELLRIGL K.G. (1971): Die bionomie der Europäischen *Monochamus* – arten (COLEOPTERA: Cerambycidae) und ihre bedeutung fur die forst - und holzwirtschaft. *Redia*, 52, 367-509. p.
- HIRKA A., CSÓKA GY. (2010): Abiotikus erdökárok Magyarországon (1961-2009). *Erdészeti Lapok*, 145 (7-8) 246-248. p.
- KANZAKI N., AIKAWA T., MAEHARA N., MATSUMOTO K. (2008): *Bursaphelenchus doui* Braasch, Gu, Burgermeister and Zhang, 2005 (APHELENCHIDA: Parasitaphelenchidae), an associate of *Monochamus subfasciatus* Bates (COLEOPTERA: Cerambycidae) and *Pinus densijlora* Sieb. and Zucc. *Nematology*, 10, 69-78. p.
- KISHI Y. (1995): The pine wood nematode and the Japanese pine sawyer. *Forests pests in Japan, No. 1*. Tokyo, Japan: Thomas Co. Ltd, 302. p.
- KIYOHARA T., TOKUSHIGE Y. (1971): Inoculation experiments of a nematode *Bursaphelenchus* sp. onto pine trees. *Journal of the Japanese Forestry Society*, 53, 210-285. p.
- KOBAYASHI F., YAMANE A., IKEDA T. (1984): The Japanese pine sawyer beetle as the vector of pine wilt disease. *Annual Review of Entomology*, 29, 115-135. p.
- KOLTAY A. (2001): Az erdei és feketefenyő gombabetegségei. Képes határozó. Budapest: Agroinform. 90. p.
- KSH (2011): <http://www.ksh.hu/>
- MAMIYA Y. (1983): Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual review of Phytopathology*, 21, 201-220. p.
- MAMIYA Y., ENDA N. (1972): Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (NEMATODA: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (COLEOPTERA: Cerambycidae). *Nematologica*, 18, 159-162. p.
- MOTA M.M., BRAASCH H., BRAVO M.A., PEÑAS A.C., BURGERMEISTER W., METGE K., SOUSA E. (1999): First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and Europe. *Nematology*, 1, 727-734. p.
- NEMATOL GIS SYSTEM: <http://nematol.unh.edu/GIS/index.php>

- NICKLE W.R., GOLDEN A.M., MAMIYA Y., WERGIN W.P. (1981): On the taxonomy and morphology of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner 1934) Nickle 1970. *Journal of Nematology*, 13, 385-392. p.
- SCHÖNFELD U., BRAASCH H., BURGERMEISTER W., BRÖTHER H. (2008): Investigations on wood-inhabiting nematodes of the genus *Bursaphelenchus* in pine forests in the Brandenburg Province, Germany. 69-73. p. In: MOTA M.M., VIEIRA P. (Eds.): *Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems*. The Netherlands: Springer, 405. p.
- SCHRÖDER T., MCNAMARA D.G., GAAR V. (2009): Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 39 (2) 179-188. p.
- SCHWENKE W. (1974): Die Forstschädlinge Europas. Bd. 2. *Verlag Paul Parey, Hamburg*, 500 p.
- SOUSA E., BRAVO M.A., PIRES J., NAVES P., PEÑAS A.C., BONIFÁCIO L., MOTA M.M. (2001): *Bursaphelenchus xylophilus* (NEMATODA: Aphelenchoididae) associates with *Monochamus galloprovincialis* (COLEOPTERA: Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*, 3, 89-91. p.
- SOUTHEY J.F. (1970): Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. *Technical Bulletin 2, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Her Majesty's Stationery Office, London, UK*, 148 p.
- STEINER G., BUHRER E.M. (1934): *Aphelenchoides xylophilus* n. sp., a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *Journal of Agricultural Research*, 48, 949-951. p.
- TÓTH Á., ELEKES M. (2013): Report on the survey for *Bursaphelenchus xylophilus* and the occurrence of other *Bursaphelenchus* species in Hungarian coniferous forests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 43 (1) 152-154. p.
- TÓTH Á., ELEKES M., KISS J. (2012): Monitoring quarantine pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* in Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 47 (1) 55-59. p.
- VRAIN T.C. (1993): Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group. *Journal of Nematology*, 25, 361-364. p.
- YANO M. (1913): Investigation on the cause of pine mortality in Nagasaki Prefecture. *Sanrinkoho*, 4, 1-14. p.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Idegen nyelvű lektorált tudományos közlemények

- TÓTH Á., ELEKES M. (2013): Report on the survey for *Bursaphelenchus xylophilus* and the occurrence of other *Bursaphelenchus* species in Hungarian coniferous forests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 43 (1) 152-154. p.
- TÓTH Á., ELEKES M., KISS J. (2012): Monitoring quarantine pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* in Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 47 (1) 55-59. p.
- TÓTH Á. (2011): *Bursaphelenchus xylophilus*, the pinewood nematode: its significance and a historical review. *Acta Biologica Szegediensis*, 55 (2) 213-217. p.
- Megjegyzés:* E publikáció adja a kötet címlapfotóját (fotó: Tóth Ágnes) az *Acta Biologica Szegediensis* szerkesztőbizottsági döntés alapján.

Magyar nyelvű lektorált tudományos közlemények

- TÓTH Á., ELEKES A. (2011): Első jelentés a *Bursaphelenchus mucronatus* és *B. vallesianus* (NEMATODA: Parasitaphelenchidae) magyarországi jelenlétéről tűlevelű fajokon. *Állattani Közlemények*, 96 (1-2) 23-38. p.
- TÓTH Á. (2010): A fenyőrontó fonálféreg (*Bursaphelenchus xylophilus*) (Steiner et Buhner 1934) Nickle 1970 és a *Bursaphelenchus* nem egyéb, tűlevelűekben élő fajainak ismertetése. *Növényvédelem*, 46 (4) 169-175. p.

Magyar nyelvű lektorált konferencia kiadványok

- TÓTH Á. (2011): A fenyőrontó fonálféreg, *Bursaphelenchus xylophilus* /NEMATODA: Parasitaphelenchidae/ magyarországi felderítési eredményeinek ismertetése. 57. *Növényvédelmi Tudományos Napok 2011*, Budapest, 64. p.
- TÓTH Á. (2010): A fenyőrontó fonálféreg, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner 1934) Nickle 1970 /NEMATODA: Parasitaphelenchidae/ faj 2009. év felderítési eredménye Magyarországon. 56. *Növényvédelmi Tudományos Napok 2010*, Budapest, 71. p.
- TÓTH Á. (2009): A fenyőrontó fonálféreg, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner és Buhner 1934) Nickle et al. 1970 /NEMATODA: Parasitaphelenchidae/ felderítése Magyarországon. 55. *Növényvédelmi Tudományos Napok 2009*, Budapest, 70. p.