

Szent István Egyetem

**ÁRPÁT FERTŐZŐ *PYRENOPHORA* FAJOK
INTRA- ÉS INTERSPECIFIKUS
VÁLTOZÉKONYSÁGA**

Doktori értekezés

FICSOR ANITA

**Gödöllő
2017**

Doktori iskola: Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Helyes Lajos
egyetemi tanár, intézetigazgató, az MTA doktora
Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Intézet

Tudományterület: Agrártudományok

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Témavezetők: Dr. Bakonyi József
Kandidátus, tudományos főmunkatárs
Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi
Kutatóközpont Növényvédelmi Intézet

Dr. Tóth Beáta
Ph.D., tudományos főmunkatárs
Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ
Növénytermesztési Önálló Kutatási Osztály

.....
Dr. Bakonyi József
témavezető

.....
Dr. Tóth Beáta
társ-témavezető

.....
Dr. Helyes Lajos
doktori iskola vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	7
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1	Árpát fertőző Pyrenophora fajok	9
2.1.1	<i>A Pyrenophora teres f. teres, a P. teres f. maculata és a P. graminea taxonómiája és nevezéktana</i>	13
2.1.2	<i>A Pyrenophora teres f. teres, a P. teres f. maculata és a P. graminea biológiája és életciklusa</i>	16
2.1.3	<i>A Pyrenophora teres f. teres, a P. teres f. maculata és a P. graminea morfológiája</i> ..	18
2.1.4	<i>A vizsgált Pyrenophora fajok által okozott betegségek tünetei</i>	22
2.1.5	<i>A vizsgált Pyrenophora fajok előfordulása és gazdasági jelentősége</i>	23
2.2	DNS-alapú molekuláris módszerek a növénypatogének genetikai variabilitásának vizsgálatára	25
2.2.1	<i>RAPD alapú módszerek</i>	27
2.2.2	<i>Szekvencia alapú módszerek</i>	28
2.2.2.1	<i>Riboszomális DNS ITS-régió</i>	28
2.2.2.2	<i>Fehérjéket kódoló gének</i>	30
2.3	Pyrenophora teres f. teres intraspecifikus genetikai változékonysága	33
2.3.1	<i>A Pyrenophora teres párosodási típusainak eloszlása</i>	37
2.4	Árpát fertőző Pyrenophora fajok filogenetikája és interspecifikus rokonsága	40
3	ANYAG ÉS MÓDSZER	45
3.1	Izolátumgyűjtemény	45
3.1.1	<i>Hazai levél minták gyűjtése</i>	45
3.1.2	<i>Egyspórás tenyészetek izolálása</i>	45
3.2	Atipikus levéltünetekről származó izolátumok morfológiai és patogenitási vizsgálata	45
3.2.1	<i>Telepmorfológia, telepnövekedés és az ivartalan szaporítóképletek morfológiájának vizsgálata</i>	46
3.2.2	<i>Üvegházi patogenitási teszt</i>	47
3.3	Molekuláris genetikai vizsgálatok	47
3.3.1	<i>DNS-kivonás</i>	47
3.3.2	<i>Kórokozók azonosítása specifikus PCR-rel</i>	48
3.3.3	<i>Párosodási típusok meghatározása specifikus PCR-rel</i>	48
3.3.4	<i>Pyrenophora teres f. teres genetikai változékonyságának vizsgálata</i>	49
3.3.4.1	<i>RAPD-vizsgálatok</i>	49
3.3.4.2	<i>RAPD-adatok populációgenetikai statisztikai elemzése</i>	49

3.3.5	<i>Árpát fertőző Pyrenophora fajok filogenetikai rokonságának vizsgálata</i>	50
3.3.5.1	A vizsgált szekvenciák PCR-es felszaporítása.....	55
3.3.5.2	PCR-termékek szekvenálása	55
3.3.5.3	Filogenetikai elemzések.....	55
4	EREDMÉNYEK	57
4.1	Atipikus tünetekről származó izolátumok jellemzői	57
4.1.1	<i>Tünetek leírása</i>	57
4.1.2	<i>Mikromorfológiai tulajdonságok</i>	57
4.1.3	<i>Telepmorfológiai jellemzők</i>	60
4.1.4	<i>A kórokozók fertőzőképességének igazolása</i>	61
4.2	Molekuláris vizsgálatok eredményei	62
4.2.1	<i>Izolátumok azonosítása faj és forma specifikus indítószekvenciák felhasználásával</i> ..	62
4.2.2	<i>Párosodási típusok eloszlása</i>	65
4.2.3	<i>A Pyrenophora teres f. teres genetikai variabilitása RAPD-mintázatok alapján</i>	67
4.2.4	<i>A P. teres és a P. graminea filogenetikai rokonsága</i>	75
4.2.4.1	<i>Polimorfizmusok a P. teres f. teres, P. teres f. maculata és P. graminea vizsgált izolátumaiban</i>	75
4.2.4.2	<i>A P. teres f. teres, P. teres f. maculata és P. graminea filogenetikai kapcsolatai Maximum Likelihood (ML) és Bayesian analízissel</i>	76
5	KÖVETKEZTETÉSEK	81
5.1	Atipikus tünetekről származó izolátumok azonosítása	81
5.2	A Pyrenophora graminea, P. teres formák és párosodási típusaik gyakorisága, elterjedése Magyarországon	82
5.3	A P. teres f. teres hazai populációjának változékonysága	84
5.4	A P. graminea és P. teres filogenetikai rokonsága	86
5.5	Új tudományos eredmények	88
6	ÖSSZEFOGLALÁS	89
7	SUMMARY	92
M1.	IRODALOMJEGYZÉK	95
M2.	A dolgozat során vizsgált izolátumok adatai	110
M3.	A vizsgálatok során alkalmazott PCR reakciók és primer szekvenciák	118
	Köszönetnyilvánítás	119

“Végtelen számú kísérlet sem bizonyíthatja, hogy igazam van, de egyetlen kísérlet is bizonyíthatja, hogy tévedtem.”

(Albert
Einstein)

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFLP	<u>A</u> mplified <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
AP-PCR	<u>A</u> rbitrary <u>P</u> rimed <u>P</u> CR
bp	bázispár
BAYES	<u>B</u> ayesian
CTAB	<u>C</u> etil- <u>t</u> rimetil- <u>a</u> mmónium- <u>b</u> romid
DAF	<u>D</u> NA <u>A</u> mplification <u>F</u> ingerprinting
DNS	<u>D</u> eoxiribonukleinsav
EDTA	<u>E</u> tiléndiamintetraacid
ISSR	<u>I</u> nter <u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>R</u> epet
ITS	<u>I</u> nternal <u>T</u> ranscribed <u>S</u> pacet
<i>gpd</i>	<u>G</u> lyceraldehyde-3- <u>p</u> hosphate- <u>d</u> ehydrogenase
LSU	<u>L</u> arge <u>S</u> ubunit (nagy alegység)
MAAP	<u>M</u> ultiple <u>A</u> rbitrary <u>A</u> mplification <u>P</u> rofiling
ML	<u>M</u> aximum <u>L</u> ikelihood
mt DNS	<u>m</u> itokondriális <u>D</u> NS
rDNS	<u>r</u> iboszómális <u>D</u> NS
PCR	polimeráz lácreakció (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PG	<i>Pyrenophora graminea</i>
PTM	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>
PTT	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>
RAPD	<u>R</u> andom <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> NA
RAPD-DGGE	<u>R</u> APD- <u>D</u> enaturing <u>G</u> radient <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
RNS	<u>R</u> ibonukleinsav
SSR	<u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>R</u> epet
STR	<u>S</u> hort <u>T</u> andem <u>R</u> epet
Tris	<u>T</u> ris (hidroximetil) aminometán
U	Egység (<u>u</u> nit)
UPGMA	<u>U</u> nweighted <u>P</u> air <u>G</u> roup <u>M</u> ethod of <u>A</u> ritmetical means
USDA	<u>U</u> nited <u>S</u> tates <u>D</u> epartment of <u>A</u> griculture
UV	Ultraibolya (<u>u</u> ltraviolet)

2 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) igen értékes és fontos gabonaféle, melyet világszerte természetnek. Vetésterülete alapján a gabonafélék között világviszonylatban a negyedik, míg hazánkban a harmadik helyet foglalja el. A 2014/15-ös termesztési ciklusban 49,2 millió hektáron termesztettek árpát az egész világon, összesen 141,16 millió tonna mennyiségben (USDA adat). A fő árpatermesztő országok: Oroszország, Franciaország, Németország, Ausztrália, Kanada és Spanyolország. Magyarországon 2014-ben 322 ezer tonna tavaszi árpát takarítottak be 83 ezer hektárról, míg őszi árpából 957 ezer tonnát 205 ezer hektárról. Felhasználási területe igen széleskörű: értékes takarmány, fontos alapanyaga a maláta és sörkészítésnek, és emberi fogyasztásra is alkalmas.

Az árpatermesztés eredményességét számos betegség veszélyeztetheti. MATHRE (1997) közel 80 különböző betegséget sorolt fel a *Compendium of Barley Diseases* kiadványban, de ezek közül csak néhány okoz évenként súlyos, gazdasági veszteséget. Hazánkban legjelentősebbek – évjáratonként és fajtánként eltérő mértékben – a vírusok által kiváltott törpülések, az árpalisztharmat, az árpalevéltrozsa, a pirenofórás levélfoltosságok és a kalászfuzáriózis, de a rinospóriumos és ramuláriás levéltbetegségek előfordulása is fokozódik (MANNINGER és MURÁNYI 2009, TOMCSÁNYI et al. 2006).

Az árpa pirenofórás, korábban „helmintosporiózisok” közé sorolt betegségeit az aszkuszos *Pyrenophora* Fr. (konídiumos alak: *Drechslera* Ito) nemzetségbe tartozó gombák okozzák. Bár világszerte több mint egy tucat fajuk előfordulását közölték a *Hordeum* nemzetség tagjain (SIVANESAN 1987), termesztett árpán leggyakrabban a levélcsíkoltságot okozó *P. graminea* Ito et Kurib. (konídiumos alak: *D. graminea* (Rabenh. ex Schlecht.) Shoem.) és a levélfoltosságokat okozó *P. teres* Drechs. (konídiumos alak: *D. teres* (Sacc.) Shoem.) található. E két kórokozó elterjedt a világ árpatermesztő régióiban, így Magyarországon is. Az általuk okozott termésveszteség általában 20–30%-os, de akár súlyosabb is lehet (KHAN 1987, STEFFENSON et al. 1991, PALÁGYI és TOMCSÁNYI 2006, TOMCSÁNYI et al. 2006). SMEDEGÅRD-PETERSEN (1971) a *P. teres* izolátumait további két faj alatti csoportba sorolta tünettípusaik alapján. A hossz- és keresztirányú nekrotikus foltokat okozóknak a *P. teres* Drechs. f. *teres* Smed.-Pet., a változatos alakú, úgynevezett 'spot'-típusú foltokat kiváltóknak a *P. teres* Drechs. f. *maculata* Smeg.-Pet. nevet adta.

A *P. graminea* és *P. teres* mind morfológiai, mind pedig genetikai értelemben nagyon hasonló. Hagyományos úton csak a tipikus tünetek alapján lehet határozottan elkülöníteni őket egymástól.

A legújabb kutatási eredmények azt sejtetik, hogy jelenlegi, morfológiai alapokon nyugvó rendszertani besorolásuk nem tükrözi valós filogenetikai kapcsolatukat. Taxonómiai besorolásukat illetően az első kétségek akkor keletkeztek, amikor stabil és termékeny interspecifikus hibridet hoztak létre közöttük laboratóriumi keresztezésekben, jelezve a két faj szoros genetikai rokonságát (SMEDEGÅRD-PETERSEN 1983). A gombák fajsztű azonosítására alkalmazott egyik genomszakasz, a sejtmagi riboszomális DNS ITS-régió szekvenciaelemzése alapján nem tudták egyértelműen elkülöníteni az árpát fertőző *Pyrenophora* fajokat egymástól (STEVENS et al. 1998).

A kórokozók fennmaradásuk érdekében folyamatosan próbálnak alkalmazkodni adott környezet és gazdanövények által kínált feltételekhez. Általánosan igaz, hogy minél nagyobb egy patogén genetikai változatossága, annál jobban képes adaptálódni, például új patotípusok, a korábbiaknál agresszívabb vagy a fungicidekkel szemben ellenállóbb törzsek alakulhatnak ki populációikban. Ezért fontos adott földrajzi/termesztési régiókban előforduló patogének genetikai változatosságának, populációszerkezetének tanulmányozása. A *P. graminea* és a *P. teres* is képes ivaros és ivartalanul is szaporodni, ezért a populációik genetikai szerkezete jelentősen függ e két szaporodási mód relatív gyakoriságától (SMEDEGÅRD-PETERSEN 1971, LIU et al. 2011). Heterotallikus gombák lévén, az ivaros szaporodásához, mely a genetikai változékonyság egyik jelentős forrása, mindkét párosodási típusuk (MAT1 és MAT2) jelenléte szükséges. Ahhoz tehát, hogy képet alkossunk eme kórokozók adott populációinak hajlamáról a változékonyságra, ismernünk kell genetikai szerkezetüket és a párosodási típusok előfordulását bennük. Mindez segíthet a populációban zajló folyamatok megértésében és közvetett módon a kórokozók elleni védekezésben (SOMMERHALDER et al. 2006). Hazai vonatkozásban ilyen adatok nem voltak munkánk kezdetéig.

A fentiek alapján célkitűzéseink a következők voltak:

- A *Pyrenophora graminea* és *P. teres* formák, valamint párosodási típusaik azonosítása, elterjedésük és gyakoriságuk vizsgálata árpán különböző magyarországi termőhelyeken.
- A hálózatos levélfoltosságot okozó *P. teres* f. *teres* genetikai változékonyságának, populációszerkezetének tanulmányozása hazánkban.
- A *P. graminea* és *P. teres* filogenetikai rokonságának vizsgálata többgénes szekvenciaelemzéssel.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Árpát fertőző *Pyrenophora* fajok

Az aszkuszos *Pyrenophora* fajok (anamorf: *Drechslera*) közé számos gazdaságilag jelentős növényi kórokozó tartozik, mint például a búza fahéjbarna foltosságát okozó *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler, az árpa levélcsíkoltságát okozó *P. graminea* Ito & Kurib., vagy a zab pirenofórási levélfoltosságát kiváltó *P. chaetomioides* Speg. A gazdasági káron kívül a nemzetség különböző tagjai konídiumaik és aszkospóráik révén allergiás reakciókat válthatnak ki embereknél és állatoknál egyaránt, valamint az emberi *phaeohyphomycosis* betegség egyik kiváltója (*D. spicifera* Bainier) is közéjük tartozik (KAPLAN et al. 1975). Ugyanakkor egyes fajok toxinokat és másodlagos metabolitokat termelnek, melyeket a gyógyszergyártásban használnak fel. Néhány faj mikroherbicidként alkalmazható, mint például a *P. seminiperda* (Brittleb. & Adam) Shoemaker, mely az USA-ban hatékonynak mutatkozott a *Bromus tectorum* L. ellen, mint biokontroll hatóanyag (MEYER et al. 2007). A *D. gigantea* (Heald. & Wolf) Ito pedig a *Setaria viridis* (L.) Beauv. és a *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. gyomnövények esetében bizonyult hatékonynak (PENG és BOYETCHKO 2006).

Jelenleg tizenhárom olyan *Pyrenophora/Drechslera* faj ismeretes (SIVANESAN 1987), melyek előfordulását világszerte közölték a *Hordeum* nemzetség tagjain. Elsősorban különböző levélfoltokat és egyéb levél-elváltozásokat okoznak, esetenként egyéb – nem a fűfélék családjába tartozó – gazdanövényeken is (**1. táblázat**).

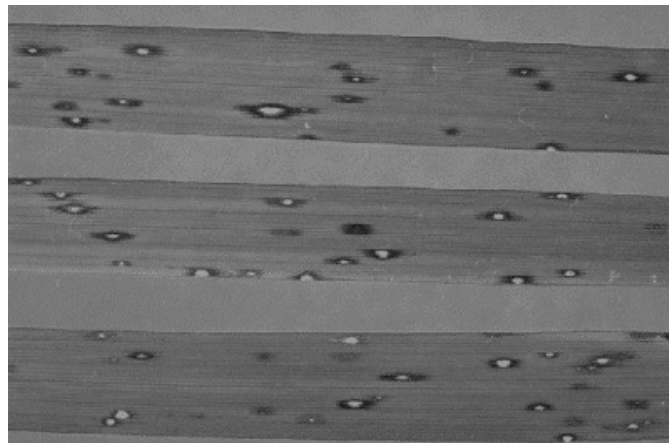
Ezek közül a termesztett árpán leggyakrabban a következő kórokozók találhatók meg:

A *D. wirreganensis* 1992-ben azonosították és írták le először Ausztráliában (WALLWORK et al. 1992). A kórokozó kétféle tünetet okoz árpán: foltosodást és pettyesedést (**1. ábra**). A foltok néha klorotikus szegéllyel körülvett, középbarna színű, hosszúkás ovális alakú elhalások, melyek árpa fajtától függően lehetnek kicsik, vagy a levél teljes szélességéig terjedőek. A foltok közepén a levél szövete nekrotizálódik és gyakran kilyukad. A petty-típusú tünetek apró sötétbarna pöttyökként jelentkeznek világosbarna középpel, és általában klorotikus szegély nélküliek. A levelek ez esetben is gyakran kilyukadnak a pettyek közepén. A *D. wirreganensis* petty-típusú tüneteire nagyon hasonlít a Dél-Ausztráliában általánosan előforduló *P. seminiperda* által kiváltott gyűrűs foltosodás, azzal a különbséggel, hogy utóbbi esetben a levéllemez nem lyukad ki. A *D. wirreganensis* eddig csak Ausztráliából jelentették, így nem kerül tárgyalásra a következő fejezetekben.



1. **ábra** *Drechslera wirreganensis* által kiváltott foltosodás és pettyesedés (Forrás: WALLWORK et al. 1992)

A *P. seminiperda* kicsi levélfoltokat (**2. ábra**) és magfertőzést okoz legalább 36 különböző egynyári és évelő fűféléen és különböző kétszikű fajokon. Toxinját (pirenofóra sav) mikroherbicidként alkalmazzák az USA-ban *Bromus tectorum* ellen (MEYER et al. 2007; MASI et al. 2014). A kórokozót 2008-ban azonosították Törökország ázsiai részén medúzafűről és Görögországban tarackbúzáról (STEWART 2009).



2. **ábra** Zabon megjelenő levéltünetek (*P. seminiperda*) (Forrás: <https://www.agric.wa.gov.au/oats/oats-leaf-diseases?page=0%2C4>)

A világ árpatermesztő régióiban, így Magyarországon is leggyakrabban a levélsíkoltságot okozó *P. graminea* és a levélfoltosságot okozó *P. teres* fordul elő, illetve bír fontos gazdasági jelentőséggel, ezért e kórokozókat tanulmányoztuk és ismertetjük részletesebben a következőkben.

1. táblázat Termesztett és vad árpaféléket fertőző *Pyrenophora/Drechslera* fajok (SIVANESAN 1987)

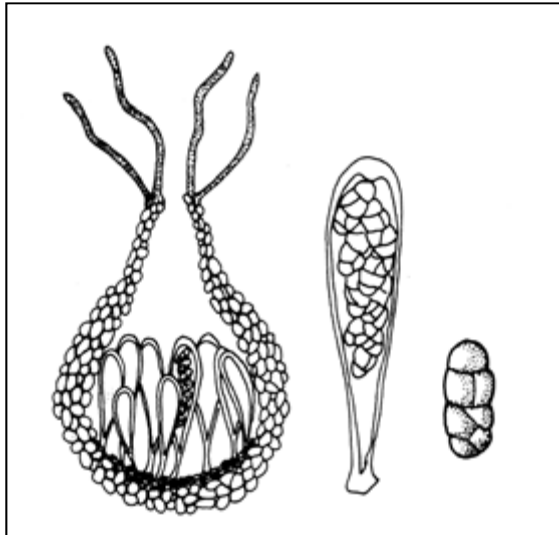
Teleomorf (ivaros) alak	Anamorf (ivartalan) alak	Elterjedés	Főbb gazdanövény(ek) ¹	Betegség és/vagy tünet neve
ismeretlen	<i>D. andersenii</i> Sharif ex Lam	Ausztrália, Európa, Amerika, Új-Zéland	angolperje , árpa	hálózatos levélfoltok <i>Lolium</i> fajokon
ismeretlen	<i>D. biseptata</i> (Sacc. & Roum.) Richardson & Fraser	Ausztrália, Európa, India, Új-Zéland, Észak-Amerika	árpa, hajfű, zab , ebír , búza , cirok , egércsenkesz, papaja, kukorica	levélfoltosodás
ismeretlen	<i>D. dematioidea</i> (Bubák & Wróbl.) Scharif	Európa, Észak-Amerika, Dél-Afrika, Új-Zéland	csenkesz, borjúpázsit , zab , ebír, tippán, perje , gyapjúfű, köles, komócsin, búza, nőszirm, borsó, árpa	levélfoltosodás fűféléken, virágpusztulás nőszirmon
ismeretlen	<i>D. triseptata</i> (Drechsler) Subram. & Jain	Új-Zéland, Európa, Kanada, USA, Ausztrália	zab, búza, rozs, perje , csenkesz, csomós ebír, árpa	szürke levél penész
ismeretlen	<i>D. wirreganensis</i> Wallwork, Lichon & Sivan.	Ausztrália	árpa , búza, egérárpa, rozs, angolperje	wirrega-foltosodás
<i>P. chaetomioides</i> Speg.	<i>D. avenacea</i> (Curtis ex Cooke) Shoemaker	világszerte	zab , árpa	vörös-barna levélfolt
<i>P. erythrospila</i> Paul	<i>D. erythrospila</i> (Drechsler) Shoemaker	Ausztrália, Európa, Új-Zéland, Japán, USA	cérna tippán , fehér tippán, árpa, búza	vörös levélfolt

<i>P. graminea</i> Ito & Kurib.	<i>D. graminea</i> (Rabenh. ex Schltldl.) Ito	világszerte	árpa , búza, rozs, zab. egyéb <i>Hordeum</i> spp.	levélsíkoltság
<i>P. lolii</i> Dovaston	<i>D. siccans</i> (Drechsler) Shoemaker	Ausztrália, Új-Zéland, Európa, Észak-Amerika	olaszperje, angolperje , árpa, búza, ebír, csenkesz, komócsin, rozs,	barna penész
<i>P. phaeocomes</i> (Rebent.) Fr.	<i>Drechslera</i> sp.	Európa, USA	nádtippán , ebír, perje, borjúpázsit, árpa	levélfoltosodás
<i>P. seminiperda</i> (Brittleb. & Adam) Shoemaker	<i>D. campanulata</i> (Lév.) Sutton	Ausztrália, Dél-Afrika, Argentína, Kanada, Egyiptom, Új-Zéland, Amerika, Görögország, Törökország	árpa , tarackbúza, zab , vadzab, búza , tollborzfü, pampafü, háromfogfü, medúzafü	gyűrűs foltosodás
<i>P. teres</i> Drechsler	<i>D. teres</i> (Sacc.) Shoemaker	világszerte	árpa , búza, zab, egyéb fűfélék, napraforgó	hálózatos levélfoltosság
<i>P. tritici-repentis</i> (Died.) Drechsler	<i>D. tritici-repentis</i> (Died.) Shoemaker	világszerte	tarackbúza, búza , árpa, vadzab, csenkesz	sárga vagy fahéjbarna levélfoltosság

¹ – félkövér betűtípussal kiemelve az adott kórokozó főbb gazdanövényei

3.1.1 A *Pyrenophora teres* f. *teres*, a *P. teres* f. *maculata* és a *P. graminea* taxonómiája és nevezéktana

A *Pyrenophora* Fr. nemzetség az *Ascomycota* törzshöz, *Pezizomycotina* altörzshöz, *Dothideomycetes* (*Loculoascomyces*) osztályhoz, *Pleosporales* rendbe és *Pleosporaceae* családkhoz tartozik. A *Pleosporales* rend tagjainál az aszkuszok együregű pszeudotéciumban (**3. ábra**) helyezkednek el, a termőtestben a parenhima feloldódása után a csúcsról hifák, úgynevezett pszeudoparafizisek nőnek a termőtest alapjáig, ezek mentén jönnek létre az aszkuszok. Az aszkospórák általában barnás színűek, haránt-, és hosszirányú falakkal tagoltak (DONG et al. 1998; KIRK et al. 2001).



3. ábra A pirenofóra nemzetségre jellemző pszeudotécium, aszkusz és aszkospóra (Forrás: FOLK és GLITS 1993)

A *Pyrenophora* fajokat morfológiailag a pszeudoparafizisek hiánya jellemzi, melyek jelen vannak a *Pleosporaceae* család többi tagjánál. A *Pyrenophora* nagyon közeli rokona a *Cochliobolus* és a *Setosphaeria* nemzetségeknek. A három nemzetség ivaros alakját viszonylag könnyű egymástól elkülöníteni morfológiai bélyegek alapján, mint például az aszkospóra alakja, színe és a harántfalak száma (ALCORN 1988). Ivartalan alakjuk a *Drechslera* Ito nemzetséghez tartozik, melynek jellemzője, hogy tenyészetben a micélium rendszerint sötét színű vagy szürke. Néhány faj légmicéliumot és sárga, rózsaszín vagy barna pigmentet képez az agarban. A konídiumtartók egyszerűek, néha elágazóak, hengeresek, egyesek térdesen megtörők. A konídiumképző nóduszok legtöbbször simák. A konídiumképző pórusok körül sötét foltok láthatók. A konídiumok általában hengeresek, egyenesek, álharántfalaik száma változó, minden sejtje képes

csírázni, s a bazális csíratömlő többnyire az alapi sejt oldalán ered és a konídium hossz tengelyével majdnem derékszöget zár be. A hilum a lekerekített alapi sejtből nem türemkedik ki (**4. ábra**). A gomba ritkán sporulál agaros tenyészetben.



4. ábra A *P. teres* f. *teres* konídiuma és az alapi sejtjén található hilum. Mérőskála: 10 µm
(Fotó: Ficsor Anita)

A *Pyrenophora teres* Drechsler ivaros (perfekt) alakját Drechsler írta le először 1923-ban (szinonim neve: *Pleospora teres* Died.). Ivartalan (imperpekt) alakja a *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker (szinonim neve: *Helminthosporium teres* Sacc. és *Helminthosporium hordei* Eidam), melyet az 1950-es évek végéig *Helminthosporium teres*ként ismertek, majd átsorolták az újonnan leírt *Drechslera* nemzetségbe a konídiumok egyedi morfológiája és a konídiumképzés jellegzetességei miatt (SHOEMAKER 1959). A *P. teres* azután két formába (nem filogenetikai kategória, rövidítve: f.) sorolta SMEDEGÅRD-PETERSEN (1971) az árpan okozott kétféle tünettípus, a két eltérő tünettípusról származó izolátumok sikeres laboratóriumi párosítása és morfológiai azonossága alapján. A klasszikus hálózatos tüneteket kiváltóknak a *P. teres* Drechs. f. *teres* Smed.-Pet. (PTT), míg az ovális levélfoltokat okozóknak a *P. teres* Drechs. f. *maculata* Smed.-Pet. (PTM) nevet adta. A két tünettípust kiváltó izolátumokat korábban McDONALD (1967) is sikerrel párosította tenyészetben, de következtetése szerint az ovális foltokat kiváltó kórokozó a hálózatosnak egy mutáns törzse lehetett.

Egy a *P. teres*hez morfológiailag hasonló, de az akkori ismeretek szerint azzal ellentétben másodlagos konídiumokat képező és az árpaleveleken változatos alakú, méretű, gyakran klorotikus udvarral körülvett nektrózisokat okozó gombának ITO és KURIBAYASHI (1931) a *Pyrenophora japonica* Ito & Kurib. (konídiumos alak: *D. tuberosa* (Atk.) Shoemaker) nevet adta. SIVANESAN (1987) az egyszikű növényeken előforduló *Pyrenophora/Drechslera* és azok közelrokon nemzetségeiről íródott tanulmányában még fenntartotta a *P. japonica* önálló faji státuszát, azonban CROUS és munkatársai (1995) egy *P. japonica* izolátum és a *P. teres* f. *maculata* típusizolátuma közötti 93%-ban hasonló teljes genomi DNS RFLP-mintázat, valamint a két kórokozó hasonló morfológiája és tünetei alapján a *P. japonicát* a *P. teres* szinonimjának tekintette. Hasonló következtetésre jutottak LOUW és munkatársai (1994) is ugyanezzel a módszerrel vizsgálva a két kórokozó konídiumokból és/vagy aszkospórákból indított izolátumait. E kórokozók azonosítását, illetve nevezékτανát tovább bonyolította a *Pyrenophora hordei* Wallwork, Lichon & Sivan. leírása árpáról Ausztráliában (WALLWORK et al. 1992). Eme új faj konídiumai keskenyebbek és valamivel kisebbek voltak a *P. teres* vagy a *P. japonica* konídiumainál (SIVANESAN 1987). Különbséget találtak az aszkusok méreteiben is, melyek szintén kisebbek és keskenyebbek voltak a *P. teres* termőtesteinél. A *P. hordei* aszkospóráinak 3–5 keresztirányú szeptája volt, míg a *P. teres*nek 3–4, a *P. japonicának* pedig 3. Az aszkospóra mérete is kisebb volt a *P. hordei* esetében (SIVANESAN 1987). Később azonban CAMPBELL és munkatársai (1999) AFLP- és RAPD-módszereket alkalmazva megállapították, hogy a korábban *P. japonicának* és *P. hordeinek* vélt izolátumok valójában *P. teres* f. *maculata* voltak.

Napjainkra a *P. teres* nevezékτανa letisztult, s a Smedegård-Petersen-féle elvet követi, azaz a hálózatos tüneteket okozó izolátumokat „f. *teres*”-nek, míg az ovális levélfoltokat okozó izolátumokat „f. *maculata*”-nak nevezik.

A levélsíkoltságot okozó gomba ivaros alakja a *Pyrenophora graminea* Ito & Kurib. (PG) (szinonim neve: *Pleospora graminea* Died.) (ITO 1930). Ivartalan alakja a *Drechslera graminea* (Rabenh. ex Schltdl.) Ito., melynek több szinonim neve is van: *Helminthosporium gramineum* Rabenh. ex Schltdl., *Brachysporium gracile* (Wallr.) Sacc. var. *gramineum* (Rabenh. ex Schltdl.) Sacc., valamint a *Napicladium hordei* Rostrup. RABENHORST a németországi Poppelsdorfban árpalevélről izolált egy gombát, melyet 1856 júniusában *Helminthosporium gramineum*ként írt le. Az új fajt a *H. gracile* Wallr. rokonaként határozta meg, de ennek spórái különállóak, nyújtott henger alakúak voltak és 3–6 szeptával rendelkeztek. 1886-ban ERIKSSON egy svédországi izolátumot a *H. gramineum* (Rab.) Erikss. fajba sorolt be. 1888-ban pedig ROSTRUP a Dánia egyes régióiban előforduló árpa kórokozót a *Napicladium* nemzetségbe tartozó új fajként írta le *N. hordei* néven. Végül 1923-ban Drechsler összegezte a korábbi tanulmányokat és megállapította, hogy

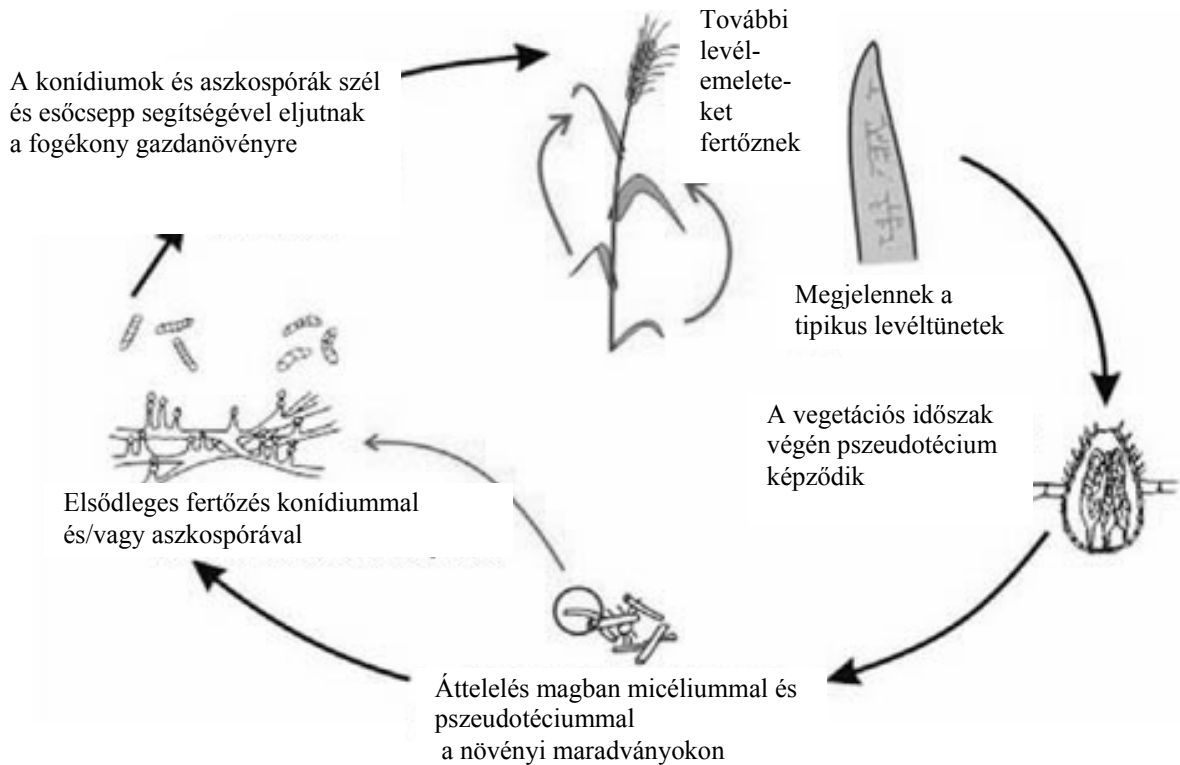
Rabenhorst által publikált faj és leírás pontos képet ad a *Drechslera graminea*-ról, továbbá a *N. hordeit* szinonimként említi.

DIEDICKE 1903-ban Németországban fedezte fel a *H. gramineum* ivaros alakját, mely egyezést mutatott a *Pyrenophora trichostoma* (fr.) Winter fajjal. HARA (1925) egy árpáról származó izolátumot *P. trichostoma* (FR.) Sacc. fajba tartozóként azonosított, az askospórák mérete viszont 44–55 x 18–21 µm volt, mely leginkább a *P. teres* askospóráinak méretéhez hasonlított. A *H. gramineum* ivaros alakjáról később NOACK (1905) és PAXTON (1922) is beszámolt. A *Helminthosporium* nemzetség fajainak összehasonlító vizsgálatai, az askospórák jellemzői és a konídiumok vizsgálata alapján DRECHSLER (1923) és NISHIKADO (1925) viszont arra a következtetésre jutottak, hogy a NOACK és munkatársai (1905) által leírt gombafaj valójában a *Pyrenophora teres*. Végül ITO és KURIBAYASI (1931) írta le az azóta is használatos *Pyrenophora graminea* névkombinációt.

3.1.2 A *Pyrenophora teres* f. *teres*, a *P. teres* f. *maculata* és a *P. graminea* biológiája és életciklusa

A *Pyrenophora teres* két formájának életciklusa (5. ábra) szinte azonos, kivéve, hogy a *P. teres* f. *teres* fertőzött szemeken is képes áttelelni, míg a *P. teres* f. *maculata* esetében ezt eddig nem tapasztalták (LOUW et al. 1996; LEIŠOVA et al. 2005a). Ezért a következő leírás mindkét foltosodást okozó gombára értendő kivéve, hogy a maggal terjedő szakasz csak a PTT esetében ismert. A gomba az egyik fertőzési ciklustól a másikig az árpa szemeken micéliumos formában, vagy a fertőzött növényi maradványokon pszeudotéciumokkal marad fenn. Konídiumok is képződhetnek a fertőzött szármaradvány szövetein. A talajba kerülve a gomba 2 évig megőrzi a fertőzőképességét. A teljes életciklus az ivaros szaporodással valósul meg, amely a szalmatörmelékeken és a levéldarabokon történik (JORDAN 1981). Az ivaros szaporodás alatt a *P. teres* a pszeudotéciumon belül kettős falú tömlő alakú képleteket, askuszkokat hoz létre (ERIKSSON 2005). Az ivaros szaporodáshoz két különböző párosodási típusú izolátum egyesülése szükséges, mivel a *P. teres* heterotallikus (McDONALD 1963). Egy pszeudotécium különböző mennyiségű askuszt tartalmaz, de minden egyes askusz 8–8 askospórárt rejt magában. Az askospóra az elsődleges fertőzőforrás és kb. 35 cm-ig kilövődnek a levegőbe, vagy esőcseppek segítségével szóródnak szét és indítják el a kezdeti levélfertőzéseket (DEADMAN és COOKE 1989). Az askospórák fertőzés feltétele a nedvesség és magas 95–100%-os relatív páratartalom. Az askospórák csírázni kezdenek és appressóriumot képeznek, amelyek áthatolnak az epidermisz sejtfalán és intracelluláris vezikulumot hoznak létre. Ez a folyamat hőmérséklettől függően hosszabb-rövidebb ideig is eltarthat, 10°C-on 6 óráig, míg 25°C-on csak egy óráig. Az elsődleges behatolás után a gomba az epidermális sejtrétegben nő tovább (HARGREAVES és KEON 1983).

Alternatív gazdanövények (pl. egérárpa, búza, zab, *Agropyron* spp., *Bromus* spp., *Elymus* spp., *Hordelymus* spp., *Stripa* spp. és egyéb *Hordeum* spp.) jelentősége az áttelelés és kezdeti inokulum mennyiség szempontjából részletesen nem ismert, de ahol gyomirtást végeznek, ott valószínűleg nincs számottevő szerepük (JORDAN és ALLEN 1984).

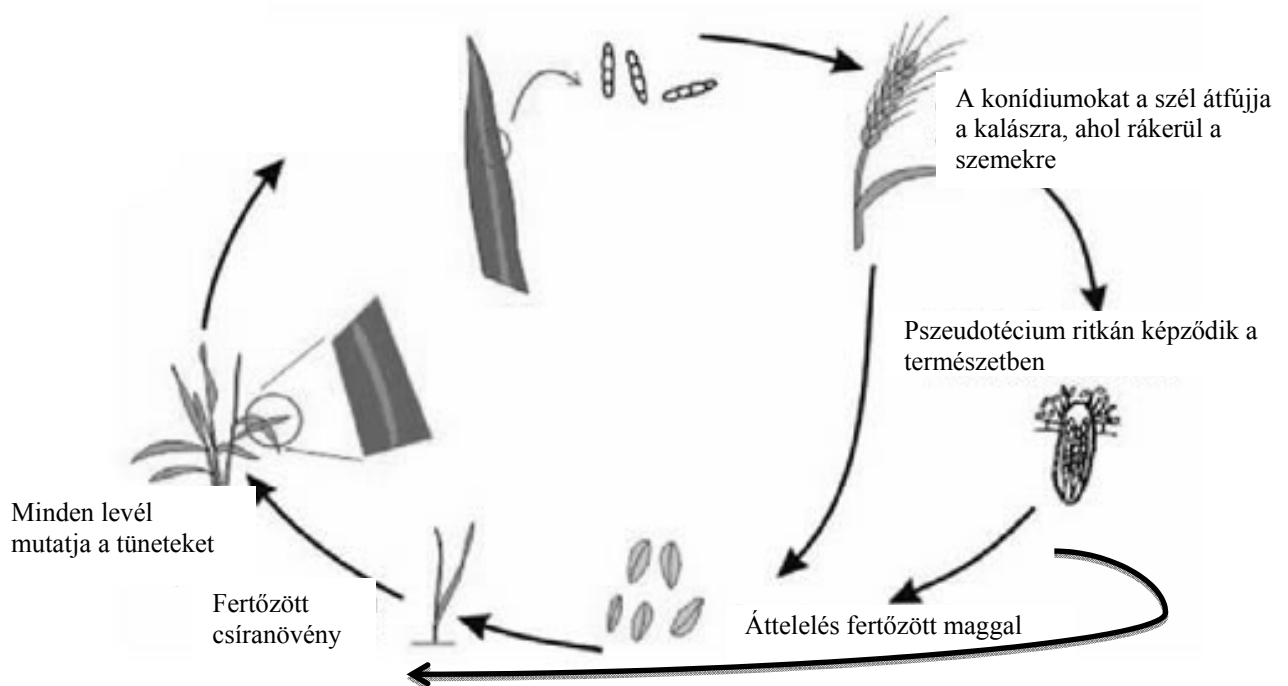


5. ábra A *P. teres* f. *teres* életciklusa (Forrás: <http://cereals.ahdb.org.uk/cereal-disease-encyclopedia/diseases/net-blotch.aspx>)

A vegetációs időszakban a megfertőzött árpaleveleken képződő konídiumok a szél és az esőcseppek segítségével szóródnak szét a felsőbb levelekre és a környező területeken lévő gazdanövényekre (másodlagos fertőzés). A primér fertőzési göcből a gomba konídiumai kb. 7 méter távolságra képesek széllel terjedni (FISCHL 1991), de kedvező körülmények között akár 10–200 km-re is eljutnak (De WOLF et al. 1998). A konídiumképzéshez nedvesség, magas relatív páratartalom (95–100%), megfelelő hőmérséklet (6–25°C) és fogékony növényi szövet szükséges (VAN DEN BERG és ROSSNAGEL 1991). Járványos megbetegedések hűvösebb, nyirkosabb időjárás esetén alakulnak ki. Az agrotechnikai beavatkozások közül a fokozott nitrogén-ellátás hatására a fertőzések erősödnek, de a foszfor és vas is befolyásolja a betegség súlyosbodását (FISCHL 1991).

A *P. graminea* életciklusa (6. ábra) több téren is eltér a *P. teres*-ekétől. A gomba ivartalan formában szintén fennmaradhat fertőzött növényi maradványokon, de viszonylag ritkán, illetve kis

számban képez ivaros termőtesteket a vegetációs periódus végén. Az ivaros alak szerepe az áttelelésben és a betegség terjesztésében ezért kisebb. A PG szintén heterotallikus. A gomba áttelelésében és fennmaradásában, a primér fertőzések kialakulásában a fertőzött árpaszemeknek van nagy jelentősége, mivel a kórokozó micéliuma jelen van a mag felszínén és a magháj alatt. Ahogy a koleoptil felszakad csírázáskor, a patogén behatol a szövetekbe, ahol szisztemikus életmódot folytat, felfelé terjed a növényben, folyamatosan behatol a fejlődő levelekbe, így idővel az összes levél mutatja a levélcsíkoltság jellegzetes tüneteit. Egészen a kalászig képes feljutni, amely gyakran beszorul a levélhüvelybe. A sporulációhoz és a fertőződéshez megfelelő nedvességszint és hőmérséklet szükséges. A tüneteket mutató levelek felületén konídiumok képződnek, melyeket a szél eljuttat a kalászkig, ahol az egészséges szemeket bármely érési szakaszban megfertőzheti. Azonban ezek a konídiumok újabb (másodlagos) levélfertőzést már nem indítanak el, vagyis a betegségnek csak egy ciklusa van egy vegetációban (MATHRE 1987).



6. ábra A *P. graminea* élelciklusa (forrás: <http://cereals.ahdb.org.uk/cereal-disease-encyclopedia/diseases/leaf-stripe.aspx>)

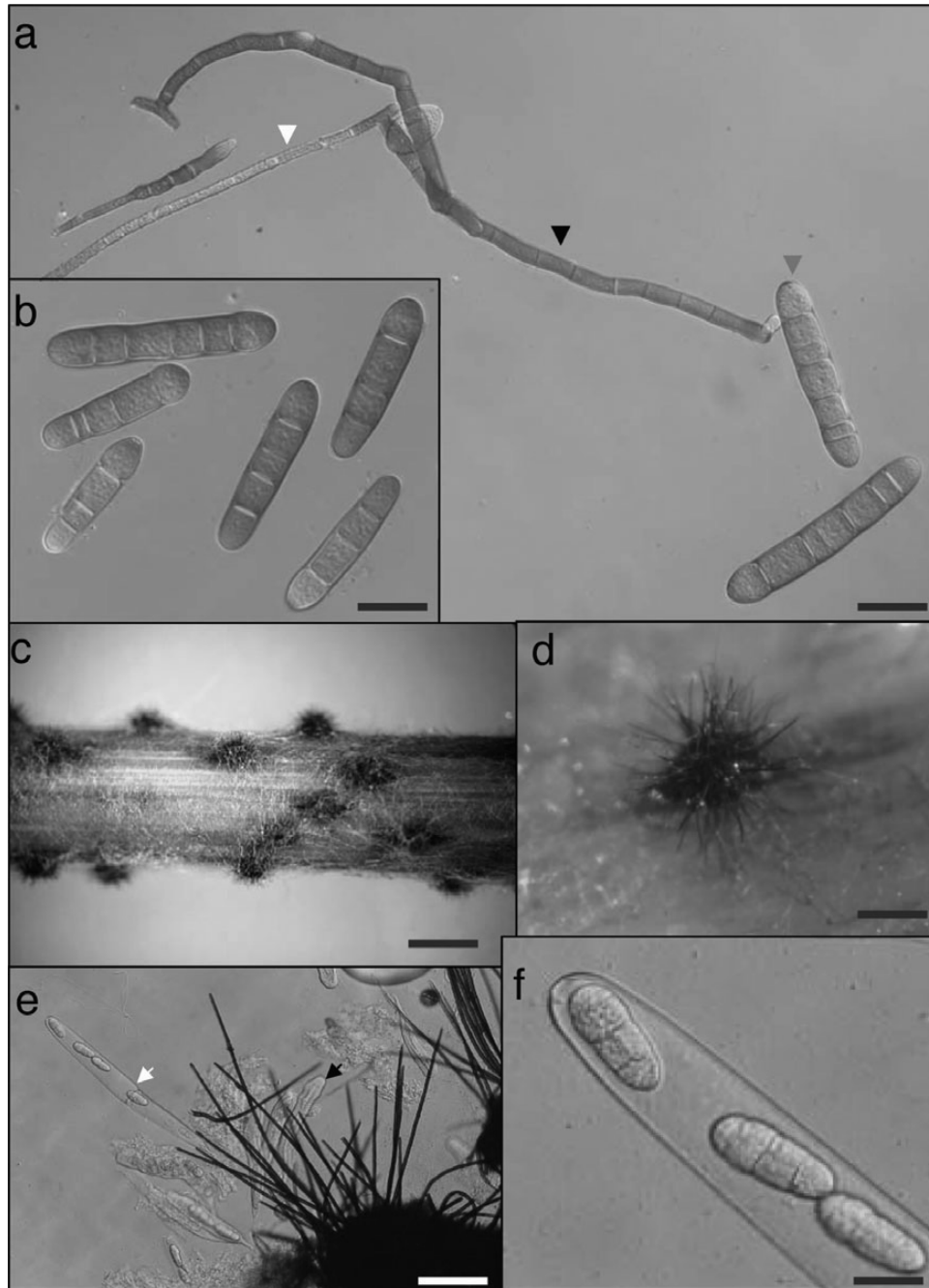
3.1.3 A *Pyrenophora teres* f. *teres*, a *P. teres* f. *maculata* és a *P. graminea* morfológiája

A *P. teres* növényi maradványokon képződő pseidotéciuma kissé megnyúlt gömbölyded, illetve palackra emlékeztető formájú, felületén sötét színű sertékkal (7. ábra). Kettősfalú aszkuszai

buzogány alakúak. A pszeudotéciumok különböző számú aszkuszkokat tartalmaznak, amelyekbe mindig 8–8 aszkospóra van. Az aszkospórák világosbarnák, három vagy négy harántfallal és egy vagy két hosszirányú fallal tagoltak (LIU et al. 2011). A hosszirányú fal mindig csak a középső sejtben található (MATHRE 1997, WEBSTER 1951). Az ivartalan alak konídiumtartói és konídiumai bőségesen képződnek és könnyen megfigyelhetők a fertőzött növényi szöveten és maradványokon (TEKAUZ 1990, JAYASENA et al. 2004). A konídiumok a konídiumtartók csúcsán képződnek, melyek egyenesek, vagy néha térdesen megtörtek, alapjuknál kissé duzzadtak és általában magányosan állnak, de lehetnek kettes vagy hármass csoportokban is. A konídiumtartók színe a közép-barnától az olíva-barnaig terjed. A konídiumok egyenesek, mindkét végükön lekerekítettek, szubhialintól a sárgásbarnaig változhat a színük és általában négy vagy hat álharántfallal rendelkeznek (MATHRE 1997, McLEAN et al. 2009). Bár nem gyakran fordul elő, hogy a *P. teres* képez piknídiumot és piknidiospórákat gazdanövényen és tenyészetben egyaránt, ezt SMEDEGÁRD-PETERSEN (1972) írta le először. A piknídium gömbölyű - körteforma alakú, színe a sárgától a barna színűig változhat, 64–172 μm átmérőjű, a benne termelődő piknidiospórák színe áttetsző, alakja gömbölyű vagy ovális, nem osztottak, méreteik $1,0\text{--}1,9 \mu\text{m} \times 1,4\text{--}3,2 \mu\text{m}$ közöttiek (MATHRE 1997). JORDAN (1981) szintén megfigyelte a piknídium fejlődését fertőzött szalmán, levéldarabon és magon.

A *Pyrenophora graminea* ivaros termőteste általában ritkán képződik a természetben, ősszel találhatjuk meg az árpa szalmán (MATHRE 1987). Pszeudotéciuma a növény felszínén vagy kissé beágyazódva képződik, s a *P. teres*hez hasonló serteszőrökkel rendelkezik, melyek gyakran konídiumokat viselnek magukon. Az aszkuszkok buzogány vagy henger alakúak, kettősfalúak, a végein lekerekítettek rövid szárral az alapi résznél. Az aszkospórák világossárga vagy barna színűek, ellipszis alakúak, mindkét végükön lekerekítettek, három keresztirányú és egy (ritkán kettő) hosszanti fallal tagoltak, mely mindig a középső sejtben található (ábra).

A PG konídiumai hengerek, hosszúkásak, enyhén elliptikusak, többnyire egyenesek. Legszélesebb pontjuk legtöbbször az alapi részen van, és csúcsirányba keskenyednek. Színe szubhialin vagy sárgásbarna. Csúcsai lekerekítettek. Jellemző a másodlagos tartók és konídiumok képzése, mind az alapi mind a csúcsi sejtekből. Az álharántfalak száma 1–7 között változik. A hílum sötét. A konídiumtartók hármass-ötös csoportokban képződnek, egyenesek, vagy hajlítottak, hengerek az alapnál kiszélesedők. Színük világos, sárgás, vagy sötétbarna. A PG esetében is megfigyelték a piknídium képződést, de szintén ritkán fordul elő a természetben. A piknídium (70–176 μm átmérőjű) gömbölyű, vagy körteformájú, a növényi felületen vagy részben abba besüllyedve fejlődik. A piknidiospórák ($1,4\text{--}3,2 \times 1,0\text{--}1,6 \mu\text{m}$) gömbölyűek vagy ellipszis alakúak, hialinok és nem osztottak. Szerepük az életciklusban nem tisztázott (MATHRE 1987).



7. ábra A *Pyrenophora teres* f. *maculata* ivaros és ivartalan képletei: a) konídiumtartó; b) konídiumok; c) árpaszalmán látható pszeudotéciumok; d) pszeudotécium serteszőrökkel; e) felnyíló pszeudotéciumból kiáramló aszkuszok; f) aszkospórák (Forrás: LIU et al. 2011)

Amint látható a **2. táblázat** adataiból, nagyon nagy a hasonlóság a három kórokozó fontosabb képleteinek morfológiája között és a méreteik is jelentős mértékben átfednek.

2. táblázat A *Pyrenophora teres* f. *teres*, a *P. teres* f. *maculata* és a *P. graminea* főbb ivaros és ivartalan képleteinek összehasonlító táblázata a fontosabb jellemzőik alapján

		<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>	<i>Pyrenophora graminea</i>
pszeudotécium	mérete (µm)	1000–2000 ⁱ 200–450×300–800 ^f 300–600×430–800 ^g 200–400×300–700 ^h	1000–2000 ⁱ	576–728×442–572 ^a 350–850×450–800 ^{f,g} 442–572×576–728 ^h
	alakja	gömbölyű, serteszőrökkel	gömbölyű, serteszőrökkel	ovális, serteszőrökkel
aszkus	mérete (µm)	30–61×180–274 ^a 30–36×220–250 ^d 32–60×175–275 ^f 32–42×190–335 ^g 38–61×180–274 ^h	35–45×225–400 ^f	28–45×280–425 ^f 32–50×225–425 ^g 35–70×190–300 ^h
	alakja	tömlő, vagy buzogány		buzogány, henger
aszkospora	mérete (µm)	18–28×43–61 ^{a,h} 18–22×52–60 ^d 14–28×36–65 ^f 17,5–27,5×40–62,5 ^g	17,5–30×40–65 ^f	43–61×18–28 ^a 45–78×20–33 ^f 20–32,5×45–75 ^g 19–33×45–70 ^h
	színe	világosbarna	világos sárgás-barna	világos sárgás-barna
	harántfalak száma	3–4 keresztfal- és 0–2 hosszirányú ^f	3 keresztfal- és 0–2 hosszirányú ^f	3 keresztfal- és 1 hosszirányú 2 keresztfal és 0–1 hosszirányú ^f
konídium	mérete (µm)	30–174×15–23 ^a 76–145×17–23 ^b 30–175×15–22 ^d 70–160×16–23 ^{e,f} 48–140×15–22,5 ^g 47–138×13–16 ^h	50–210×12–27 ^b 12–27×50–100 ^c 12–17×48–110 ^d 12–25×45–210 ^f	11–24×30–110 ^a 12–23×40–112 ^b max. 105×20 ^d 14–22×40–105 ^e 12–23×27–110 ^f 15–22,5×35–105 ^g
	alakja	hengeres, végei lekerekítettek, csúcs irányba kissé keskenyedek		
	színe	szubhialin – sárga		szubhialin – sárgás-barna
	harántfalak száma	4–6 ^b 1–11 ^c 1–10 ^{d,e} 3–9 ^f	(3)4–6(9) ^{b,f} 4–7 ^c 2–6 ^d	max. 7 ^a (3)4–5(6) ^b 1–7 ^{c,d,e,f}
	alapi sejt mérete (µm)	18–20×17–19 ^b	15–23×12–18 ^b	12–16×14–18 ^b

a: MATHRE (1987); b: SHOEMAKER (1962); c: LUTTRELL (1951); d: DRECHSLER (1923); e: ELLIS (1971); f: SIVANESAN (1987); g: ITO és KURIBAYASHI (1931); h: SMEDEGÅRD-PETERSEN (1972); i: LIU (2011)

3.1.4 A vizsgált *Pyrenophora* fajok által okozott betegségek tünetei

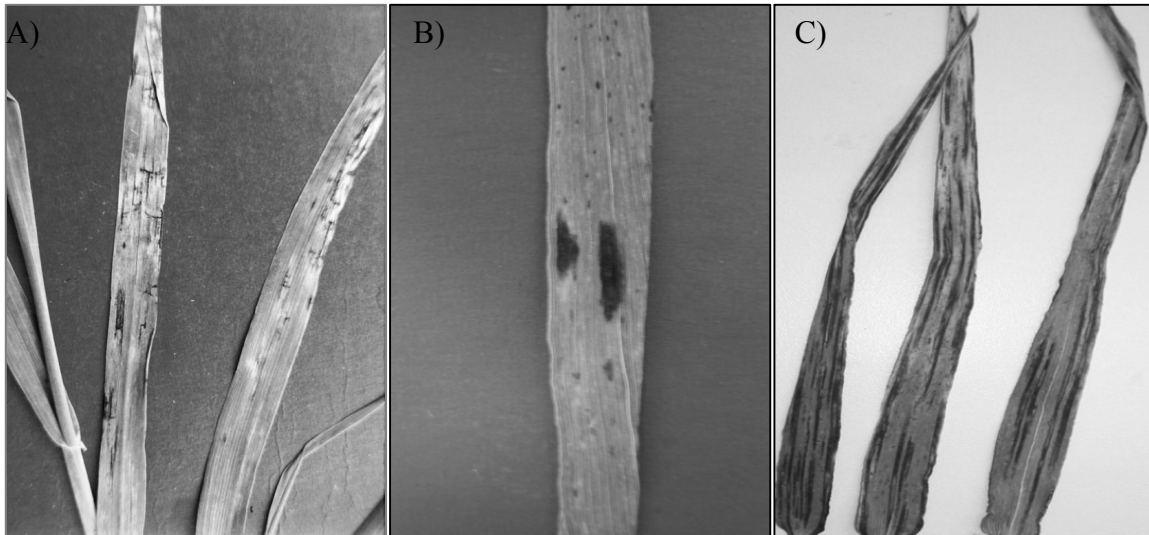
A *P. teres* képes megfertőzni és megbetegíteni a gazdanövény levelét, levélnyelét, szárát és termését egyaránt. A szemfertőzés a kórokozó nagyobb távolságokra történő terjedésében különösen fontos szerepet tölt be, legnagyobb gazdasági jelentőséggel mégis a leveleken kialakult tünetek bírnak, és leginkább ezek alapján lehet meghatározni hagyományos módon a betegséget, illetve kórokozóját. A tünetek erőssége, a léziók mérete és a nekrosis és klorózis kifejeződése nagymértékben függ a gazdanövény fajtájától, a kórokozó virulenciájától és a környezeti feltételektől (LIU et al. 2011).

A *P. teres* f. *teres* okozta hálózatos levélfoltosság tünetét elsőként ATANASOFF és JOHNSON (1920) írták le és használták ezután a betegség nevéként. A kórokozó a levél felületén hatol be és 24 órán belül kicsi kör vagy ovális pontszerű sérüléseket lehet látni a behatolás helyén. Ez hamarosan tovább nő a levélerek mentén, és végül egy sötétbarna folt látható hosszanti és keresztirányú vonalakkal, ami adja a hálószerű mintát (**8a. ábra**). Nagyon ellenálló fajták esetében a pontszerű sérülések csak önmagukban vannak jelen, a hálózatos folt nem fejlődik ki. Fogékony reakciók esetében azonban sötétbarna foltok, illetve a hálózatos nekrosisok körül megfigyelhetünk klorotikus, vagy vizesedő (water-soaked) területeket. Erős fertőzés esetén a teljes levél elszárad, elhal (MATHRE 1997).

SMEDEGÅRD-PETERSEN (1971) javasolta a *P. teres* fajt további két faj alatti csoportba (forma) elkülöníteni tünetek alapján, vagyis a hálózatos tüneteket kiváltókat *P. teres* f. *teres*, míg az úgynevezett 'spot'-típusú oválishoz hasonló, hálózatos mintázat nélküli foltokat okozókat a *P. teres* f. *maculata* taxonba helyezte. Utóbbi foltosodás esetén 3 mm × 6 mm nagygú sötétbarna, kissé ovális vagy kör alakú foltokat láthatunk különböző szélességű klorotikus gyűrűvel körülvéve (McLEAN et al. 2009) (**8b. ábra**). Alacsonyabb virulenciájú izolátumok kisebb nekrotikus foltokat okoznak klorotikus gyűrű nélkül. A PTM okozta foltosodás tünetét gyakran összekeverik a *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur okozta árpa barna levélfoltosságával, de a konídiumok vizsgálatával a két kórokozó elkülöníthető (MATHRE 1997; McLEAN et al. 2009)

A levélcsíkoltság okozója, a *P. graminea* maggal terjed, nem képes sikeresen megfertőzni árpa leveleket közvetlen behatolással, és a tünetek mindig a fertőzött magokból eredő szisztemikus fertőzés megnyilvánulásai. A vetőmag fertőzöttsége miatt már korán megjelennek a tünetek 2–3 leveles őszi árpa növényeken. Ezt megelőzően előfordulhat csíranövénypusztulás is. Az életben maradt fertőzött növények többé-kevésbé visszamaradnak a növekedésben, alacsonyabbak, leveleiken egy vagy több hosszirányú klorotikus csík fejlődik párhuzamosan a levélerekkel, ami legtöbbször a levélalaptól terjed egészen a levélcúcsig (**8c. ábra**). Később a klorotikus csíkok barnulnak, szürkülnek, a szövetek nekrotikussá válnak, és a levél felszakadhat és rongyossá válik.

Általában az összes vagy a legtöbb levél megfertőződik a szisztemikus fertőzés következtében. A zászlós levelek gyakran kivilágosodnak. Kalászolásakor a gomba behatol a kalászokba is, illetve a szemeket is fertőzi. Ezek vagy elpusztulnak, vagy a fertőzés hatására zsugorodnak és barnára színeződnek. E tünetek erőssége függ a növény ellenállóképességétől, a kórokozó virulenciájától és a környezeti feltételektől. Súlyos kalászfertőzéskor a kalászok üresek, halványak, felállóak, majd barnulnak.



8. ábra A hálózatos levélfoltosodás (A) az ovális folt (B) és a levélsíkoltság (C) tipikus tünetei (Fotó: Ficsor Anita)

A 2.1.3 fejezetben utaltunk arra, hogy a PG, PTM és PTT ivaros és ivartalan képleteinek alaktani és mérettani jellemzői nagyon hasonlóak, sok esetben átfedőek, illetve fajon belül is változnak (SMEDEGÅRD-PETERSEN 1983; GATTI et al. 1992), ami megnehezíti a patogének pontos meghatározását. A gyakorlatban a tipikus levéltünetek legtöbbször megkülönböztető jellegűek. A tünet-alapú meghatározás mégsem mindig pontos, mert a különböző gazdanövény genotípusok és a kórokozó faj, illetve patotípusainak interakciója hatással lehet a tünetek típusára (AFANASENKO et al. 1995), kialakulhatnak átmeneti, illetve átfedő szimptomák is, ezért általában kiegészítő laboratóriumi vizsgálatok szükségesek az említett három kórokozó azonosításához.

3.1.5 A vizsgált *Pyrenophora* fajok előfordulása és gazdasági jelentősége

A *P. teres* két formája világszerte előfordul, de nem egyenletes eloszlásban. Mindkét forma előfordulását jelezték a Cseh Köztársaságból (LEIŠOVA et al. 2005b), Olaszországból (RAU et al. 2003), Ausztráliából (WILLIAMS et al. 2001), Dél-Afrikából (SCOTT 1992), Kanadából (TEKAUZ és MILLS 1974; TEKAUZ 1990), Finnországból (MÄKELÄ 1972), Norvégiából (HANSEN és MAGNUS 1968) és az Amerikai Egyesült Államokból (BOCKELMAN et al. 1983).

A PTT előfordulása néhol visszaesett, és a PTM uralkodóvá vált például Dániában (JØRGENSEN et al. 2000), Ausztráliában (KHAN és TEKAUZ 1982), Kanadában (TEKAUZ 1990; VAN DEN BERG és ROSSNAGEL 1991) és Dél-Afrikában is (CAMPBELL et al. 1999).

A három kórokozó által előidézett betegségek mind mennyiségi, mind minőségi veszteséget idéznek elő a termés tekintetében, akár a csíranövény pusztulásával, akár a levéltünetekkel, melyek csökkentik az asszimilációs felületet, vagy a kalászfertőzés miatt kialakult torz, léha szemekkel. A *P. teres* f. *maculata* által előidézett termésveszteség nincs jól dokumentálva. A leginformatívabb jelentés Ausztráliából származik, ahol KHAN (1989), valamint JAYASENA és munkatársai (2007) kutatásai során kimutatták, hogy a PTM jelentősen csökkentette a termés mennyiségét és minőségét, amikor az időjárási körülmények kedveztek a járvány kialakulásának. A termés mennyiségi és minőségi romlásának erőssége összefüggésben volt a fajtával és a járvány erősségével. A legnagyobb terméskiesést Nyugat-Ausztráliából jelezték, ahol 44%-kal csökkent a termés mennyisége, ami összefüggésben volt a felső három levél 55%-os PTM-fertőzöttségével (JAYASENA et al. 2007). JAYANESA és munkatársai (2007) szintén kimutatták a termés fehérjetartalmának és ezerszemtömegének csökkenését is. KHAN (1989) korábbi tanulmányában, melyet Nyugat-Ausztrália más régiójában végzett, jelentős terméscsökkenést (több mint 22%) és az egyik terméskomponens romlását (több mint 7%-os ezerszemtömegcsökkenés) figyelte meg, mely kárt összefüggésbe lehetett hozni egy PTM-fertőzésre fogékony fajta termesztésével.

Hasonló megfigyelést tettek *Pyrenophora teres* f. *teres* esetében is angliai kísérletek során az 1970-es évek végén, amikor az erős levélfertőzés 22%-os hozamvesztéshez vezetett (JORDAN 1981). Ez elsődlegesen a kalásonkénti szemszám és az ezerszemtömeg csökkenésében jelentkezett (JORDAN 1981). ROBINSON (2000), valamint YOUSFI és EZZAHIRI (2002) által beállított kísérletekben a PTT-nek tulajdonított terméscsökkenés nagyon változatos volt és szoros összefüggésben volt az évjárással és a termesztett árpa fajtájával. A maximális terméskiesés 56% volt fogékony fajtákon.

A *P. teres* kártétele egykor jelentéktelen volt Magyarországon (UBRIZSY 1965), de az 1980-as évekre elsősorban a tavaszi árpa egyik legjelentősebb kórokozójává vált (CSERHÁTI et al. 1986; SDROVICH és VIOLA 1986; AUGUSZTA et al. 1988). Későbbi megfigyelések szerint is tavaszi árpában okozott jelentős károkat (20–30%-os terméskiesést), főleg csapadékos időjárás esetén, de őszi árpában sem volt ritka (PALÁGYI és TOMCSÁNYI 2006, TOMCSÁNYI et al. 2006). Különböző búzafajták levélfoltjain pedig CSŐSZ és munkatársai (2007), valamint TÓTH és munkatársai (2008) közölték a kórokozó előfordulását, azonban az okozott kár mértékéről nem áll rendelkezésre számszerű adat. A kórokozót a levélfoltok 0–9%-áról sikerült izolálni.

A *P. graminea* által okozott levélcsíkoság egy potenciálisan pusztító betegség világszerte. A betegség különösen krónikusan fordul elő az északi országokban (tavaszi vetésnél) és a

mediterrán őszi árpa régiókban, ahol a talaj hőmérséklete 12°C alá esik a mag csírázásakor, ami elősegíti a gyököcske megfertőződését. Bár a fungicides kezelések hatékonyan csökkentik a betegség előfordulását, a leghatékonyabb és környezetkímélőbb megoldást a rezisztens fajta előállítás adná.

A fertőzött növények kisebbek, kevesebb kalászt képeznek, melyekben kevesebb és rossz minőségű magot fejlesztenek, a növényenkénti szemtermés-mennyiség akár 89%-kal is csökkenhet (MATHUR et al. 1964). A hozam és a betegség között szoros összefüggést találtak Nyugat-Ausztráliában (LOUGHMAN és KHAN 1993). 12–29%-os hozamvesztésről számoltak be az USA-ban (SUNESON 1946; RICHARDSON et al. 1976; JOHNSTON et al. 1982). Indiában, a betegség gyakorisága 14% volt, ami 12%-os hozamvesztést eredményezett (MATHUR et al. 1964).

MAGNUS (1979) hároméves vizsgálatot végzett Norvégiában, és megállapította, hogy a hozamcsökkenés és a levélcsíkosság gyakorisága között évenként változó volt az összefüggés, de a teljes időszakra vonatkozóan a fertőzés gyakoriságának 1%-os növekedése 0,79%-os hozamvesztés-növekedéssel járt együtt. Görögországban a PG-fertőzés miatt 10–25 %-kal csökkent a gabona terméshozama egyes régiókban (SKORDA 1972). Csávázást követően azonban 11–70%-os hozamnövekedést tapasztaltak. A levélcsíkolttság előfordulásának felmérését végezték Skóciában és az Egyesült Királyságban és megállapították, hogy a betegség gyakorisága 1989-ben és 1990-ben nagyon magas volt, a minták 69 és 82%-a volt fertőzött, a fertőzés intenzitásapedig átlagosan 6,1–7,5% volt (COCKERELL et al. 1995). Algériában 1989 és 1992 között felméréseket végeztek gabonabetegségekről (SAYOUD és BENDIF 1995). A vizsgálatok során kiderült, hogy az árpa levélcsíkolttság előfordulási gyakorisága 60%-os volt, mely jelentős hozamvesztésekkel járt együtt. Egy marokkói felmérés szerint 1974–1975 között a vetőmagminták 47%-ában jelen volt a *P. graminea* az ország számos részén (LYAMANI és ROLLI 1979).

3.2 DNS-alapú molekuláris módszerek a növénypatogének genetikai variabilitásának vizsgálatára

A genetikai változatosság, genetikai diverzitás alatt szűkebb értelemben azt a változatosságot értjük, amely egy adott populáció vagy faj génkészletében, elkülöníthető génváltozatok (allélek) formájában adott lokuszokon kimutatható. A növénypatogén gombák genetikai változatosságának egyik fő forrása az ivaros szaporodás során bekövetkező rekombináció. Emellett a lehetséges okok között kell említeni a paraszexuális és mitotikus rekombinációt, a mutációt, de egyéb okok is szerepet játszhatnak (pl. kromoszómaátrendeződések és duplikációk).

Alapvetően két eltérő megközelítést használnak a növénypatogén gombák genetikai változékonyságának vizsgálatára: egyrészt a teljes gomba genom véletlenszerűen kiválasztott részeit, másrészt a konzervatív DNS-régiók, gének szekvenciáit vizsgálják (McCARTNEY et al. 2003). A véletlen primereket használó PCR-technikákat CAETANO-ANOLLÉS és munkatársai (1992) **MAAP**-nak (Multiple Arbitrary Amplification Profilig = többszörös tetszés szerinti amplifikációs profil) nevezték el. Ide tartoznak a RAPD és a rokon módszerek (AP-PCR, DAF és RAPD-DGGE). Különbség köztük az alkalmazott primerek hosszában, az amplifikáció körülményeiben, az elválasztás módjában és a felszaporított DNS-fragmentumok láthatóvá tételében van.

A mikroszatellitek (LITT és LUTY 1989) abba a repetitív szekvencia családba tartoznak, amelyben igen egyszerű, mono- (A)_n, di- (AT)_n, tri- (ATC)_n, tetra- (AGTC)_n, vagy pentanukleotidok (AGTCT)_n egymást követve ismétlődnek egy szakaszon. A mikroszatellitekre többféle elnevezés is létezik, legáltalánosabbak talán az **SSR** (Simple Sequences Repeat – egyszerű szekvencia ismétlődés) (JACOB et al. 1991) és **STR** (Short Tandem Repeat – rövid tandemismétlődés) (EDWARDS et al. 1991). A mikroszatelliteket az eddig vizsgált összes prokarióta és eukarióta genomból ki tudták mutatni (ZANE et al. 2002). Kódoló és nem kódoló régiókban egyaránt megtalálhatók. Jellemző rájuk a kodomináns öröklésment, környezeti hatásoktól függetlenek, génkölcsonhatások nem befolyásolják. Az eukarióta genomban mindenütt bőségesen jelen vannak, és méretben nagy polimorfizmust mutatnak az ismétlődő egységek számának változása következtében, ami főleg az úgynevezett „slipped-strand mispairing” DNS-replikációs hibának tulajdonítható. Előnyük, hogy a tandem elrendezésben ismétlődő szekvenciák előtt és után konzervatív DNS-szakaszok találhatóak, amelyekre primert tervezve a közöttük elhelyezkedő mikroszatellit-szekvencia felszaporítható.

A PCR-t alkalmazó vizsgálatok közül egyik az **AFLP** (Amplified Fragment Lenght Polymorphism), vagyis amplifikált fragmentumhossz-polimorfizmus, melyet ZABEAU és VOS (1993) szabadalmaztatott. Lényege, hogy összgenomi DNS-ből restriktációs endonukleázos hasítást követően ismeretlen szekvenciájú fragmentumokat amplifikálunk PCR-rel. Az AFLP-technikával egyszerre 20–100 fragmentum azonosítható, amelyek a RAPD-hoz hasonlóan legtöbbször domináns jellegűek. Az egyes fragmentumok a genom ismeretlen és rendszerint egymástól független lokuszait képviselik. Az AFLP ismételtetősége jó, előnye az is, hogy a különböző restriktációs enzimek és primerek nagy számban kombinálhatóak. A módszert elsősorban fajon belüli populációk jellemzésére alkalmazzák.

1994 óta elérhető módszer az **ISSR** (Inter Simple Sequences Repeat), mely a mikroszatellit-régiók közötti szakaszokat amplifikálja 16–18 bp hosszúságú primerpárt használva. A technika nem igényli a genomszekvencia előzetes ismeretét, multilokuszos és meglehetősen magas a polimorf

mintázatok aránya. Az ISSR egy PCR alapú módszer, mely képes elkülöníteni a közeli rokonságban álló egyedeket, egyesíti az AFLP- és az SSR-markerek előnyeit, és magában foglalja a RAPD univerzalitását is. A RAPD-technikával szemben az ISSR-primerek hosszabbak és mikroszatellit régiókra tervezik őket, ezért a primerek tapadási hőmérséklete magasabb, így az ISSR ismételhősége a RAPD-hoz képest magasabb. Az ISSR-t sikeresen alkalmazták a genetikai diverzitás kutatásában például a *Fusarium graminearum* (MISHRA et al. 2004), *Ustilago* spp. (MENZIES et al. 2003), és *Pyrenophora teres* (STATKEVIČIŪTĒ et al. 2010) esetében.

A továbbiakban a vizsgálataink során is alkalmazott módszerek kerülnek bemutatásra.

3.2.1 RAPD alapú módszerek

E módszer esetében az egyedek közötti polimorfizmust a véletlenszerűen amplifikált genomális DNS-fragmentumok különböző hossza adja. A **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) módszert WILLIAMS és munkatársai (1990), míg az **AP-PCR** (Arbitrarily Primed PCR) módszert WELSH és McCLELLAND (1990) használták először fajon belüli polimorfizmus kimutatására. Mindkét módszer egyszerű, gyors és olcsó, elsősorban az egy fajhoz tartozó, különböző izolátumok genetikai variabilitásának megállapításához alkalmazzák (COOKE et al. 1996; MAURER et al. 1998). Ezekkel a módszerekkel a genom ismeretlen DNS-szekvenciái szaporíthatók fel egyetlen random oligonukleotid primer felhasználásával. A RAPD-primerek rendszerint 10 nukleotid hosszúságú random szekvenciák. A RAPD-módszernél legtöbbször 36–40°C primer kapcsolódási hőmérsékletet állítanak be. Egy izolátumból legtöbbször 2–10 fragmentum amplifikálható, melyek mérete kb. 200 és 2000 bp közötti. A templát-DNS-ről akkor szintetizálhatók a fragmentumok, ha a primer kötőhelyei amplifikálható távolságban vannak egymástól, és az ellentétes DNS-szálon helyezkednek el. A kapott fragmentumokat rendszerint agarózgél-elektroforézissel választják el, és detektáláshoz a fragmentumokat DNS-t festő festékekkel festik. Az AP-PCR elve ugyanez, csak itt a primerek általában 20 (ÉRSEK és GÁBORJÁNYI (1998) szerint 12–34) nukleotidból állnak, a PCR-reakció pedig több ciklusos, mint a RAPD esetében.

Véletlen primerek használatakor az egyedek közötti polimorfizmust egyrészt a primer kötőhelyben levő DNS-szekvenciakülönbség, másrészt pedig az amplifikált régióban vagy a primer kapcsolódási helyén kialakuló deléció, inszerció vagy inverzió okozhatja (HESZKY és GALLI 2006). Minden primer a genom több pontjában szaporít fel diszkrét termékeket. Polimorfizmusról akkor van szó, ha a felszaporított lokuszok száma és/vagy mérete eltérő a vizsgált genomok között. A technika előnye, hogy nincs szükség a szekvencia előzetes ismeretére, valamint kis mennyiségű DNS-sel könnyen és gyorsan nyerhetünk nagy mennyiségű információt. Kivitelezésük egyszerű, kevéssé eszközigenyes. Hátrányai között megemlítendő az, hogy a RAPD-markerek többsége

domináns jellegű genetikai marker, illetve a szennyeződésekből eredő „szellem” sávok zavaróak lehetnek, valamint nem tesz különbséget az azonos méretű, de eltérő szekvenciájú RAPD-fragmentumok között.

A RAPD-elemzéseket gyakran alkalmazzák a különböző fitopatogén gombák jellemzése során, mint például a *Fusarium oxysporum* (**Hypocreales**) rasszok és 'forma specialis'-ok tanulmányozásakor (JESUS et al. 1995), a *Rhizoctonia solani* (**Cantharellales**) (DUNCAN et al. 1993), a *Puccinia striiformis* (**Uredinales**) (CHEN et al. 1993) izolátumok közötti változékonyság kimutatására.

Széles körben alkalmazzák a RAPD-elemzést *Pyrenophora* fajok esetében is a különböző populációk genetikai változékonyságának vizsgálatához (PEEVER és MILGROOM 1994, PELTONEN et al. 1996, JONSOON et al. 2000, CAMPBELL et al. 2002, BAKONYI et al. 2007), vagy specifikus primerek fejlesztéséhez (TAYLOR et al. 2001, WILLIAMS et al. 2001).

3.2.2 Szekvencia alapú módszerek

A tradicionális és molekuláris mikológiában több út is lehetséges az egyes gombafajok identifikálására, kezdve a morfológiai bélyegekkel, az élettani és biokémiai funkciókon át egészen a legmodernebbnek tekintett módszerig, a nukleinsav szekvenciák összehasonlító elemzéséig. Evolúciós célú szekvencia vizsgálatokban nagyon sok múlik a vizsgálni kívánt megfelelő DNS-szakasz kiválasztásán, ezért számos olyan tényező van, amelyet figyelembe kell venni (IRWIN és WILSON 1991):

- A DNS-régiókból általában olyan szakaszokat választanak ki, amelyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak maradhattak az evolúció során, ugyanakkor elegendő variábilis régiói legyenek a vizsgálni kívánt taxonok filogenetikai kapcsolatainak vizsgálatához.
- Az ideális DNS-régió egy példányban található a genomban, vagy ha több másolatban is előfordul, akkor a másolatoknak ugyanazon őstől kell származnia (pl. rDNS, mtDNS).
- A DNS-régióknak lehetőleg ugyanazt a funkciót kell betöltenie minden taxonban, hogy a régióban bekövetkező evolúciós változások ne legyenek kitéve a természetes szelekciós nyomásnak.

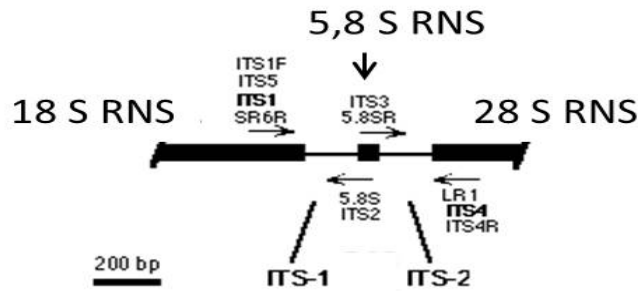
3.2.2.1 Riboszomális DNS ITS-régió

A fenti követelményeknek eleget téve a filogenetikai tanulmányokban az egyik leggyakrabban alkalmazott szekvencia a riboszomális RNS gének kódoló (rDNS) szakaszok, melyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak, ugyanakkor egyes

régiókban elegendő variabilitással rendelkeznek a különböző rokonsági kapcsolatok vizsgálatához. LUTZONI és munkatársai (2004) szerint a gombák körében végzett filogenetikai vizsgálatok 83,9%-a az rDNS-szekvenciák vizsgálatán alapult.

Az eukarióta riboszómát kódoló DNS tartalmazza az egyes alegységeket kódoló géneket, valamint a kódoló szakaszok közötti nem kódoló részeket, és a genomban tandem ismétlődő módon helyezkedik el. Az ismétlődések száma lehet néhány száz, vagy akár több tízezer (GIGLIANO 1999). Az alegységek többek között: 18S, 5,8S és 25-28S (**9. ábra**). Ezen alegységeket kódoló szakaszok között helyezkednek el az 5,8S rDNS-t közrefogó ITS-szakaszok, melynek teljes hossza igen változékony, gombáknál általában az 500–900 bp mérettartományba esik az univerzális primerekkel felszaporított ITS1–5.8S–ITS2 PCR-termék hossza. Mivel az ITS-szakaszok a transzkriptumból az RNS posztranszkripcionális érése során kivágódnak, azaz nem kódoló szakaszok, ezért mutációs rátájuk jóval magasabb a konzervatívabb alegységekéénél, fajok között rendszerint változékonyak, de viszont fajokon belül többnyire kevésbé polimorfak, éppen ezért fajok közötti összehasonlításra az ITS sokkal alkalmasabb, mint az rDNS kódoló alegységei. Mivel az alegységeket kódoló szakaszok konzervatívak, így ezekre univerzális és specifikus PCR primerek tervezhetőek, melyek által az ITS1–5.8S–ITS2 PCR-termék felszaporítható. Azonban szakirodalmi ellenpéldákat is lehet találni. Az rDNS-ITS szekvenciaanalízisével csak kis különbségeket tártak fel (1-től 4 nukleotidig) a kisspórás *Alternaria* (*Pleosporales*) fajok között (KUSABA és TSUGE 1995). A szerzők szerint ez az eredmény elégtelen volt ahhoz, hogy ezeket az *A. alternata*tól filogenetikailag különböző taxonként határozzák meg. Míg egy másik forrásmunkában PRYOR és GILBERTSON (2000) szerint az ITS-régió alkalmasnak bizonyult az *Alternaria* fajcsoportok és csoporton belüli rokon fajok elkülönítésére.

Előfordulnak olyan esetek is, ahol az ITS-szakasz önmagában nem alkalmas rokonsági viszonyok vizsgálatára, pl. közelrokon taxonok, fajkomplexek esetében, vagy ha egy egységesnek tartott faj példányai genetikailag eltérnek (kriptikus fajok), mint azt például KYTÖVUORI és munkatársai (2005) kimutatták a *Cortinarius* (*Agaricales*) minták feldolgozásakor. Napjainkban az rDNS-ITS azonban még mindig fontos molekuláris taxonómiai és filogenetikai marker, de megbízható filogenetikai elemzésekhez elengedhetetlen egyéb, a sejtházartásban szerepet játszó gének vizsgálata is. Az ilyen többgénés (multilokuszos) analízis során több gén szekvenciájából egyetlen vagy több úgynevezett „szuperszekvenciát” (multilocus dataset) készítenek, amely több ezer nukleotid hosszúságú is lehet, amivel a taxonok közötti különbséget jelentő filogenetikailag informatív karakterek száma jelentősen megnövelhető.



9. ábra A riboszomális RNS alegységei és a leggyakrabban használt primerek.

(Forrás: <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>).

Többgénes szekvenciákon alapuló kiemelkedő munkák például TANABE és munkatársainak (2004) dolgozata a járomspórás gombák (*Zygomycota*) területén (RPB1 és EF1- α), BINDER és HIBBETT (2002) négy génre (nucSSU, nucLSU, mitSSU, mitLSU) alapozott taxonómiai alpműve a *Homobasidiomycetes* osztályról, HOFSTETTER és munkatársai (2007) fehérje- és riboszomális gének (RPB1, RPB2, nucSSU, nucLSU, mitSSU) használhatóságát összevető cikke a zuzmóképző gombákról, vagy JAMES és munkatársai (2006) alapkőnek számító, 6 gént vizsgáló (nucLSU, nucSSU, 5,8S rRNS, RPB1, RPB2, EF1- α) publikációja. Fehérjét kódoló gének esetében az informatív karakterek száma meghaladhatja az RNS-t kódoló génekéit (FROSLEV et al. 2007), főleg a triplettek harmadik nukleotidjaiból adódó változékonyság okán.

3.2.2.2 Fehérjéket kódoló gének

A fehérjéket kódoló gének olyan gének, amelyek minden élőlényben előfordulnak és meglehetősen konzervatívak maradtak az evolúció során, így alkalmasak filogenetikai célú vizsgálatokhoz. Ezen gének közé tartoznak többek között a transzlációs elongációs faktor 1 α alegysége (*tefl α*) (BALDAUF és PALMER 1993, COX et al. 1995, WERY et al. 1996), az aktin fehérjéket kódoló gének (BALDAUF és PALMER 1993, FLETCHER et al. 1994), a β -tubulin fehérjék kódolásáért felelős gének (BALDAUF és PALMER 1993, EDLIND et al. 1996), valamint a glicerin-aldehid-3-foszfát fehérjéket kódoló gének (MARTIN et al. 1993).

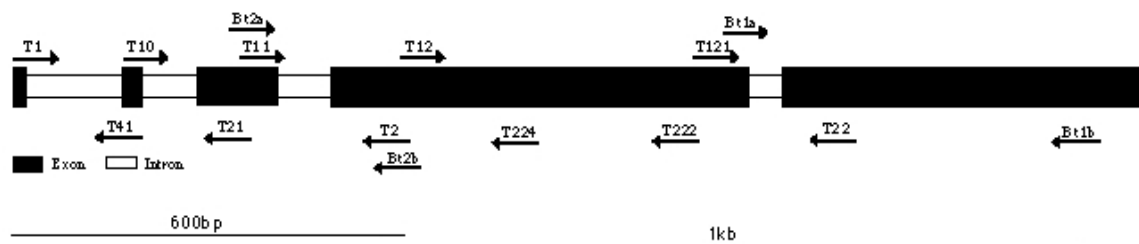
- **β -tubulin-gén**

Eukariotákban legnagyobb arányban az α (alfa)- és β (béta)-tubulin családba tartozó fehérjék építik fel a mikrotubulusokat, melyek közül különösen a β -tubulint kódoló gén (**10. ábra**) egyre

nagyobb figyelmet kap az evolúciós értelemben egymáshoz távol és közel lévő taxonok esetében a rokonsági kapcsolatok elemzése során (BALDAUF et al. 2000).

A legtöbb gomba faj csak egy β -tubulin gént tartalmaz, azonban néhány gomba (*Aspergillus nidulans* (**Eurotiales**) és *Colletotrichum graminicola* (**Glomerellales**)) génállományában két β -tubulin gént azonosítottak, melyek közül egyik azonos volt a rokon fajokéval, míg a másik ettől lényegesen eltérő volt. (MAY et al. 1987, PANACCIONE és HANAU 1990).

A növénykórokozó gombák körében O'DONNELL és munkatársai (1998) a *Giberella fujikuroi* (**Hypocreales**) fajkomplex elemzésére használták a génszakaszt. VOIGT és munkatársai (2005) a β -tubulin gént is alkalmazták a *Phoma lingam* (**Pleosporales**) teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans* - *L. biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára, IRINYI (2009) három filogenetikai markert (β -tubulin, tef1 és ITS) használt tizenegy *Phoma*-szerű gomba 24 izolátumának faji szintű rokonsági vizsgálatához.



10. ábra A β -tubulin gén szerkezete (fekete téglalap: exonok, fehér téglalap: intronok) és primerei (nyilakkal jelölve az indulási pontokat, rajta a primer nevével) (Forrás: <http://lutzonilab.org/beta-tubulin/>)

- **Aktin**

Széleskörű funkciói ellenére az aktin elsődleges szerkezete, az aminosavak sorrendje meglehetősen állandó az eukarióták közeli és egészen távoli filogenetikai csoportjaiban (HIGHTOWER és MEAGHER 1986), ami e fehérjét kódoló gént ideálissá teszi filogenetikai analízisekre, gyakran az rDNS-ITS és/vagy egyéb fehérjéket kódoló génekkel együtt alkalmazva (BHATTACHARYA et al. 1991; BALDAUF és PALMER 1993; DROUIN et al. 1995). A fonalas gombák haploid genomjában az aktin gén egy példányban fordul elő (BHATTACHARYA et al. 1991). Bizonyos esetekben az aktin génre alapozott filogenetikai fa az rDNS-fával azonos eredményt mutatott, pl. az állatvilág és gombák közötti rokonsági viszony ábrázolása esetében (BALDAUF és PALMER 1993; WAINRIGHT et al. 1993), míg máskor (pl. a nyálkagomba filogenetikai helyzete) ellentmondásban voltak egymással (BHATTACHARYA et al. 1991;

DROUIN et al. 1995). VOIGT és munkatársai (2005) többek között az aktin gént alkalmazták a *Leptosphaeria maculans* L. (*Pleosporales*) fajkomplexen belüli filogenetikai kapcsolatok többgének vizsgálatára. DANIEL és MEYER (2003) pedig az élesztőgombák meghatározásánál alkalmaztak aktin génszekvenciákat is, melyek jobb elkülönítő markernek bizonyultak az rDNS-hez képest. INDERBITZIN és munkatársai (2011) 5 új *Verticillium* faj azonosításához használta fel az aktin gén szekvenciákat, kiegészítve az rDNS-ITS, *gpd*, elongációs faktor és triptofán-szintetáz génekre kapott adataikat. PINTYE (2012) munkássága során szintén felhasználta ezt a gént, s megállapította, hogy a szőlőlisztharmatot parazitáló *Ampelomyces* gombák rDNS-ITS- és aktin-szekvenciájuk alapján eltérő törzsekbe tartoznak.

- **Glicerinaldehid–3–foszfát–dehidrogenáz**

A glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*gpd*) a fonalas gombák genomjában általában egy példányban található meg (PUNT et al. 1988), de néhány faj esetében kettő (HARMSSEN et al. 1992) vagy három kópia (WOLFF és ARNAU 2002) is előfordul, de nem feltétlenül íródik át mindegyik a transzkripció során (HARMSSEN et al. 1992; WOLFF és ARNAU 2002). SMITH (1989) szerint a gén megközelítően az rDNS-ITS-hez hasonló taxonómiai szinteken alkalmazható filogenetikai vizsgálatokhoz.

Néhány példát említve a növénykórtan területéről, a raktári kártevő *Gilbertella persicaria* (*Mucorales*) és rokon fajok *gpd*- és rDNS-szekvenciáival végzett vizsgálatok nagyban hozzájárultak e gombák filogenetikai kapcsolatainak tisztázásához. A *G. persicaria* igen közeli filogenetikai kapcsolatban áll a *Choanephoraceae* család tagjaival, a *Rhizomucor* és *Mucor* nemzetségek képviselőinek vizsgált DNS-szekvenciái pedig nagy filogenetikai távolságot mutatnak.

BERBEE és munkatársai (1999) ITS- és részleges *gpd*-szekvenciák segítségével igazolták, hogy a korábban *Helminthosporium*ok közé sorolt, de morfológiailag elkülöníthető *Drechslera* és *Bipolaris* nemzetségek valóban elkülönülnek egymástól filogenetikai értelemben is.

ZHANG és BERBEE (2001) ezt követően kiterjedtebben vizsgálták e csoport evolúciós kapcsolatait több mint 20 *Pyrenophora/Drechslera* fajt összehasonlítva *Cochliobolus/Bipolaris* és *Setosphaeria/Exserohilum* fajokkal a riboszomális DNS ITS-régió és a glicerinaldehid–3–foszfát–dehidrogenáz gén szekvenciaelemzését alkalmazva.

WANG és munkatársai (2010) szintén ITS- és *gpd*-gének segítségével két új *Stemphylium* fajt azonosítottak Kínából és Franciaországból.

MANAMGODA és munkatársai (2014) nemrégiben *Bipolaris* fajok azonosításán és revízióján dolgozott kombinált rDNS-ITS-, *gpd*- és *tef*-szekvenciákkal. Adataik szerint a *gpd*

bizonyult a legalkalmasabbnak, akár önmagában alkalmazva is elegendőnek a taxonok elhatárolására.

3.3 *Pyrenophora teres f. teres intraspecifikus genetikai változékonysága*

Az élővilág jellemző tulajdonsága a változatosság, mely két szinten nyilvánul meg. Nemcsak a fajok különböznek (interspecifikus), hanem fajon belül (intraspecifikus) is tapasztalható változatosság, ugyanazon faj vagy populáció egyedei fenotípusukat és/vagy genotípusukat tekintve általában nem tökéletesen egyformák. Általánosan igaz, hogy minél nagyobb egy patogén genetikai változatossága, annál jobban képes alkalmazkodni a környezethez, például új patotípusok, a korábbiaknál agresszívabb vagy a fungicidekkel szemben ellenállóbb törzsek alakulhatnak ki (McDONALD és LINDE 2002). Ebből következően egy gombapopuláció változékonyságának és genetikai szerkezetének ismerete nem csupán elméleti, hanem gyakorlati szempontból is fontos (TIBAYRENC et al. 1991).

Hamar felismerték azt, hogy a különböző vagy azonos területről származó *P. teres* izolátumok között nagy morfológiai eltérések lehetnek (McDONALD 1967; SHIPTON et al. 1973), ami megnehezítette az azonosítást (SHIPTON et al. 1973). Gyakorlati szempontból azonban nagyobb jelentősége van a patogenitáshoz/virulenciához köthető változékonyságnak. PON (1949) volt az első, aki jelentést készített a *P. teres* patogenitásbeli változékonyságáról. TEKAUZ (1990) Kanadában mérte fel a *P. teres* patotípusait, és a PTT 45, valamint a PTM 20 patotípusát azonosította egy 9, illetve egy 12 tagú árpa differenciálósor használatával. Hasonlóan nagyszámú patotípust írtak le a korábbi Szovjetunió területén AFANASENKO és LEVITIN (1979), akik 80 PTT patotípust jelentettek egy 7 árpa fajtából álló differenciálósor tesztelésével. A *P. teres* eltérő patotípusai azonban nem minden populációjában jelennek meg ilyen nagy számban. STEFFENSON és WEBSTER (1992) Kaliforniában végezte el a hálózatos forma változékonyságának felmérését, és csupán 13 patotípust talált egy 22 tagú tesztszortiment segítségével. Ezzel azonos számú PTT patotípust azonosítottak PLATZ és munkatársai (2000) Ausztráliában kisebb, 15 tagú differenciálósorral. Nyugat-Ausztráliában GUPTA és LOUGHMAN (2001) csak 2 PTT és 2 PTM patotípust jelentett, pedig sokkal nagyobb, összesen 47 tagból álló differenciálósort használtak. Hasonlóan kevés, csak 4 hálózatos patotípust azonosítottak Egyiptomban (EL-FAHL et al. 1982), bár differenciálósoruk mindössze 4 tagból állt.

Az 1990-es években megjelenő molekuláris technológiai fejlesztések lehetővé tették, hogy új szemszögből vizsgálják a genetikai sokféleséget. A *P. teres* populációk genetikai variabilitását számos országban vizsgálták molekuláris markerekkel. PEEVER és MILGROOM (1994) a

kórokozó Egyesült Államokból, Kanadából és Németországból származó, távoli földrajzi eredetű öt populációjának diverzitását vizsgálta RAPD-módszerrel. Összesen 5 primer alkalmazásával azonosított tíz lokuszon vizsgálták az allélgyakoriságot populációnként 22–35 izolátumban. Nyolc RAPD-lokusz mutatott polimorfizmust legalább egy populációban, és két lokusz volt monomorf mind az öt esetben. Öt és kilenc között alakult a többlokuszos genotípusok száma az egyes populációkban. Kilenc genotípus kizárólag a német populációban, 4 pedig kizárólag a new-yorki populációban fordult elő. A teljes genetikai változékonyságért közel egyenlő mértékben a populációk közötti (46%) és a populációkon belüli (54%) változékonyság volt felelős. A nagymértékű populációk közötti változékonyság kialakulásában szerepet játszhatott az idegen genotípusok feltehetően fertőzött vetőmaggal ilyen nagy távolságokra való terjedésének korlátozottsága, azaz a populációk közötti alacsony mértékű migráció. Az adatok elemzése során arra a következtetésre jutottak, hogy valamennyi vizsgált populáció valószínűleg egy ősi közös alap populációból származik, talán a Közép-Keletről, ahol a feltételezések szerint a *P. teres* és a termesztett árpák elődei együtt evolválódtak. Az öt populáció közül négyben a RAPD-lokuszek nagy százaléka véletlenszerű kombinációkban fordult elő, ami a különböző genotípusok szexuális rekombinációjára utal.

PELTONEN és munkatársai (1996) ugyancsak 5 RAPD-indítószekvenciát alkalmazva vizsgálta Finnország különböző helyeiről származó 48 PTT izolátum genetikai változékonyságát. UPGMA klaszter analízissel 63%-os hasonlósági koefficienszt állapított meg az összes izolátum között. Az izolátumokat nem tudták csoportosítani földrajzi származásuk, agresszivitásuk, növekedési rátájuk, vagy morfológiai jellemzőik szerint, amit azzal indokoltak, hogy a vizsgálatban használt primerek valószínűleg semlegesek voltak ezekre a jellemzőkre nézve. A genetikai változékonyság azonban egészen kis skálán is megfigyelhető volt, mivel azonos növényen különböző genotípusok is előfordultak.

JONSSON és munkatársai (2000) a genotípusos változékonyság maximális fokát figyelték meg 64 svéd PTT-izolátumban, amelyeket 2 területről gyűjtöttek egymástól 20 km-es távolságban, és 3 RAPD-primerrel teszteltek összesen 19 különböző lokuszt azonosítva. A polimorf lokuszok aránya egyik populációban 48,7%, a másikban 58,6% volt. Az egyes allélok gyakoriságára alapozott Nei-féle géndiverzitás alig tért el a két populációban ($H=0,182$, ill. $H=0,216$), és a populációk közötti genetikai különbözőség is csak kismértékű volt (5,3%, $G_{ST}=0,053$).

FRAZZON és munkatársai (2002) szintén RAPD-módszert alkalmaztak Brazília Rio Grande do Sul államának különböző területeiről származó nyolc *P. teres* izolátum morfológiai és genetikai variabilitásának vizsgálatára. Azt találták, hogy míg az izolátumok telepmorfológiája tágabb határok között különbözött egymástól (50–100%-os páronkénti hasonlóságok), addig a 16 RAPD-primerrel végzett elemzés szorosabb genetikai hasonlóságot mutatott (75,81–90,32%) az

izolátumok között, melyek azonban nem földrajzi származásuk szerint csoportosultak az UPGMA-fenogramon.

CAMPBELL és munkatársai (2002) magas szintű, 63%-os Nei-féle genetikai különbséget találtak a hálózatos tüneteket és az ovális levélfoltokat okozó két *P. teres* forma egy-egy populációja között, ezzel szemben a kórokozók alpopulációi (adott forma egy táblán belüli 2 mintagyűjtési helyéről származó törzsek) között a genetikai különbözőség mértéke már igen alacsony volt (1,49%). Összesen 36 PTT- és 29 PTM-izolátumot vizsgáltak, melyeket két, egymáshoz mintegy 30 km-re lévő tábláról gyűjtöttek. A részletes kísérletekhez 5 RAPD-primert választottak ki, melyekkel végül 65 lokuszt azonosítottak. A polimorf lokuszok aránya a két PTT-alpopulációban 30,8%, illetve 13,8% volt, és 13 különböző PTT többlokuszos genotípust azonosítottak. A Nei-féle géndiverzitás átlagos mértéke a PTT-populációban 0,0625 volt. A genetikai adatokon alapuló dendrogramon a két formába tartozó izolátumok többsége egy-egy különálló klasztert alkotott. Egy 'f. *teres*' izolátum tartalmazott egy sajátos 'f. *maculata*' fragmentumot és ezért külön csoportosult. A kutatók szerint mindez arra utal, hogy a kérdéses izolátum a PTT és PTM kereszteződéséből jöhetett létre, tehát a természetben lehetséges a kereszteződés a két *P. teres* forma között, csak korlátozott mértékben.

BATURO-CIESNIEWSKA és munkatársai (2012) négy lengyel vidékről származó 41 PTT-izolátum esetében tanulmányozták a genetikai változékonyságot. Nyolc RAPD-indítoszekvenciát találtak alkalmasnak a vizsgálatokra, amelyekkel összesen 56 lokuszt azonosítottak, ahol a polimorf lokuszok aránya 40,9% volt. Bár az analízis során kimutattak genetikai variabilitást az izolátumok között, de ezt a hatást nem tudták egyik vizsgált tényezőnek (gyűjtési hely, gyűjtés éve, gazdanövény fajtája) sem tulajdonítani egyértelműen. Az átlagos genetikai hasonlóság az összes izolátum tekintetében 48% volt. Érdekeség, hogy 20 izolátumpár között, melyek legalább 85%-os hasonlóságot mutattak, voltak olyanok, melyek gyűjtési helye, éve vagy gazdanövényük fajtája azonos volt, de voltak olyanok is, melyek esetében ezen adatok különböztek. A legnagyobb hasonlósággal bíró izolátumpárok némelyike azonos, másika pedig különböző párosodási típusba tartozott.

RAU és munkatársai (2003) Szardínia szigetén 5 agroökológiai körzetben 150 *P. teres* izolátumot gyűjtöttek. Az izolátumok egyetlen árpa fajtáról, de összesen 6 szántóföldről (populációból) származtak. A minták 57%-a PTT, 43%-a PTM volt. Öt populációban mindkét forma előfordult, míg egy populációban csak PTT-k voltak jelen. A szerzők 121 AFLP-markerrel vizsgálták a *P. teres* populációszerkezetét. A polimorf lokuszok aránya az összes izolátumot nézve 42% volt, a 'f. *teres*'-t tekintve pedig ennél kicsit kisebb (33%). A genetikai polimorfizmus mértéke a Nei-féle átlagos géndiverzitás alapján hasonló volt a PTT- és PTM-populációkban (0,046 ill. 0,045), ugyanakkor a PTT-n belül sokkal nagyobb volt az alpopulációk közötti genetikai

differentiáltság (43%), mint a PTM esetében (9%), talán előbbi kórokozó kisebb mértékű migrációja miatt. A genotípusos diverzitást nézve a PTT-izolátumok 68%-a képviselt különböző többlokuszos genotípust, míg a PTM-izolátumok ennél nagyobb hányada (87%) tartozott más-más genotípusba. Mindez arra utalt, hogy a PTT-populáción belüli nagyobb fokú volt a klonalitás mértéke. A szerzők adataik alapján mindkét kórokozónál valószínűsítették az ivaros szaporodást szántóföldön, de azt is hangsúlyozták, hogy annak szerepe a populációszerkezet alakításában a különböző környezeti régiókban eltérő mértékű.

LEIŠOVA és munkatársai (2005b) Csehországból és Szlovéniából származó 37 PTT- és 30 PTM-izolátumot vizsgált AFLP-analízissel. Tizenkilenc primerkombináció segítségével 469 DNS-fragmentum előfordulását elemezték ezekben az izolátumokban. A markerek döntő hányada (95,9%) polimorf volt. Megállapításuk szerint az izolátumok genetikai variabilitását sokkal inkább befolyásolta a gyűjtés éve, mint földrajzi származásuk vagy gazdanövényük fajtája.

SERENIUS és munkatársai (2007) szintén AFLP-analízist használva vizsgáltak közel háromszáz ausztrál, európai, észak-amerikai és orosz *P. teres* izolátumot. Jelentős genetikai különbséget mutattak ki a különböző országok, valamint ausztrál államok 'f. *teres*' populációi között ($F_{st}=0,238$, ill. $0,573$), de nem találtak statisztikailag igazolható eltéréseket azonos ausztrál államból származó populációk között. Emellett a hálózatos forma mintegy kétszer nagyobb mértékű differentiáltságot mutatott az államok között Ausztráliában, mint a PTM.

LEHMENSIEK és munkatársai (2010) 60 PTT- és 64 PTM-izolátum genetikai rokonságát vizsgálta, melyek közül 58 Dél-Afrikából és 66 Ausztráliából származott. Nyolc AFLP-primerkombinációt alkalmazva összesen 400 lokusból 168 (42%) volt polimorf. Megállapításuk szerint mind a PTT-, mind pedig a PTM-csoportokon belül legalább 90% volt az egyes izolátumok genetikai hasonlósága. Populációs szinten pedig míg a dél-afrikai PTT-populációk (különböző mintavételi helyek) közötti divergencia 32,81% volt, addig az ausztráliai PTT-populációk (szintén különböző mintavételi helyek) esetében csak 8,89%-ot mértek. Továbbá azt a következtetést vonták le, hogy mindkét kórokozó forma vizsgált populációiban elsősorban az ivartalan szaporodás fordul elő.

Összesen 20 szíriai és tunéziai agroökológiai körzetbe tartozó PTT-populáció 94 izolátumát vizsgálták BOUAJILA és munkatársai (2013) 401 polimorf AFLP-marker segítségével. Azt tapasztalták, hogy a populációkon belül nagyobb volt a genetikai variancia, mint közöttük, bár utóbbi is számottevő mértéket ért el (27,24%). A 94 vizsgált izolátum 87 különböző AFLP-haplotípust képviselt, ami magas genotípusos változékonyságra, illetve közvetve gyakori izolátumok közötti genetikai rekombinációra utalt. Egyaránt nagyfokú genetikai különbség volt a különböző fajtákról származó szíriai és a tunéziai populációk esetében ($G_{ST}=0,31$, ill. $G_{ST}=0,39$), melyet részben a mintázott területek közötti alacsony génáramlással lehet magyarázni. Erre utalt a

genetikai adatok alapján szerkesztett UPGMA-fenogram is, melyen az izolátumok főleg a gazdanövények fajtája vagy az agro-ökológiai körzetek szerint csoportosultak.

BOGACKI és munkatársai (2010) voltak az elsők, akik mikroszatellit elemzést alkalmaztak Dél-Ausztráliából származó 3 PTT- és 2 PTM-populáció vizsgálatára. Összesen 76 'f. *teres*' és 43 'f. *maculata*' izolátumot teszteltek 20 lokuszon, melyekből 17 polimorf volt. A géndiverzitás Nei-féle értéke közel azonos volt a két kórokozó populációban (PTT-re 0,38 és PTM-re 0,40), valamint sokkal magasabb a más típusú markerekkel korábbi tanulmányokban számított értékeknél. Mindkét kórokozó alpopulációi között alacsony genetikai különbséget mutattak ki. Ezzel szemben a formák szignifikáns módon különböztek egymástól (Nei-féle G_{ST} = 0,42). A szerzők nagyszámú különböző genotípust azonosítottak mindkét patogén populációjában és felvetették, hogy az ivaros szaporodásnak talán jelentős szerepe lehet ebben.

Litván PTT-populációk genetikai változékonyságát vizsgálták STATKEVIČIŪTĒ és munkatársai (2010) ISSR-analízissel. Két helyszínen 2007–2008-ban gyűjtött 24 izolátumot választottak ki a vizsgálatra, amit két indítószekvenciával teszteltek. Összesen 31 különböző allélt azonosítottak és valamennyi izolátum egyedi ISSR-haplotípusba tartozott, mutatva a módszer nagy felbontóképességét. Az összes molekuláris variáciának 88,78%-a volt tulajdonítható a populációkon belüli genetikai változékonyságnak, 6,37% a különböző években azonos helyszínen gyűjtött populációk közötti eltérésnek, míg 4,85% az azonos évben különböző helyszínről származó populációk közötti eltérésnek. UPGMA klaszter analízissel nem állapítottak meg a gyűjtési éveknek és helyeknek megfelelő izolátumcsoportokat.

LEIŠOVA-SVOBODOVA és munkatársai (2014) főleg cseh és szlovák *P. teres* izolátumok genetikai változékonyságát vizsgálták szintén mikroszatellit analízissel. 305 PTT- és 82 PTM-izolátumot gyűjtöttek különböző régiókból és 23 mikroszatellit lokuszon jellemezték őket. Hasonló Nei-féle géndiverzitást állapítottak meg a két forma esetében, de meglepő módon nagyobb genetikai eltéréseket mértek a két kórokozó formán belül (PTT-re 0,46; PTM-re 0,41), mint közöttük (G_{ST} = 0,18). A szerzők nem találtak igazolható genetikai különbségeket a különböző években gyűjtött populációk között, és az izolátumcsoportok közötti genetikai távolság sem volt összefüggésben azok egymástól mért földrajzi távolságával. Mivel mindegyik izolátum egyedi többlokuszos genotípusú volt, a véletlenszerű párosodás hipotézisét a szerzők nem tudták kizárni a legtöbb populációban, s feltételezték, hogy a *P. teres* vizsgált populációiban az ivaros és ivartalan szaporodási forma egyaránt előfordul.

3.3.1 A *Pyrenophora teres* párosodási típusainak eloszlása

A valódi gombák esetében általában elkülöníthető egy ivaros és egy ivartalan szaporodási szakasz. Az ivartalan konídiumok legfontosabb szerepe a betegség terjesztésében van, míg az ivaros úton keletkező spórák rendszerint primer fertőzési forrásként és áttelelő képletekként funkcionálnak, valamint fontos forrásai a genetikai variabilitásnak. Nagyobb genetikai variabilitás általában olyan populációkban van, ahol az egyedek önsterilek, hiszen az önmegtermékenyülés a homozigóta állapot, a beltenyésztés irányába hat, és az ilyen populáció kevésbé alkalmazkodóképes. Az önmagukban ivaros úton szaporodó gomba törzsek homotallikusak. Ezzel szemben a heterotallikus gombák kompatibilis partnerek kölcsönhatását igénylik az ivaros reprodukcióhoz. Itt a párosodás a faj azonos, de két eltérő párosodási típusú izolátuma között megy csak végbe (KEVEI et al. 1999).

A *Pyrenophora teres* képes ivaroson és ivartalanul is szaporodni, ezért a gomba populációinak genetikai szerkezete jelentősen függ e két szaporodási mód relatív gyakoriságától a vegetációs periódusban (LIU et al. 2011). Néhány tanulmány már kimutatta, hogy az ivaros szaporodás jelentős a *P. teres* populációkban (PEEVER és MILGROOM 1994; JONSSON et al. 2000; RAU et al. 2003). Ezzel ellentétben más *P.teres* populációkat érintő vizsgálatokból az derült ki, hogy főleg ivartalanul szaporodott (CAMPBELL et al. 2002; LEHMENSIEK et al. 2010). Ahhoz, hogy képet alkothassunk a *P. teres* adott populációinak hajlamáról a változékonyságra, ismernünk kell az ivaros és ivartalan szaporodás kiterjedtségét ezekben a populációkban. Mindez segíthet a populációban zajló folyamatok (pl. új patotípusok létrejöttének) megértésében és közvetett módon a kórokozó elleni védekezésben (SOMMERHALDER et al. 2006).

A *P. teres* egy önsteril, heterotallikus tömlősgomba, ahol a párosodási típust egyetlen lokusz két idiomorf allélja határozza meg (RAU et al. 2005). A *P. graminea* szintén a heterotallikus gombák csoportjába tartozik, melyek szekvenciáját RAU és munkatársai határozták meg (2007), azonban a párosodási típusok eloszlására nincs elérhető adat. A gyakorlatban a két párosodási típust MAT1-nek és MAT2-nek nevezzük. Ezek az allélok nem azonosak a *P. teres* két formája között. Úgynevezett SNP-k (egynukleotid-polimorfizmusok) alapján olyan szekvencia specifikus primereket terveztek, melyekkel PCR-t követően egyaránt el lehet különíteni a kórokozó két formáját, valamint azok párosodási típusait is (LU et al. 2010). A sikeres párosodáshoz mindkét párosodási típus jelenléte, valamint megfelelő környezeti tényezők szükségesek (SHIPTON et al. 1973).

RAU és munkatársai (2005) Szardínia szigetéről, összesen 6 populációból származó 150 izolátum (68 PTT és 82 PTM) párosodási típusát is tanulmányozták az általuk fejlesztett PCR-technikával. Mindkét párosodási típus jelen volt az összes populációban, mégpedig olyan gyakorisággal és eloszlásban, ami valószínűsítette az ivaros szaporodás jelenlétét a vizsgált szántóföldi populációiban. A MAT1- és MAT2-izolátumok aránya mindegyik populációban közel

1:1 volt. A szerzők következtetése szerint összességében és főképpen az ivaros szaporodásnak volt tulajdonítható a párosodási típusok azonos arányú eloszlása.

SERENIUS és munkatársai (2005) 72 finn PTT-izolátum esetében tanulmányozták a párosodási típusok eloszlását két szántóföldi populációban. Első alkalommal azonosították a gomba két párosodási típusát Finnországban, mely közel 1:1 arányban volt jelen mindkettő a vizsgált populációkban. Nem találtak a MAT1- és MAT2-csoportok között igazolható genetikai differenciát. Véleményük szerint a kapott eredmények közvetetten a gomba gyakori szexuális szaporodására utalnak finnországi körülmények között.

SERENIUS és munkatársai (2007) egy korábban már említett másik tanulmányukban szintén mindkét párosodási típust megtalálták mind a 167 izolátumos finn gyűjteményben, mind pedig a 139 izolátumból álló ausztrál gyűjteményben. Sok gyűjtési helyen közel 1:1 arányban fordultak elő MAT1- és MAT2-törzsek, és a legtöbb izolátum más-más AFLP-haplotípust képviselt. Ezzel szemben csak MAT2-es izolátumokat azonosítottak Krasznodar környékén Oroszországban. A mindkét párosodási típust tartalmazó populációkban nem figyeltek meg genetikai elkülönülést a MAT1- és MAT2-csoportok között, s a szerzők ebből azt a végső következtetést vonták le, hogy a két párosodási csoport között valószínűleg létezik genetikai kölcsönhatás. Jóllehet a véletlenszerű párosodás elméletét a statisztikai tesztek nem támasztották alá. Mindez a *P. teres* populációban zajló folyamatok bonyolultságára utal, s a szerzők az ellentmondások okaira több lehetséges magyarázatot is felvázoltak, mint környezeti tényezők (hosszú tél), agrotechnikai tényezők (szármaradványok megléte, növényváltás) vagy az alternatív gazdanövények szerepe.

Ausztráliában McLEAN és munkatársai (2010) a *P. teres* f. *maculata* 44 izolátumában a párosodási típusok szintén 1:1-es arányát figyelték meg, s ennek okaként az ivaros szaporodást nevezték meg.

STATKEVIČIŪTĒ és munkatársai (2010) öt különböző litvániai PTT-populációban tanulmányozták a párosodási típusok eloszlását, amely a legtöbb esetben nem tért el szignifikánsan az 1:1 aránytól. A két típus egymáshoz közeli mintavételezési helyen is előfordult.

LEIŠOVA-SVOBODOVA és munkatársai (2014) harmincnégy – főként cseh és szlovák – *P. teres* populációt tanulmányoztak, ahol többek között a párosodási típusok meghatározására specifikus PCR-t használtak, amit RAU és munkatársai (2005) fejlesztettek ki. Összesen 306 PTT- és 82 PTM-izolátumot vizsgáltak, ahol 227 MAT1-típusba (179 PTT és 48 PTM), 145 pedig MAT2-típusba (115 PTT és 30 PTM) tartozott. Tizenhat izolátum (12 PTT és 4 PTM) pedig mindkét párosodási típusra jellemző specifikus terméket tartalmazott. Csak 11 PTT- és 5 PTM-populációban, azaz a vizsgált populációk kevesebb, mint felében fordult elő mindkét párosodási típus. Ezek többségében azonban a véletlenszerű párosodás statisztikailag nem volt igazolható, annak feltételei mindössze 5 populációban teljesültek (95%-os valószínűség mellett). Négy

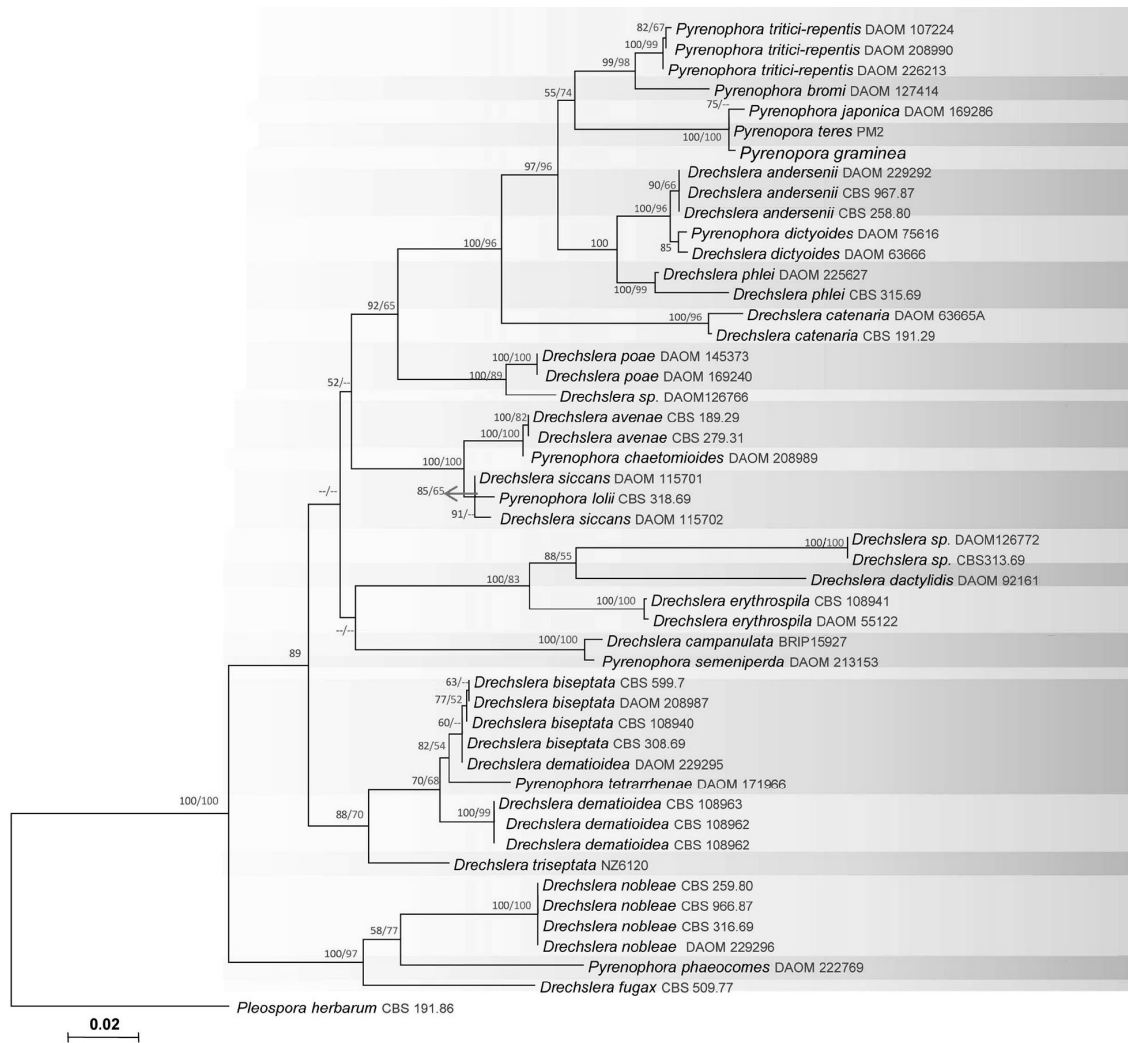
populációban (3 PTT és 1 PTM) pedig mindkét párosodási típust azonosították ugyanarról a levéltünetről. A szerzők szerint adataik arra utalnak, hogy a vizsgált *P. teres* populációkban ivaros és ivartalan folyamatok is zajlanak.

AKHAVAN és munkatársai (2014) Kanadában tanulmányozták a párosodási típusok eloszlását. Összesen 124 árpa tábláról gyűjtötték be a fertőzött leveleket, amelyekről 128 PTT- és 92 PTM-izolátumot azonosítottak. Gyakran megtalálták mindkét formát ugyanazon szántóföldön, ugyanazon növényen, sőt ugyanazon levélen egymáshoz közeli tüneteken. Nem tapasztaltak jelentős eltérést az 1:1 MAT1:MAT2 aránytól egyik kórokozó esetében sem a vizsgált 3 tartományban, sem pedig a kanadai préríken. A szerzők szerint mindkét forma életciklusában jelentős szerepe van az ivaros szaporodásnak Kanadában.

3.4 Árpát fertőző *Pyrenophora* fajok filogenetikája és interspecifikus rokonsága

A gombák körében filogenetika alatt a taxonok evolúciós fejlődését, valamint rokonsági kapcsolatainak a tanulmányozását értjük rendszerint nukleotid- és aminosav-szekvenciájuk alapján. A gombáknál a filogenetika különös jelentőséggel bír, mivel belőlük csak nagyon kevés fosszilis maradvány maradt fent, amelyek segíthetnék az evolúciós kapcsolatok feltárását. A molekuláris biológia fejlődésével azonban lehetőség nyílt arra, hogy a mikroorganizmusok nukleinsav- és fehérjeszekvenciája alapján következtessünk az egyes taxonok közötti evolúciós kapcsolatokra, és feltárjuk az azok közötti rokonsági viszonyokat. Napjainkra a szekvenciaelemzések kutatása az evolúciós törzsfák készítésének standard eljárásává vált.

A tágabb értelemben vett *Helminthosporium* Link nemzetség korábban számos lágú és fás szárú növényt fertőző fajt ölelt fel. Ebből több mint 100 a *Poaceae* család tagjainak (ALCORN 1988) kórokozója, melyeket jelenleg a három nemzetségbe sorolunk. Ezeket az anamorf nemzetségeket határozottan el lehet különíteni egymástól konídiumaik alábbi morfológiai bélyegei alapján: a konídium és a hílum alakja, a csírázás módja valamint az álharántfalak képződésének sorrendje (SIVANESAN 1987; ALCORN 1988). Napjainkig mintegy 140 *Pyrenophora* és 80 *Drechslera* fajt írtak le, melyek közül ZHANG és BERBEE (2001) több mint 20 faj evolúciós kapcsolatait vizsgálta a riboszomális DNS ITS-régió és a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*gpd*) gén szekvenciaelemzésével. Eredményeik alapján a *Pyrenophora* egy monofiletikus csoport, melyen belül az ivartalan *Drechslera* alakok az előzetes várakozásoknak megfelelően a megfelelő ivaros alakokhoz csoportosultak. Ezen túlmenően az ivartalan és ivaros változatok közötti filogenetikai viszonyok jól jellemezték a morfológia alapján felállított rokonsági kapcsolatokat is (11. ábra).



11. ábra *Drechslera* fajok ITS, LSU és gpd szekvenciákon alapuló filogenetikai kapcsolatait ábrázoló ML törzsfá. Az elágazások statisztikai megbízhatóságát a mellettük található bootstrap értékek jelzik. A fa a *Pleospora herbarum* külsoporthoz van gyökereztetve. (forrás: ARIYAWANSA et al. (2014))

CROUS és munkatársai (1995) vizsgálataik során egy *P. japonica* izolátum és a *P. teres* f. *maculata* típusizolátum teljes genomi DNS-RFLP-mintázatai között 93%-os hasonlóságot mutattak ki. E molekuláris adat, valamint a két kórokozó hasonló morfológiája és az általuk kiváltott hasonló tünetek alapján feltételezték, hogy a *P. japonica* nem önálló faj, hanem a *P. teres* szinonimja. Később CAMPBELL és munkatársai (1999) AFLP- és RAPD-módszereket alkalmazva megállapították, hogy nem csupán a *P. japonica*, hanem a *P. hordei* is valójában a *P. teres* f. *maculata* képviselői. Továbbá megfigyelték, hogy a *P. teres* és a *P. graminea* interspecifikus keresztezésekor termékeny utódok jönnek létre laboratóriumi körülmények között, ami szintén mutatja, hogy eme két faj genetikailag nagymértékben hasonló. SMEDEGÅRD-PETERSEN (1983) korábban szintén sikeresen párosította laboratóriumi körülmények között a *P. teres* két formáját

egymással és a *P. graminea*val. Az utódok stabilak és termékenyek voltak. A sikeres laboratóriumi keresztezés felveti e taxonok azonos biológiai fajhoz való tartozásának kérdését, de mind a mai napig nincs arra adat, hogy közöttük populációs szinten is megtörténik a genetikai állományok cseréje természetes körülmények között.

STEVENS és munkatársai (1998) nem tudták határozottan elkülöníteni az árpát fertőző *Pyrenophora* fajokat egymástól az rDNS ITS-régióik szekvenálása alapján. Mindössze egy bázisnyi állandó különbséget tapasztaltak a *P. graminea* és az árpát fertőző többi pirenofóra (*P. teres* f. *teres*, *P. teres* f. *maculata* és *P. hordei*) között az ITS1 szakaszon (0,0–0,9%-os eltérés). A *P. teres* két formája közötti genetikai variabilitás mértéke 0,0–0,6%, a PTT- és PG-izolátumok közötti eltérés 0,3–0,9% volt. Feltűnt, hogy a PTM-izolátumok közötti variabilitás nagyobb (0–0,31%), mint a PTM és a *P. hordei* közötti távolság (0–0,29%). A szerzők végkövetkeztetése az volt, hogy nem találtak egyértelmű határvonalat az árpát fertőző pirenofórák között sem intraspecifikus, sem pedig interspecifikus szinten.

ZHANG és BERBEE (2001) megállapították, hogy a *P. graminea*, *P. teres* és *P. japonica* (*P. teres* f. *maculata*) nagyon közeli rokonságban van egymással, ITS- és/vagy *gpd*-szekvenciáik nagyon hasonlóak vagy azonosak (98,6–100%). A *P. teres* és *P. graminea* rDNS ITS-ei között 99,8%-os homológiát figyeltek meg (a *P. graminea gpd* génjét nem szekvenálták). Az eredmények alapján a szerzők felvetették e három árpapatogén kórokozó szinonimitásának kérdését, s ezt kiderítendő szükségesnek tartottak további genetikai vizsgálatok elvégzését. A három patogén közeli rokonságát korábban már morfológiai és genetikai tanulmányok is alátámasztották (SHOEMAKER 1962, SIVANESAN 1987).

CAMPBELL és munkatársai (2002) dél-afrikai árpatablákról származó PTT és PTM populációk genetikai eltéréseit is vizsgálták. A két formát fogékony árpa genotípusokon okozott tünetek alapján különítették el, a vizsgálatokban 36 hálózatos tüneteket okozó izolátum és 29 'spot'-típusú levélfoltokat kiváltó izolátum szerepelt. A 40 tesztelt random oligonukleotid primer közül öt adott értékelhető DNS-mintázatot. A két kórokozó genetikai diverzitását populáción belül és populációk között is vizsgálták a Nei-féle G_{ST} (0–1 közötti szám) számításával. Míg a két kórokozó populációin belüli differenciáltság alacsony volt ($G_{ST} = 0,0149$), közöttük meglehetősen nagy volt a genetikai elkülönülés ($G_{ST} = 0,63$). Ez utóbbi megfigyelést az egyes izolátumok klaszter analízise is alátámasztotta. Az UPGMA-fenogramon három fő klaszter rajzolódott ki, határozottan elkülönültek egymástól a PTT és PTM formába tartozó izolátumok, és egy külön köztes klasztert alkottak a két kórokozó korábbi laboratóriumi keresztezéséből származó hibridizolátumok. A szerzők azonosítottak továbbá egy hálózatos tünetről származó olyan izolátumot, amely tartalmazott egy a 'spot'-típusú izolátumokra jellemző RAPD-fragmentumot. Ennek alapján azt feltételezték, hogy e

sajátos izolátum a PTT és PTM ivaros rekombinációjának terméke, azaz a két forma kereszteződése végbemehet természetes környezetben is.

LEIŠOVA és munkatársai (2005a) 32 cseh és szlovák izolátum (*Pyrenophora teres*, *P. graminea*, *P. tritici-repentis* és *Helminthosporium sativum*) AFLP analízise során azt tapasztalta, hogy négy izolátum kivételével az *P. teres*ek két különálló csoportot alkotnak a PTT és PTM-nek megfelelően. A négy kivétel PTT-ként érkezett, de az analízis során a PTM-ek csoportjába helyezkedtek el.

LEIŠOVA és munkatársai (2005b) AFLP-analízist alkalmazva megállapította, hogy a *P. teres* és másik négy árpáról származó patogén (*Helminthosporium sativum*, *Pyrenophora falvispora*, *P. graminea* és a *P. tritici-repentis*) tisztán elkülönül egymástól, továbbá a *P. teres*en belül a PTT és a PTM is külön klasztert alkot. Azonban a viszonylag magas számban előforduló közbenső haplotípusok arra engednek következtetni, hogy a hibridizáció a két forma között létrejöhöz.

BAKONYI és JUSTESSEN (2007) szintén RAPD-analízissel vizsgálta távoli földrajzi eredetű 11 PG-, 9 PTM- és 23 PTT-izolátum genetikai kapcsolatát. Hét primer alkalmazásával 55 polimorf (52,38%) DNS-szakaszt azonosítottak összesen 105 RAPD-fragmentből. A Nei-féle géndiverzitás számítása során alacsony mértékű, de statisztikailag szignifikáns különbség jelentkezett a három kórokozó allélgyakoriságai között (max. 6,6%). Továbbá a fajok közötti variabilitás mértéke alacsonyabb volt (42%), mint a fajon belüli (58%). Szintén érdekes eredményt kaptak a három kórokozó genetikai távolságának vizsgálatakor, amikor a *P. teres* két formája magasabb értéket mutatott ($D=0,132$), mint a PG és a PTM közötti távolság ($D=0,094$).

RAU és munkatársai (2007) 22 PTT-, 17 PTM- és 4 PG-izolátum filogenetikai rokonságát tanulmányozta a párosodási típust kódoló gének szekvenciái alapján. Több mint 85%-ban különbözött a két *P. teres* forma egymástól, és a PG is hasonló mértékben tért el a *P. teres*től. A PG-t szorosabb filogenetikai kapcsolat fűzte a PTM-hez, mint a PTT-hez. Az adataik arra utaltak, hogy a *P. teres* formák között hosszú ideje létezik genetikai izoláció, vagyis közöttük a hibridizáció ritka vagy nem létezik szántóföldi körülmények között.

ANDRIE és munkatársai (2008) pedig már arra a következtetésre jutottak, hogy a PG, PTM és PTT ugyanahhoz a fajhoz tartozhatnak, mert rDNS ITS-, *gpd*- és MAT2-régiókra épülő kombinált törzsfájukon nem különültek el egyértelműen.

ELLWOOD és munkatársai (2012) három gabona kórokozó (*Pyrenophora tritici-repentis*, PTM és PTT) filogenetikai kapcsolatát vizsgálták öt gén szekvenciája (aktin, β -tubulin, citokróm P450 14 α -demetiláz, transzlációs elongációs faktor és *gpd*) alapján. Ortológ intergénikus régiókat vizsgáltak ezen kórokozók közötti genetikai kapcsolatok és eltérések feltárására. A PTT és PTM közötti evolúciós elágazás mintegy 519 ezer évvel ezelőttre tehető, míg a *P. tritici-repentis* körülbelül 8,4 millióéve vált el a *P. teres* formáktól. A különböző intergénikus régiók mindegyike

azt a nézetet támasztja alá, hogy a két *P. teres* forma együttesen vált el a *P. tritici-repentis*től. Érdekeség, hogy a *P. tritici-repentis* számított elválása a *P. teres* formáktól megközelítőleg a búza és az árpa szétválásának idejére tehető, a PTT és PTM közép-pleisztocénre tehető, szétválása pedig megelőzi az árpa domesztikációját. Az eredmények azt mutatják, hogy a *P. teres* két formája közeli rokonságban vannak, de evolúciós értelemben autonóm genetikai csoportok, különálló formák.

AKHAVAN és munkatársai (2014) a korábban már említett kanadai tanulmányukban 128 PTT- és 92 PTM-izolátumot vizsgáltak. A formákat specifikus PCR-rel azonosították. Polimorf SSR-markerek segítségével próbáltak bizonyítékot szerezni a két forma közötti lehetséges genetikai rekombinációra. A klaszter analízis eredményeképpen az izolátumok két, a formáknak megfelelő különálló csoportot alkottak, s nem találtak a két forma hibridizációjára utaló jeleket.

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Izolátumgyűjtemény

4.1.1 Hazai levél minták gyűjtése

2006 és 2010 között mintegy 157 tipikus, atipikus vagy szokatlan tüneteket mutató őszi és/vagy tavaszi árpa leveleket gyűjtöttünk szinte az ország minden régiójából (összesen 73 helyszínről), valamint 51 db őszi búzáról származó izolátumhoz jutottunk hozzá Dr. Csósz Lászlóné hozzájárulásával. A gyűjtés a tünetek megjelenésétől függően április második felétől betakarításig történt, általában a felső négy levélemeletről származtak a mintáink. Az adatgyűjtési lapon feljegyeztük a gyűjtés helyét, idejét, az árpa fajtáját, az előveteményt és az izolátumhoz tartozó tünettípust. A begyűjtött leveleket feldolgozásig, szárított, lepréselt állapotban, papírzacskóban tároltuk szobahőmérsékleten. A gyűjtésben segítségünkre voltak a megyei Kormányhivatalok dolgozói is.

4.1.2 Egyspórás tenyészetek izolálása

Izoláláskor a levél-mintákat Petri-csészékben készített nedveskamrákba helyeztük, és 24–48 óráig sötétben tároltuk 20–22°C-on. A léziókról sztereomikroszkóp alatt 200–400 ×-es nagyításon konídiumokat távolítottunk el és burgonya-dextróz-agaron (BDA) egykonídiumos tenyészeteket indítottunk. Tiszta izolátumaink fenntartása ferde BDA-on történt 15°C-on steril paraffinolaj alatt.

4.2 Atipikus levéltünetekről származó izolátumok morfológiai és patogenitási vizsgálata

Sem hálózatos foltokat, sem pedig levélcsíkokat nem tartalmazó, Kiszomboron 2007 tavaszán gyűjtött árpalevél-mintáról izolált *Pyrenophora*-tenyészetet kaptunk Dr. Csósz Lászlóné nemesítőtől (Gabonakutató Nonprofit Kft., Szeged) meghatározás céljából. Emellett 2008 júniusában Röjtökmuzsajon, Szeged-Kecskéstelepen és Táplánszentkereszten gyűjtöttünk szokatlan nekrotikus tüneteket mutató, de gyaníthatóan pirenofóra gombával fertőzött leveleket. Gyűjtési helyenként egy, azaz összesen 4 meghatározandó monokonídiumos izolátumot (H-160, H-298/2, H-302, H-307/3) és kontrollként általunk korábban molekuláris módszerrel azonosított két *P. teres* f. *teres* törzset (H-303 és H-308/2) vontunk be a laboratóriumi tesztekbe.

4.2.1 Telepmorfológia, telepnövekedés és az ivartalan szaporítóképletek morfológiájának vizsgálata

Izolátumaink telepmorfológiáját és növekedési erélyét sajátkészítésű, illetve gyári (Nebotrade) burgonya-dextróz-, kukoricaliszt- (Difco), malátakivonat- (Sigma-Aldrich, USA) és centrifugált V8-dzsús- (ERWIN és RIBEIRO 1996) agaros táptalajokon teszteltük.

A következő receptek alapján készítettük el a különböző táptalajokat, melyeket az elkészítésük után 121°C-on autoklávban sterilizáltunk 15 percig.

A felhasznált anyagok 1 liter desztillált vízhez:

<u>Malátakivonat-agar:</u>	15 g malátakivonat-agar
<u>Kukoricaliszt-agar:</u>	17 g kukoricaliszt-agar (pH 6,0 +-0,2)
<u>Saját burgonya-dextróz-agar:</u>	200 g burgonya 20 g glükóz 18 g agar-agar
<u>Nebotrade burgonya-dextróz-agar:</u>	39,1 g burgonya-dextróz agar (pH 5,6 +-0,2)
<u>Centrifugált V8-dzsús-agar:</u>	200 ml V8-dzsúszt állandó keverés és melegítés mellett 4 g CaCO ₃ -tal telítünk. Az oldhatatlan csapadékot 10 perces, percenként 4000 fordulatszámú centrifugálással kell eltávolítani, pH-t NaOH-dal 6,5-re állítjuk, majd a táptalaj 1 literre kiegészítve és 15 g agarral szilárdítva használható fel.

Aktívan növő tenyészetek széléből kivágott 4 mm-es micéliumos BD-agarkorongokat helyeztünk 20 ml táptalajt tartalmazó 9 cm-es Petri-csészékbe (2 db/izolátum), melyeket ezt követően sötétben inkubáltunk 22°C-on. A 7. és 14. napokon fotóztuk a telepeket és mértük átmérőiket két egymásra merőleges irányban. A különböző gombaképletek jelenlétét/hiányát 30 napos tenyészetekben vizsgáltuk mikroszkóp segítségével. A konídiumtartók és konídiumok jellemző alak- és mérettani paramétereit a patogenitási tesztekben fertőződött leveleken fejlődött képleteken tanulmányoztuk, mivel az országos felmérésből származó nagyszámú minta feldolgozásakor nem volt lehetőségünk a mérések elvégzésére. Mikroszkóp segítségével 200–400× nagyításon izolátumonként 25 konídiumnak jegyeztük fel a hosszát, maximális szélességét, alapi sejt hosszát, alapi sejt szeptánál mért szélességét, csúcsi sejt szélességét, az álharántfalak számát, valamint a konídium színét és alakját. A konídiumtartók vonatkozásában 10 db tartó hosszát, az alapi sejt és a csúcsi sejt szélességét, az álharántfalak számát, valamint a tartó színét és alakját jegyeztük fel. Adataink eltéréseinek statisztikai megbízhatóságát t-próbával és egytényezős varianciaanalízissel teszteltük.

4.2.2 Üvegházi patogenitási teszt

A kórokozók fertőzőképességének bizonyítására mesterséges visszafertőzést hajtottunk végre Botond hatsoros takarmány árpa növényeken, melyeket 2–4 leveles korukig üvegházban neveltünk (5 növény/cserép, 2 cserép/izolátum). Kontrollként vizes kezelést alkalmaztunk. A kiválasztott izolátumokat olaj alól burgonya-dextróz-agaron tenyésztettük 20°C-os kamrában. Miután a micélium benőtte a 9 cm-es Petri-csészéket 20 gr micéliumot lekapartunk a felületéről steril oltótű segítségével. 100 ml steril desztillált vízzel turmixgépben micélium-szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziót 2 rétegű steril gézen átszűrve, permetezéssel (Gardena szobai permetező) segítségével jutattuk a levelek felületére a teljes borítottság eléréséig. A jobb tapadás érdekében 5 µl Tween 20 tapadást fokozót is adtunk a szuszpenzióhoz. A fertőzés után az árpa növényeket nevelő kamrába tettük 100% relatív páratartalom mellett 20°C-on sötétben 24 óráig, majd 70% páratartalom mellett 24°C/20°C fény/sötét ciklusban neveltük tovább. 3 hétig figyeltük a tünetek megjelenését, fejlődését, az adatokat dokumentáltuk, fényképeztük. Mindegyik törzset visszaizoláltuk, majd újra morfológiai és molekuláris vizsgálatnak vetettük alá.

4.3 Molekuláris genetikai vizsgálatok

4.3.1 DNS-kivonás

A DNS-kivonáshoz 100 ml burgonya-dextróz tápoldatot inokuláltunk 10 napos tenyészetekről lekapart micéliumdarabkákkal. A beoltott gombakultúrát 5–7 napig tenyésztettük 22°C-on. A képződött micéliumot textilszűrővel nyertük ki, majd liofilizáltuk és folyékony nitrogénben porítottuk. A teljes genomi DNS kivonását három különböző módszerrel végeztük. Egyrészt AUSUBEL és munkatársai (1994) CTAB-alapú módszerét alkalmaztuk kisebb módosítással. Egy milliliter lizáló pufferben (0,7 M NaCl, 1% CTAB, 50 mM Tris, pH 8.0, 250 mM EDTA, pH 8.0) 60 mg micéliumport tártunk fel 65°C hőmérsékleten. A sejttörmelékét centrifugálással távolítottuk el, majd többszöri extrakciót végeztünk fenol/kloroform/izoamil-alkohol (25:24:1) és egyszer kloroform/izoamil-alkohol (24:1) keverékével. A DNS-t azonos térfogatú B-oldat (1% CTAB, 50 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) hozzáadásával kicsapatuk. A pelletet lízis puffer és B oldat 1:1 arányú keverékével mostuk, majd C oldatban (10 mM Tris, pH 8.0, 0,1 mM EDTA, pH 8.0, 1 M NaCl) feloldottuk. Ebből az oldatból a DNS-t izopropanollal csaptuk ki, majd mostuk 70%-os etanolban, s végül 200 µl TE (10 mM Tris és 1 mM EDTA, pH 8,0) pufferben oldottuk. Ezt az anyagot kezeltük ribonukleázzal (RNáz A, Fermentas, 1 unit/minta) és proteinázzal (Proteináz-K, Fermentas, 50 µg/minta). Újabb szerves oldószeres extrakció és alkoholos kicsapatás után 30 µl TE-ben oldottuk fel a DNS-t. A minták DNS

koncentrációját spektrofotométerrel (Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 2S), illetve Nanodrop (ND-1000) készülékekkel határoztuk meg.

A preparátumok egy részénél a gyorsabb és modernebb MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) vagy a NucleoSpin Plant II Genomic DNA Purification Kit (Macherey-Nagel GBMH & Co. KG, Düren, Germany) technológiát alkalmaztunk követve a gyártó utasításait.

4.3.2 Kórokozók azonosítása specifikus PCR-rel

Valamennyi izolátumunkat teszteltük az árpa 3 fő pirenofóra gombája, a *P. teres* f. *teres* (PTT-F/PTT-R), *P. teres* f. *maculata* (PTM-F/PTM-R) és *P. graminea* (PG2-F/PG2-R) PCR-es azonosítására kifejlesztett RAPD-alapú indítószekvencia-párokkal (WILLIAMS et al. 2001; TAYLOR et al. 2001) (**3. melléklet**).

A 25 µl PG-, valamint PTT/PTM-specifikus PCR-elegy összetétele: 50 ng DNS; 1,5 mM vagy 2,2 mM MgCl₂; 0,2 mM vagy 0,25 mM dNTP; 0,4 µM indítószekvencia; 1 egység *Taq* DNS-polimeráz és 1 × *Taq* puffer (MBI Fermentas). Indítószekvenciapáronként külön reakciókban történt a DNS-sokszorosítás Bio-Rad C1000-es PCR-készülékkel WILLIAMS és munkatársai (2001), illetve TAYLOR és munkatársai (2001) szerint (**3. melléklet**). Negatív kontrollként DNS helyett steril Milli-Q vizet használtunk.

Mintánként 5 µl PCR-terméket futtattunk 0,5 × TBE pufferben 1%-os agarózgélben (Gibco) 60–80 V-on 1–2 órán keresztül és 0,5 µg ml⁻¹ etídium-bromiddal festettük, végül UV-fényben tettük láthatóvá és fotózást követően értékeltük, a termék megléte vagy hiánya alapján.

4.3.3 Párosodási típusok meghatározása specifikus PCR-rel

A párosodási típus meghatározására mások által (RAU et al. 2005) a MAT1 (MAT1-F/MAT1-R) és MAT2 (MAT2-F/MAT2-R) allélekre kifejlesztett specifikus indítószekvenciákkal dolgoztunk (**3. melléklet**).

A PCR reakció (**3. melléklet**) során 20 µl végtérfogatú elegyet készítettünk a következőképpen: 1× puffer (20 mM Tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 4 pmol mindegyik primerből, 1 U *Taq* polimeráz enzim és 20 ng DNS.

Mintánként 5 µl PCR termékeket 1,2 % agarózgélben (Gibco) futattuk, amely 0,1 µg/ml etídium-bromidot tartalmazott. Az elektroforézis 0,5× TBE oldatban történt 60-90 V-on a szükséges ideig. A gélt UV-fényben fotóztuk és értékeltük, szintén a várt termék megléte vagy hiánya alapján.

4.3.4 *Pyrenophora teres* f. *teres* genetikai változékonyságának vizsgálata

4.3.4.1 RAPD-vizsgálatok

RAPD-vizsgálathoz az Operon Technologies Inc. (Alameda, Amerikai Egyesült Államok) 30 db indítószekvenciáit használtuk, melyeket előzetes tesztek alapján költségtakarékossági okokból párba állítottunk az általuk feltárt polimorfizmusok mértéke és megbízhatósága alapján (OPB06-OPB12; OPH09-OPE07; OPA14-OPE03; OPB07-OPB10; OPW03-OPA07; OPW07-OPW17; OPH20-OPH12; OPE20-OPE17; OPB11-OPB09; OPB16-OPC13; OPG04-OPB01; OPE15-OPC16; OPH03-OPE16; OPE01-OPA02; OPI12-OPE19). Az összesen 20 µl végtérfogatú PCR-elegy a következő volt: 10 µl Dream Taq™ PCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific), 2-2 µl primer (1-1 µM koncentrációjú), 4 µl steril desztillált víz és 2 µl DNS. A Master Mix összetétele: DreamTaq DNA Polymerase, 2X DreamTaq buffer, dNTPs, és 4 mM MgCl₂. A DNS-sokszorosítást Eppendorf Mastercycler® ep 96-well PCR típusú készülékkel végeztük a következő program szerint: elődenaturáció 94°C-on 2 percig utána 45 ciklus (94°C–1 perc denaturáció; 35°C–1 perc összekapcsolás; 72°C–2 perc elongáció), végül 72°C-on 5 percig tartó utópolimerizáció. Az elektroforézist 8-8 µl PCR-termékkel végeztük 1,2%-os agarózgélben, 1×TBE pufferben, 200 V-on. A gélbe cseppentett GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (Lonza) (1:10000 mennyiségű) tette láthatóvá az UV megvilágítás során a kapott termékeket, melyet fényképpel rögzítettünk. A fragmentek méretének meghatározását 100 bp-os és 1000 bp-os molekulásúly markerek mellett végeztük (PCR 100 bp Low Ladder (SIGMA-ALDRICH), 1 kb Ladder (SIGMA-ALDRICH)). Minden amplifikálást háromszor ismételtünk.

4.3.4.2 RAPD-adatok populációgenetikai statisztikai elemzése

Kiértékelés során, a látható RAPD-fragmentekből bináris mátrixot hoztunk létre, ahol az összes RAPD-termék jelenlétét 1-gyel, hiányát 0-val jelöltük minden egyes izolátumban. Csak azokat a fragmenteket számoltuk meg, amelyek minden ismétlésben előfordultak. A mátrix alapján kiszámoltuk az izolátumaink közötti genetikai távolságot NEI és Li együtthatóval (NEI és LI 1979), majd **UPGMA** (**U**nweighted **P**air-**G**roup **M**ethod with **A**rithmetic mean) klaszter analízissel (SNEATH és SOKAL 1973) készítettük az izolátumok közötti genetikai távolságot képileg ábrázoló dendrogramot. Az elágazások statisztikai megbízhatóságát 1000 bootstrap analízissel (RAPD-fragmentek visszatevéses mintavételezése) teszteltük. Mindezekhez a TREECON 1.3b szoftvert használtuk (VAN DE PEER és DE WACHTER 1994).

Izolátumaink genotipusos változékonyságát a normalizált Shannon-index (H_s) alapján számoltuk (SHELDON 1969): $H_s = -\sum g_i \ln g_i / \ln N$, ahol g_i az adott többlokuszos genotípus

gyakorisága és N a mintaszám. Ez az érték 0 (egyetlen genotípusba tartozik az összes izolátum) és 1 (minden izolátum egyedi genotípus) között változhat. Továbbá a Simpson-féle indexet ($D = \sum g_i^{-2}$) is kiszámoltuk, mely azt mutatja, hogy ha a populációból véletlenszerűen kiválasztunk két izolátumot, mi a valószínűsége annak, hogy különböző genotípusba tartoznak (SIMPSON 1949). Ez az érték szintén 0 és 1 közötti, de ebben az esetben a minél alacsonyabb érték annál nagyobb genotípusos diverzitást jelent.

Különböző izolátum-csoportokon belüli és azok közötti genetikai polimorfizmusok és differenciáltság mérésére kiszámoltuk a polimorf lokuszok gyakoriságát és az egyes allélek (jelen esetben a különböző primerekkel kapott különböző méretű RAPD-fragmentek) gyakoriságán alapuló Nei-féle gén diverzitást (NEI 1973, 1987). Ehhez a POPGENE számítógépes programot alkalmaztuk (YEH és BOYLE 1997). Egy lokusz polimorf, ha két allélja (esetünkben 0 vagy 1) van, tekintet nélkül az adott allél (RAPD-fragmentum) gyakoriságára az egész populációban. A Nei-féle genetikai differenciáltság statisztikai megbízhatóságát a X^2 (Khi-négyzet) próba mintájára genetikai tanulmányokban alkalmazott G^2 -teszttel vizsgáltuk (BROWN 1996). A mintavételi egységeken belüli átlagos (H_S) és teljes (H_T) géndiverzitás számított értékeit korrigáltuk NEI és CHESSER (1983) 17. és 18. számú egyenletei szerint. A mintavételi egységek közötti géndiverzitás abszolút (D_{ST}) és teljes géndiverzitáshoz viszonyított relatív (G_{ST}) értékeit az alábbi egyenletek szerint kalkuláltuk: $D_{ST}=H_T-H_S$ és $G_{ST}=D_{ST}/H_T$ (NEI 1973). A genetikai adatokra adaptált ún. G^2 -tesztet a Khi-négyzet teszt mintájára $G^2=0$ nullhipotézist alkalmazva végeztük el (BROWN 1996). A mintavételi egységek között $P \leq 0.05$ esetben tekintettük szignifikánsan eltérőnek az allélgyakoriságokat.

4.3.5 Árpát fertőző *Pyrenophora* fajok filogenetikai rokonságának vizsgálata

A filogenetikai vizsgálatokba bevont izolátumok különböző földrészekről és országokból származtak (3. táblázat). Többségüket korábbi, más céllal vagy módszerekkel készült tanulmányokban már vizsgálták és igazolták identitásukat, melyet mi is ellenőriztünk a 3.3.2 fejezetben részletezett módon. A törzsek nagyobb hányada egy konídiumból vagy hifacsúcsból származik. Összesen 13 *P. graminea*, 13 *P. teres* f. *maculata* és 15 *P. teres* f. *teres* törzset vontunk be vizsgálatainkba. Külcsopornak a közelrokon *Pyrenophora tritici-repentis* (PTR) faj egy izolátumát (WAC11137) választottunk. A PTM_SG1-1 és a külcsoport rDNS ITS-szekvenciáit Dr. Simon Ellwood és Dr. Caroline Moffat (Centre for Crop and Disease Management, Department of Environment and Agriculture, School of Science, Curtin University, Bentley, Perth, Australia) bocsátották rendelkezésünkre. A PTM_SG1-1, PTT_0-1 és a külcsoport egyéb szekvenciáit

szekvencia adatbázisból töltöttük le (NCBI génbanki azonosítók: GU014819, JQ314397, JQ314398, JQ314401, JQ314402, JQ314403, JQ314406, JQ837841, NW_003522006 és NW_003522278).

3. táblázat A filogenetikai vizsgálatba bevont izolátumok

Izolátum-kódok	Izolátumok forrása és eredeti kódjai	Származás	Gazdanövény	Korábbi tanulmányok
<i>P. graminea</i>				
1PG*	CBS 100861 ¹ (Pg 17/88)	Rieti, Olaszország, 1985	Árpa	Pecchia et al. (1998), Bakonyi et al. (2007)
2PG*	CBS 314.69 ¹	Rotenburg/Nieders, Németország, 1968	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
3PG*	PgI 12/88 ²	Olaszország, 1981	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
4PG*	CBS 100864 ¹ (I28/95)	Korba, Nabeul, Tunézia, 1995	Árpa	Pecchia et al. (1998), Bakonyi et al. (2007)
5PG*	PgC (DgC) ³	Kína, 1995	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
6PG*	MUCL 9687 ⁴ (CBS 336.29)	Japán, 1929	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
7PG*	Pg11 (Pg 95-7) ⁵	Egyesült Királyság, 1995	Árpa	Stevens et al. (1998), Taylor et al. (2001), Bakonyi et al. (2007), Justesen et al. (2008)
8PG*	Pg7 (Pg 95-5) ⁵	Egyesült Királyság, 1995	Árpa	Stevens et al. (1998), Bates et al. (2001), Bakonyi et al. (2007)
9PG*	Pg5 (DPg 95-1) ⁵	Dánia, 1995	Árpa	Stevens et al. (1998), Bakonyi et al. (2007)
11PG*	H-172 ⁶	Magyarország, 2007	Árpa	
12PG*	UPSC 1837 ⁷	Svédország, 1986	Zab	Bakonyi et al. (2007)
38PG	WRS1239 ⁸	Kanada	Árpa	Justesen et al. (2008)
40PG	Pg2376 ⁸	Norvégia, 1995	Árpa	Stevens et al. (1998), Justesen et al. (2008)
<i>P. teres f. teres</i>				
14PTT*	PA-103.5/11 ⁹	Táplánszentkereszt, Magyarország, 1992	Árpa	Bakonyi et al. (1995), Bakonyi et al. (2007)
15PTT*	ICMP 10973 ¹⁰ (eredetileg <i>P. japonica</i>)		Búza	Bakonyi et al. (2007)
16PTT*	ICMP 10948 ¹⁰	Sanson, Új-Zéland, 1982	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
17PTT*	Pt16 (Pt 93-20) ⁵	Egyesült Királyság, 1993	Árpa	Stevens et al. (1998), Taylor et al. (2001), Bakonyi et al. (2007), Justesen et al. (2008)
18PTT*	CA 86-82-2 ¹¹	Tulare, Kalifornia, USA, 1986	Árpa	Wu et al. (2002), Bakonyi et al. (2007)
19PTT*	CBS 282.31 ¹	Japán, 1931		Bakonyi et al. (2007)
20PTT*	MUCL 28818 ⁴	Louvain-la-Neuve, Belgium, 1986	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
21PTT*	CBS 281.31 ¹ (eredetileg <i>P. japonica</i>)	Japán, 1931	Árpa	Crous et al. (1995), Bakonyi et al. (2007)

23PTT*	276 ¹²	Leverkusen, Németország, 1994	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
24PTT*	UPSC 1838 ⁷	Svédország, 1986	Zab	Bakonyi et al. (2007)
25PTT*	RU-1 ¹³	Rodstvenno, Oroszország, 1997	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
42PTT	Pt-Pastorale ⁸	Dánia	Árpa	Justesen et al. (2008)
43PTT	NZ-2 ⁸	Új-Zéland	Árpa	Justesen et al. (2008)
44PTT	WRS858 ⁸	Teulon, Manitoba, Kanada, 1973	Árpa	Serenius et al. (2007)
PTT_0_1	0-1 ¹⁵			Ellwood et al. (2012)
<i>P. teres f. maculta</i>				
26PTM*	CBS 228.76 (típustözs) ¹	Dánia, 1976	Árpa	Crous et al. (1995), Bakonyi et al. (2007)
28PTM*	43/96/1 ¹⁴	Waitchie, Dél-Ausztrália, 1996	Árpa	Williams et al. (2001), Bakonyi et al. (2007)
29PTM*	NSW 4/10 ¹⁴	Tulloona, NSW, Ausztrália, 1998	Árpa	Williams et al. (2001), Bakonyi et al. (2007)
31PTM*	PA-117.1/1 ⁹	Tapolca, Magyarország, 1992	Árpa	Bakonyi et al. (2007)
32PTM*	Pm4 (DPt 95-3) ⁵	Dánia, 1995	Árpa	Stevens et al. (1998), Bakonyi et al. (2007), Justesen et al. (2008)
33PTM*	Pm 857 (Pm 96-1) ⁵	Kanada, 1996	Árpa	Stevens et al. (1998), Taylor et al. (2001), Bakonyi et al. (2007)
46PTM	M-Ital ⁸	Olaszország	Árpa	Justesen et al. (2008)
47PTM	NZ-1 ⁸	Új-Zéland	Árpa	Justesen et al. (2008)
48PTM	CAN ⁸	Kanada	Árpa	
49PTM	Ph94-2 (eredetileg <i>P. hordei</i>)	Ausztrália, 1991	Árpa	Stevens et al. (1998)
50PTM	M-ENG ⁸	Anglia	Árpa	
51PTM	Lew"S" ⁸	USA	Árpa	Justesen et al. (2008)
PTM_SG1	SG1-1 ¹⁵	Nyugat-Ausztrália, 2009		Ellwood et al. (2012)
<i>P. tritici-repentis</i> (külcsoport)				
PTR	WAC11137 ¹⁵	Naraling East Rd, Yuna, Nyugat-Ausztrália, 2001	Búza	Ellwood et al. (2012)

A táblázatban szereplő izolátumok gyűjtői és jelöléseinek magyarázata:

*Jelzi, hogy az izolátum monokonídiumból vagy hifacsúcsból származik.

¹Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

²Dr. Giovanni Vannacci, University of Pisa, Agricultural Plant Science, Plant Protection and Animal Health, Mycology, Pisa, Italy.

³Ismeretlen küldő.

⁴Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM), MUCL (Agro) industrial fungi & yeasts collection, Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium.

⁵National Institute of Agricultural Botany, Cambridge, UK.

⁶Dr. Csósz Lászlóné, Gabonakutató Nonprofit Kft., Szeged

⁷Uppsala University Culture Collection of Fungi, Botanical Museum, University of Uppsala, Uppsala, Sweden.

⁸Dr. Annemarie Fejer Justesen, University of Aarhus, Faculty of Agricultural Sciences, Research Centre Flakkebjerg, Slagelse, Denmark.

⁹Dr. Bakonyi József, MTA ATK Növényvédelmi Intézet, Budapest.

¹⁰International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand.

¹¹Dr. Brian J. Steffenson, Department of Plant Pathology, North Dakota State University, Fargo, ND, USA.

¹²Dr. Kristin Klappach, BASF SE, Agricultural Center, Limburgerhof, Germany

¹³Dr. Olga Afanasenko, Department of Plant Resistance to Diseases of All Russian Research Institute for Plant Protection (VIZR), Saint Petersburg, Russia.

¹⁴South Australian Research and Development Institute, Adelaide, Australia.

¹⁵DAFWA - Plant Pathology Culture Collection, Department of Agriculture and Food - Western Australia

4.3.5.1 A vizsgált szekvenciák PCR-es felszaporítása

Filogenetikai vizsgálatainkhoz négy olyan markert választottunk (riboszómális DNS ITS-régió, β -tubulin, aktin és a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*gpd*)), melyeket már korábban sikeresen alkalmaztak más valódi gombák rokonsági kapcsolataik feltárásához. A vizsgált genom régiók polimeráz-lánreakción alapuló sokszorosítása során a reakció-elegyek 50 μ l végtérfogatúak voltak, melyek a következő összetevőket tartalmazták: 25 μ l DreamTaq PCR Master Mix 2X (DreamTaq DNA Polymerase, 2X DreamTaq buffer, dNTPs, 4 mM $MgCl_2$, Thermo Fisher Scientific), 5-5 μ l forward és reverse primer (0,5 μ M), 10 μ l steril desztillált víz és 5 μ l DNS (10ng/reakció elegy). Az egyes fragmentumok sokszorosítása során alkalmazott PCR-reakció körülményeit a **3. melléklet** tartalmazza.

A PCR-t az Eppendorf Mastercycler® ep 96-well (Eppendorf, Germany) típusú készülékeivel végeztük. Az elektroforézishez minden egyes PCR-termékből 8 μ l-nyi mennyiséget 1%-os agarózgélben, 1 \times TBE pufferben 200 V-on futtattuk meg, majd a gélbe kevert GelStar hatására UV-fényben láthatóvá tettük a mintázatot.

4.3.5.2 PCR-termékek szekvenálása

A szekvencia-meghatározáshoz PCR-termékeinket elküldtük a Macrogen Europe (Amszterdam, Hollandia) részére, ahol tisztítást követően Sanger-féle eljárással határozták meg azok nukleotidsorrendjét. Minden minta esetében mindkét DNS-szálat szekvenáltattuk a PCR-ekhez alkalmazott forward és reverz primerekkel. A kapott elektroforegramokat a Staden programcsomaggal (STADEN et al. 2000) ellenőriztük és manuálisan javítottuk a szekvenciákat.

4.3.5.3 Filogenetikai elemzések

A vizsgálatba vont izolátumok szekvenciáinak illesztését külön-külön az egyes génszakaszokra a MAFFT program 7-es verziójának (KATOH és STANDLEY 2013) online változatával végeztük (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) az alapbeállításokat használva, majd az ITS-ben csekély manuális javítást végeztünk.

Maximum Likelihood (ML) és Bayesian filogenetika (BAYES) rekonstruálásához elsőként kiválasztottuk a nukleotid szubsztitúciós modelleket, amelyek az általunk vizsgált 4 genomszakasz mindegyikére külön-külön a legjobban írja le, hogy mekkora valószínűséggel alakulhatott át az egyik szekvencia a másikba. Ehhez az összesen 1624 modellt tesztelő jModeltest 2.1.7 v20150530 szoftvert használtuk (DARRIBA et al. 2012). A modell-kereséshez a bázis fák „maximum

likelihood” eljárással készültek, a topológia-kereséshez a „legjobb” (Beast) opciót választottuk, és az optimális modell kiválasztása az ún. Bayesian információ kritériumon (BIC) alapuló teszt segítségével történt. E kritériumok alapján a szoftver az aktin gén elemzéséhez a HKY-modellt választotta 8.7193-as kappa értékkel, valamint A= 0,2044, C= 0,3283, G=0,2358, T= 0,2315 nukleotid-gyakoriságokkal. A β -tubulin génre a GTR-modell került kiválasztásra azonos nukleotid-gyakoriságokkal és a következő szubsztitúciós paraméterekkel (A-C= 8,0933, A-G= 8,0933, A-T= 1,0000, C-G= 1,0000, C-T= 8,0933, G-T= 1,0000). A *gpd*-re szintén a GTR-modell került kiválasztásra, de eltérő nukleotid-gyakoriságokkal (A= 0,2519, C= 0,3230, G= 0,2326, T= 0,1926) és a következő szubsztitúciós paraméterekkel (A-C= 0,1653, A-G= 1,0000, A-T= 0,1653, C-G= 0,1653, C-T= 1,0000, G-T= 1,0000). Az ITS evolúcióját legjobban jellemző modell a GTR volt azonos nukleotid-gyakoriságokkal és a következő szubsztitúciós paraméterekkel (A-C= 1,0000 A-G= 1,0000 A-T= 1,0000, C-G= 1,0000, C-T= 6.0670, G-T= 1,0000).

Ezt követően a 4 genomszakasz illesztett szekvenciáiból egy összesen 2375 nukleotid hosszúságú többgénese adatfájlt állítottunk össze, s a korábbiakban kiválasztott modelleket alkalmazva készítettünk ML és BAYES filogenetikai fákat. Előbbihez az IQ-TREE 1.3.4 szoftvert használtuk (NGUYEN et al. 2015). Az ML-fa elágazásainak megbízhatóságát a számítógépes program bootstrap módszerrel tesztelte (FELSENSTEIN 1985), ennek értékeit 1000 ismétlésből számítottuk. A Bayesian filogenetikai elemzést a „The CIPRES Science Gateway V. 3.1” online felületen (MILLER et al. 2000) futtatott MrBayesv3.2.3 (RONQUIST et al. 2011) szoftverrel végeztük. Ehhez az MCMC algoritmust 10000000 generáción keresztül futtattuk és minden ezredik esetben vettünk mintát. Az elemzés során az első 4000 fát nem vettük figyelembe (burn-in). Arról, hogy elég nagy volt-e az alkalmazott MCMC generációs szám, a kapott adatokat ellenőriztük az AWTY program (NYLANDER et al. 2008) online felületén. A ML és BAYES törzsfák ághosszai az egyes partíciókra (génszakaszokra) jellemző ághosszak összege volt, a végleges fákat a MEGA szoftver 6-os verziójával szerkesztettük (TAMURA et al. 2013).

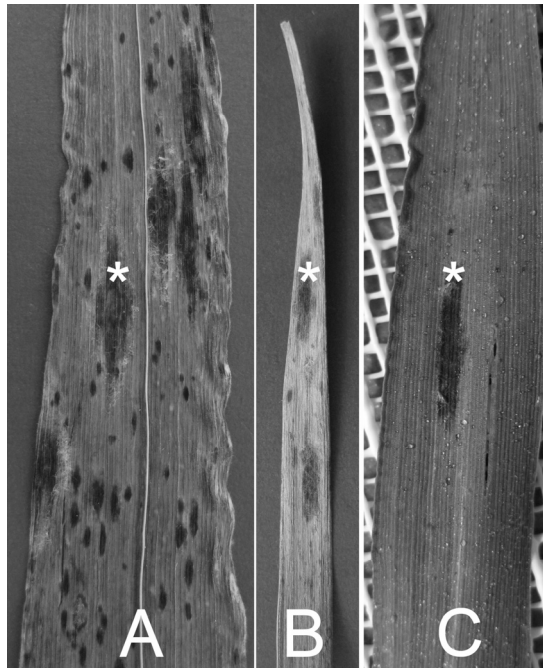
A fentiekből látható, hogy a ML és BAYES filogenetikák egyaránt az ún. karakter alapú törzsfakészítő módszerek közé tartoznak, azaz nem távolságmátrixból, hanem szekvenciákból közvetlenül készítik a filogenetikai fákat, valamint valószínűségi modellen alapulnak. Alapvető különbség közöttük, hogy a ML sok különböző topológiájú fa közül választ ki egyetlen fát, mégpedig azt, amelyiknek az ún. 'likelihood' értéke a legmagasabb, s ez az ún. Maximum Likelihood fa, ami a legnagyobb eséllyel mutatja azt, hogy az adott szekvenciáinkból indultunk ki. A BAYES filogenetika a Markov-lánc Monte Carlo eljárást felhasználó Bayes-statisztikán alapuló fakesés, ami az ML-módszerrel ellentétben a likelihood értékeket 1-gyé összegződő valódi valószínűségekkel alakítja a Bayes-tétel segítségével, s nem egyetlen legvalószínűbb fát keres, hanem sok nagyon valószínű fát, melyekből egy konszenzus (Bayesian) fát számol.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Atipikus tünetekről származó izolátumok jellemzői

5.1.1 Tünetek leírása

A Kiszomboron, Röjtökmuzsajon, Szeged-Kecskéstelepen és Táplánszentkereszten gyűjtött levélminták nem mutatták sem a hálózatos foltosság, sem a levélcsíkoltság tipikus szimptomáit. A röjtökmuzsaji őszi árpa-fajtajelöltről származó leveleken megnyúlt vagy kisebb pontszerű nektrózisok vegyesen fordultak elő, esetenként enyhe klorotikus udvarral körülvéve (**12a. ábra**). A táplánszentkereszti és szeged-kecskéstelepi mintákban (mindkettő Sebastian fajta) néhány kisebb nektrózist észleltünk (**12b-c. ábrák**). A kiszombori árpalevelelről (Vanessa fajta) nem történtek részletes tünettani feljegyzések (a levélről származó izolátumot tenyésztetben kaptuk).

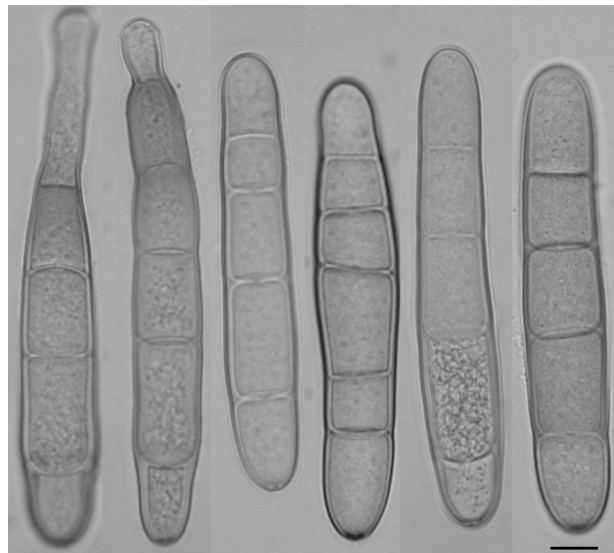


12. ábra *Pyrenophora teres* f. *maculata* által okozott tünetek Röjtökmuzsajon (A), Szeged-Kecskéstelepen (B) és Táplánszentkereszten (C) gyűjtött árpaleveleken. * jelzi a nektrózisokat, melyekről a vizsgált izolátumok származtak

5.1.2 Mikromorfológiai tulajdonságok

A négy ismeretlen *Pyrenophora* izolátumunk jellemzőit hasonlítottuk össze a PTT két referenciatörzsével. Mindannyian magányos vagy kis csoportokban álló konídiumtartókat és hialin-világosbarna, hengeres vagy a csúcs felé kissé szűkülő többsejtű konídiumokat képeztek (**13. ábra**). A konídium és konídiumtartó számos méret és alakotani paraméterét jegyeztünk fel három ismeretlen izolátumunkról (H-160, H-298/2, H-302) és a PTT referenciatörzsekről (**4. táblázat**). A szokatlan

tünetekről származó ismeretlen *Pyrenophora* izolátumaink között jelentős méretbeli eltéréseket tapasztaltunk a konídiumok hossza (75,2–100,9 μm) és konídiumtartók hosszát (123,0–189,4 μm) illetően, míg egyéb adatoknál nagyfokú eltérés nem fordult elő. Az ismeretlen izolátumaink, valamint a referencia *Pyrenophora teres* f. *teres* izolátumok átlagértékeit tekintve a két csoport nagyon hasonló paraméterekkel rendelkezett. Ismeretlen izolátumaink konídium méretei 75,2–100,9 \times 16,5–18,8 μm között változtak, míg a PTT referencia izolátumainak konídiumai 91,9–92,7 \times 18,1–19,3 μm közé estek. Álharántfalak száma tekintetében, míg az ismeretlen mintáknál minimum 3 és maximum 7 darabbal talákoztunk, addig a kontrollként vizsgált PTT-nél minimum 4 és maximum 6 álharántfal volt megfigyelhető. A konídiumtartók méretei is átfedést mutattak. Az ismeretlen izolátumaink konídiumtartóinak hossza 123,0–189,4 μm , a PTT izolátumoké pedig 164,2–168,2 μm .



13. ábra Ismeretlen *Pyrenophora* izolátumaink (H-160, H-298/2, H-302 és H-307/3), valamint a *P. teres* f. *teres* referencia törzsek (H-303 és H-308/2) konídiumai (balról jobbra).

Mérőskála: 10 μm

T-próbával statisztikailag igazolt különbséget a 3 ismeretlen *Pyrenophora* és a 2 PTT izolátumok alkotta két csoport átlagai között a konídiumtartók csúcsi sejtjeinek szélessége, a konídiumok maximális szélessége, az alapi sejt hossza és az alapi sejt szélessége, az álharántfalak száma és a csúcsi sejtjeinek szélessége vonatkozásában állapítottunk meg. Variacionálízissel a konídiumok álharántfalainak száma kivételével mindegyik jellemzőben azonosítottunk szignifikánsan nem különböző izolátumokat a két csoport között, vagyis az egyes izolátumok a legtöbb vizsgált határozójellegben hasonlóak voltak.

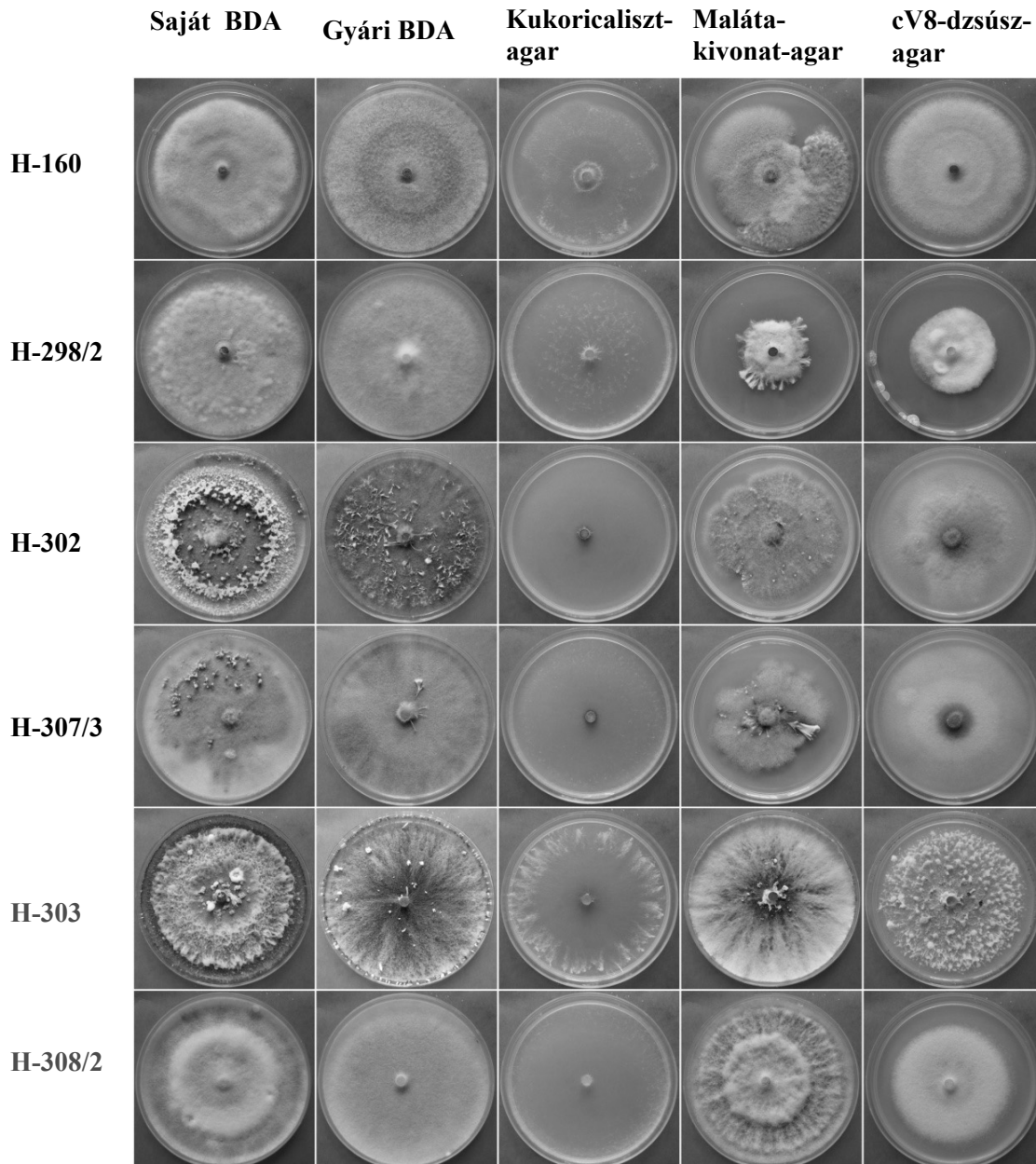
4. táblázat Ismeretlen és *P. teres* f. *teres* izolátumok konídiumtartóinak és konídiumainak fontosabb morfológiai adatai^a.

	Konídiumtartó (n=10)			Konídium (n=25)					
	Hossz (μm)	alapi sejt szélessége (μm)	csúcsi sejt szélessége (μm)	Hossz (μm)	Szélesség (μm)	Alapi sejt hossza (μm)	Alapi sejt szélessége (μm)	Álharántfal (db)	Csúcsi sejt szélessége (μm)
Ismeretlen izolátumok									
H-160	123,0±6,5	12,6±1,80 ^{bcd}	6,8±0,9 ^b	75,2±9,8	16,5±1,0 ^b	19,0±1,7 ^b	16,1±1,1 ^{bc}	4 ^b	12,5±1,3
H-298/2	181,0±21,5 ^b	11,8±0,9 ^{bd}	8,2±1,1 ^b	91,2±10,5 ^b	17,5±1,6 ^{bc}	19,0±1,8 ^{bc}	15,2±1,5 ^c	3,8 ^b	14,3±1,9 ^b
H-302	189,4±34,8 ^b	10,9±0,8 ^{bd}	7,8±1,4 ^b	100,9±10,5	18,8±1,5 ^d	19,4±1,7 ^{bcd}	16,2±1,3 ^{bc}	4 ^b	15,0±1,4 ^{bc}
Átlag	164,5±20,9*	11,8±1,2*	7,6±1,1	89,1±10,2*	17,6±1,4	19,1±1,7	15,8±1,3	3,9	13,9±1,5
<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>									
H-303	164,2±35,8 ^b	11,3±1,1 ^{bd}	7,7±0,9 ^b	91,9±8,2 ^b	18,1±0,9 ^{cd}	21,3±1,8 ^e	17,1±1,2 ^b	4,9 ^c	14,3±0,7 ^b
H-308/2	168,2±43,9 ^b	14,2±3,0 ^c	10,4±1,0 ^b	92,7±8,1 ^b	19,3±1,4 ^d	20,3±1,4 ^{de}	16,9±1,7 ^b	4,7 ^c	15,5±1,6 ^c
Átlag	166,2±39,8*	12,7±2,0*	9,0±0,9	92,3±8,1*	18,7±1,1	20,8±1,6	17,0±1,4	4,8	14,9±1,1

^a A H-307/3-as izolátum csak néhány konídiumot képezett, ezért nem volt lehetőségünk az adatok felvételére. Oszlopon belül a kitévőben azonos betűket/jeleket tartalmazó számadatok között nincs szignifikáns különbség ($P \geq 0.05$)

5.1.3 Telepmorfológiai jellemzők

A tenyészetmorfológia tekintetében igen változatos telepeket képeztek egyes izolátumaink a különböző táptalajokon (például a kukoricaliszt-agaron alig fejlődött micélium, míg a burgonya-dextróz-táptalajokon bőséges volt a micélium fejlődés) (14. ábra). Mindkét csoportnál megfigyelhettünk légmicélium képződést, főleg a saját készítésű BDA-n. Telepeik színe halványszürkétől olajzöldig terjedt.



14. ábra Ismeretlen *Pyrenophora* izolátumaink (H-160, H-298/2, H-302 és H-307/3), valamint a *P. teres* f. *teres* referencia törzsek (H-303 és H-308/2) telepmorfológiája különböző táptalajokon (fentről lefelé). Táptalajok: saját, ill. gyári BDA, kukoricaliszt-agar, malátakivonat-agar és cV8-dzsús-agar (balról jobbra)

A malátakivonat-agaron tenyésztett szokatlan tünetekről származó izolátumok kivételével, minden esetben szabályos szélű telepnövekedést figyelhettünk meg. Kukoricaliszt-agar táptalaj kivételével tömött és alacsony, esetenként felálló csomókkal tarkított légmicélium fejlődött. Ivaros és ivartalan szaporító- és kitartóképleteket nem képeztek a táptalajokon. Hasonló jellegeket tapasztaltunk a PTT két referencia izolátumában.

Azonosítandó tenyészetek telepnövekedési sebessége tág határok között változott (**5. táblázat**). Leggyorsabban rendszerint BD-agarokon, leglassabban malátakivonat-agaron nőttek, de ez utóbbi kivételével valamennyi táptalaj esetében átfedéseket figyeltünk meg a PTT referenciaizolátumokkal. A különböző táptalajokon nőtt izolátumok telepátmérőinek minimális és maximális értékeit vizsgáltuk a két csoport között és a malátakivonat-agar kivételével minden esetben itt is átfedést tapasztaltunk. Nagyobb értékkülönbségeket figyelhettünk meg az ismeretlen izolátumoknál, mint az ismert PTT izolátumoknál. A kukoricaliszt-táptalaj esetében a két PTT minta átlagméretei 50,8 cm és 69,5 cm közzé estek, míg a szokatlan tünetekről származó izolátumok növekedése 39 cm és 80,3 cm között voltak. A 14. napra a malátakivonat-agaron tenyésztett izolátumok kivételével, mindegyik esetben benőtték a micéliumok a Petri-csészét.

Nem találtunk azonban olyan táptalajt, amely egyértelműen elkülönítette volna szokatlan tünetekről származó ismeretlen izolátumainkat a *Pyrenophora teres* f. *teres* referenciatörzsektől.

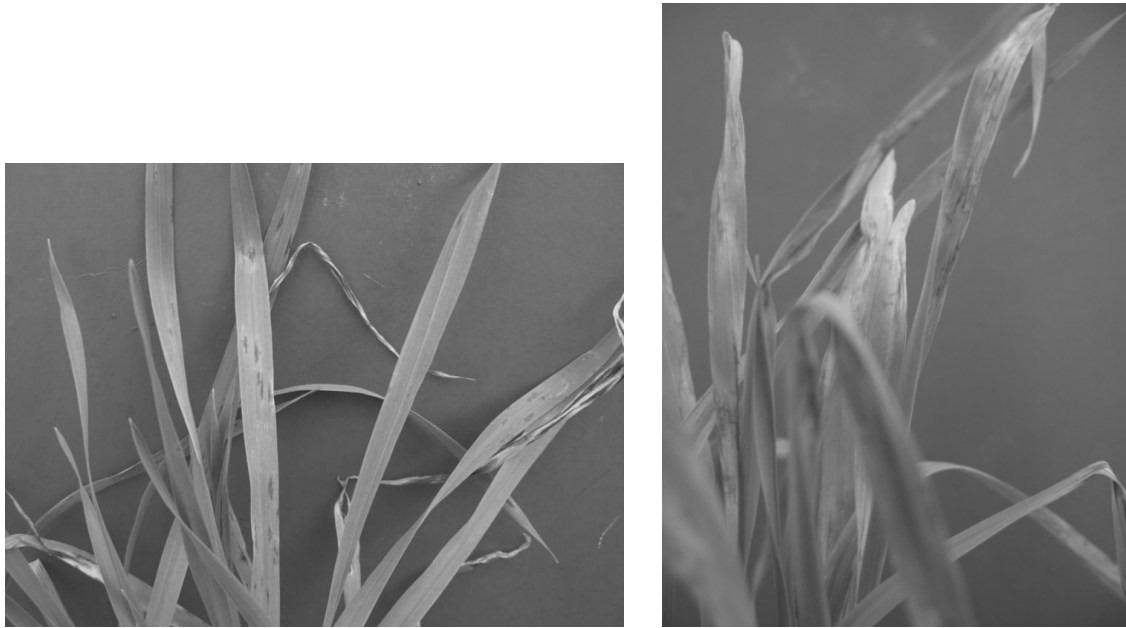
5. táblázat Ismeretlen és *P. teres* f. *teres* izolátumok 14 napos átlagos telepátmérői (mm) különböző táptalajokon

Izolátum	Burgonya-dextróz-agar		Kukoricaliszt-agar	Malátakivonat-agar	cV8-dzsúsusz
	Saját	Nebotrade			
<i>Ismeretlen izolátumok</i>					
H-160	37,8	52,5	39,0	36,8	45,0
H-298/2	80,5	80,0	79,8	40,5	71,8
H-302	66,8	65,5	61,5	30,3	47,0
H-307/3	67,0	65,0	80,3	25,0	33,0
Min.–Max.	37,7–80,5	52,5–80,0	39,0–80,3	25,0–40,5	33,0–71,75
<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>					
H-303	77,0	73,5	50,8	52,5	80,0
H-308/2	73,5	82,3	69,5	51,3	70,5
Min.–Max.	73,5–77,0	73,5–82,3	50,8–69,5	51,3–52,5	70,5–80,0

5.1.4 A kórokozók fertőzőképességének igazolása

A patogenitási vizsgálat során már a kezelést követő 4. nap nagyon apró nektrózisok jelentek meg mind az ismeretlen izolátumainkkal, mind pedig a két PTT referenciatörzsszel fertőzött

növények levelein. Ekkor még nem voltak tünettani eltérések. A nekrózisos fokozatosan növekedtek, és végül a 19. napon már két markánsan elhatárolható tünettípus alakult ki (**15. ábra**). Valamennyi ismeretlen identitású izolátumunk néhány milliméteres, kissé megnyúlt, ovális, illetve ahhoz hasonló alakú levélfoltokat okozott, míg a kontroll PTT izolátumok jól elkülöníthető hálózatos levélfoltosodást okoztak. A vizes kontroll levelei a vizsgált időszak alatt tünetmentesek maradtak.



15. ábra A H-160 jelű ismeretlen *Pyrenophora* izolátumunk (bal oldalon) és a H-308/2-es PTT kontroll törzs (jobb oldalon) által okozott eltérő tünetek Botond árpa fajtán az inokulációt követő 19. napon

5.2 Molekuláris vizsgálatok eredményei

5.2.1 Izolátumok azonosítása faj és forma specifikus indítószekvenciák felhasználásával

Összesen 208, pirenofóras tüneteket mutató levelet gyűjtöttünk különböző árpa, valamint búza fajtákról és nemesítési vonalokról hazai főbb nemesítő központok kísérleti parcelláin, valamint különböző cégek üzemi területein 2006 és 2010 között (**2. melléklet**). A minták nyolc helyszínről származnak 2006-ban, huszonkilenc helyszínről 2007-ben, harminchárom helyszínről 2008-ban, tizennégy helyszínről 2009-ben és két helyszínről 2010-ben. A legtöbb izolátumot 2007-ben (61 db, az izolátumok 29%-a) és 2008-ban (70 db, az izolátumok 34%-a) gyűjtöttük. Hatvannyolc törzs (33%) a nyugati, hatvankettő izolátum (29%) a délkeleti, ötvenegy izolátum (25%) az északkeleti

régióból és az izolátumok 13%-a (27 db) Magyarország központi régiójából származnak. Az izolátumok nagyrészt (102 db, 49%) őszi árpáról, 26% tavaszi árpáról (55 db) és 25% őszi búzáról (51db) gyűjtöttük (**6. táblázat**).

6. táblázat Molekuláris vizsgálatok során vizsgált izolátumok

Régió	Gyűjtési helyszínek száma	Gyűjtés éve	Faj-specifikus PCR-rel azonosított izolátumok száma	Párosodási típusra meghatározott izolátumok száma
Nyugati	1	2006	3	2
	11	2007	31	25
	3	2008	16	9
	3	2009	14	12
	1	2010	4	4
Központi	3	2006	9	8
	3	2008	18	16
Délkeleti	3	2006	16	12
	7	2007	13	13
	18	2008	27	11
	4	2009	5	3
	1	2010	1	0
Északkeleti	1	2006	5	5
	14	2007	17	13
	9	2008	9	9
	7	2009	20	6
Összesen			208	148

Molekuláris vizsgálataink során 142 db (68%) *Pyrenophora teres* f. *teres* törzset azonosítottunk, melyekben a PTT-re specifikus indítószekvencia-párok (PTT-F/PTT-R) nagy mennyiségben sokszorosították a várt hosszúságú (378 bp) DNS-szakaszt, míg a PG- és PTM-indítószekvenciákkal nem kaptunk specifikus termékeket (**7. táblázat**).

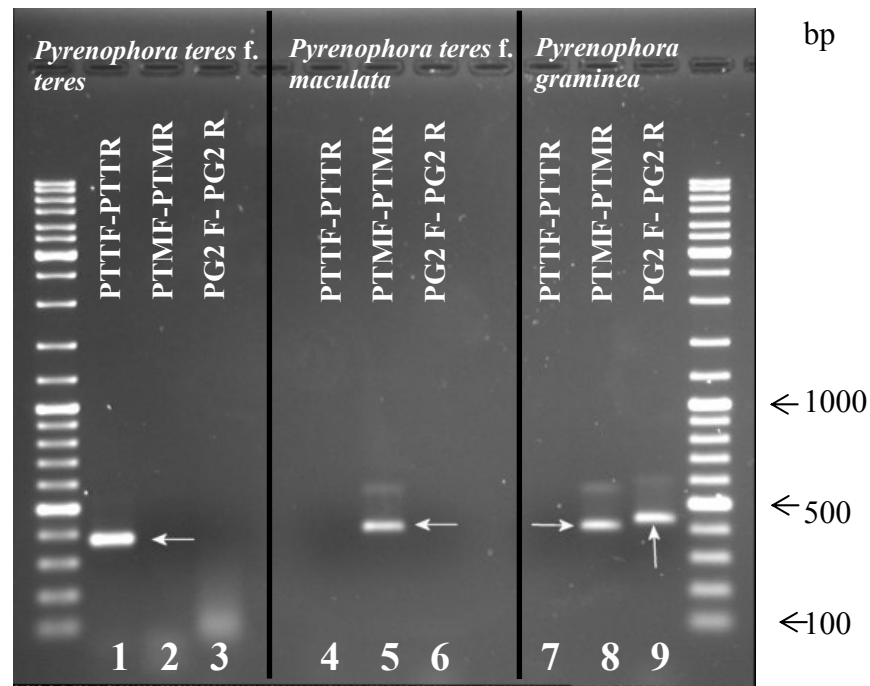
7. táblázat Egyes kórokozók esetén megjelenő termékek különböző primerek esetén

Kórokozó	Indítószekvencia-párok		
	PG2-F/PG2-R	PTT-F/PTT-R	PTM-F/PTM-R
<i>P. graminea</i>	+	-	+
<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	-	+	-
<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	-	-	+

Megjegyzés: += van termék; -= nincs termék

A PTT-k 31%-a (44 db) az északkeleti régióból, 28%-a (40 db) a nyugati országrészből, 26%-a (37 db) délkeleti régióból és a legkevesebb (21 db) a központi régióból származott. Talán

meglepő, hogy a PTT-izolátumok legtöbb esetben nem a tipikus hálózatos levélfoltosodást mutató levelekről, hanem keskeny, 1–2 cm hosszú, nem a levélalaptól a csúcsig terjedő – azaz nem *P. graminea*-típusú –, rövid nekrotikus levélsíkról származtak. Más esetekben pedig kicsi, jellegtelen nekrozisokról. A tipikus levéltünetek esetében mindig PTT-t határoztunk meg. A PTT volt a domináns kórokozó árpán és búzán egyaránt mindegyik évben 2010 kivételével, mely évről csak 5 izolátumot vizsgáltunk (17. ábra).

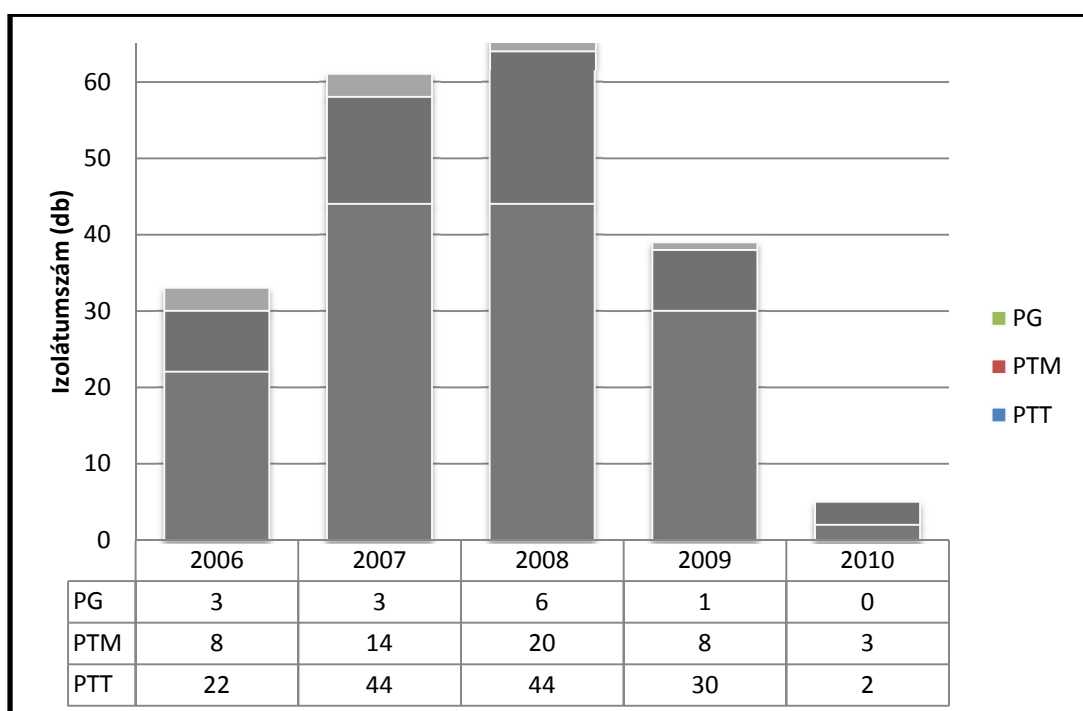


16. ábra Az árpát fertőző *Pyrenophora* fajok/formák azonosítására kifejlesztett specifikus indítószekvencia-párok (PTT-F/R: 1, 4, 7; PTM-F/R : 2, 5, 8; PG2-F/R: 3, 6, 9) alkalmazásával kapott PCR-termékek gélelektroforetikus képe a PTT (1–3) PTM (4–6) és PG (7–9) kórokozók esetében. A nyilak a várt mennyiségű PCR-terméket jelölik. Jobb oldalon 100 bp-os DNS létra látható

A megvizsgált izolátumok közül 53 db (26%) *Pyrenophora teres f. maculata*-nak bizonyult, melyekben a PTM-re specifikus indítószekvenciák (PTM-F/PTM-R) esetében tapasztaltuk nagy mennyiségben a várt méretű (411 bp) DNS-termék felszaporodását. Kisebb mennyiségű ampliconokat ez esetben a PG-specifikus indítószekvenciákkal kaptunk (16. ábra). Az izolátumok szintén az ország különböző régióiból származnak: 46% (24 db) délkeleti régióból, 32% (17 db) a nyugati országrészről és a központi, valamint az északkeleti régióiból azonos mennyiségű (6-6 db) izolátum. PTM-et izoláltunk a következő, számunkra szokatlan tünettípusokról: - szabálytalan alakú apró nekrozisok; - ovális nekrotikus foltok, melyek tipikus PTM tüneteknek felelnek meg, mellettük

az elszórtan elhelyezkedő nekrotikus pettyek; - rövid, hosszúkás nekrozis, melyek mind a korábbi irodalmi adatokkal, mind a saját vizsgálatainkkal egybevágnak (lásd: **12. ábra**).

Izolátumgyűjteményünkben 13 db *Pyrenophora graminea* törzset azonosítottunk, aminek nagyobb része (11 db, 84,6%) a nyugati régióból származik, egy-egy izolátumot pedig a délkeleti és az északnyugati régiókból. 2010 kivételével minden évben gyűjtöttünk. A PCR-vizsgálat során a várt 435 bp méretű DNS-terméket kaptunk a PG-re specifikus indítószekvenciák (PG2-F/PG2-R) esetében, valamint a PTM primerekkel is mutattak kisebb mennyiségben DNS-terméket. Az izolátumok minden esetben alaptól induló hosszanti nekrotikus csíkokról származtak.



17. ábra *P. teres* f. *teres* (PTT), *P. teres* f. *maculata* (PTM) és *P. graminea* (PG) eloszlása Magyarországon különböző években

5.2.2 Párosodási típusok eloszlása

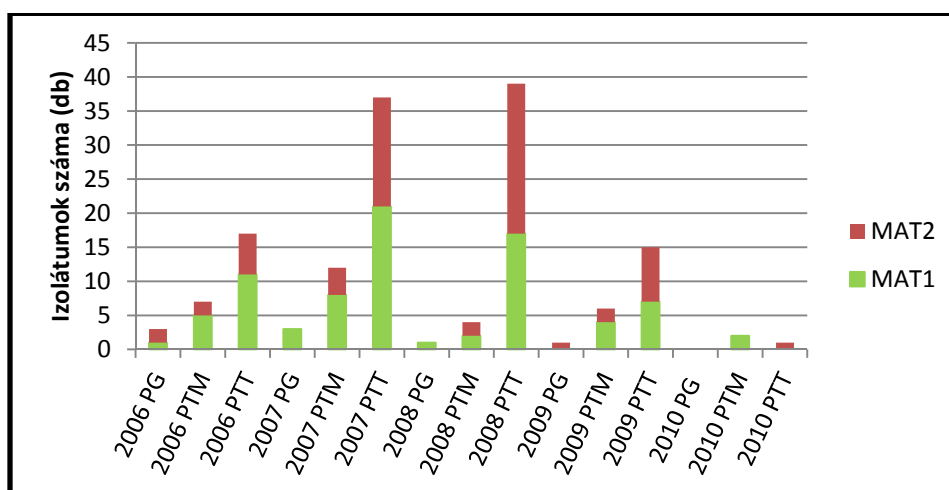
Összesen 8 PG, 31 PTM és 109 PTT izolátum párosodási típusát határoztuk meg és vizsgáltuk azok eloszlását különböző régiókban (**8. táblázat**), gyűjtési években (**18. ábra**) és gazdanövényeken (**9. táblázat**).

A vizsgált 8 *P. graminea* izolátum közül 5 a MAT1 és 3 a MAT2 párosodási típushoz tartozott. Nagyobb arányban (6 db) a nyugati régióból származtak az izolátumok. A 2006-ban gyűjtött táplánszentkereszti *graminea* izolátumok esetében mindkét párosodási típust megtaláltuk. Az éves eloszlás tekintetében: 2006-ban 1:2, 2007-ben 3:0, 2008-ban pedig 1:1 volt a MAT1:MAT2 aránya.

A vizsgált 31 *P. teres f. maculata* izolátum 68%-a MAT1 míg 32%-a MAT2 párosodási típushoz tartozott. Tekintetbe véve a teljes gyűjtési periódust a párosodási típusok eloszlása és a vizsgált PTM izolátumok száma sem volt azonos a különböző régiókban: a központi régióhoz tartozó 4 db PTM-törzs a MAT1 típushoz tartozott, a délkeleti régióban 5 db MAT1 és 4 db MAT2, az északkeleti régióból 2 db MAT1 és 3 db MAT2, míg a nyugati régióban 10 db MAT1 és 3 db MAT2 izolátumot azonosítottunk (**8. táblázat**). A 2006-ban begyűjtött búzáról származó bólyi mintáknál, valamint a 2009-es táplánszentkereszti árpáról származó izolátumok esetében szintén találtunk különböző párosodási típusba tartozó azonos területről származó izolátumokat. A legtöbb évben többségben volt a MAT1 párosodási típus (**12. ábra**), 2006-ban 5:2, 2007-ben 8:4, 2008-ban 2:2, 2009-ben 4:2 és 2010-ben 2:0 volt a két párosodási típus előfordulása.

8. táblázat *P. graminea* (PG), *P. teres f. maculata* (PTM) és *P. teres f. teres* (PTT) izolátumok párosodási típusainak eloszlása a gyűjtési régiókban

Kórokozó	MAT1/MAT2 párosodási típusok száma			
	Nyugati régió	Délkeleti régió	Északkeleti régió	Központi régió
PG	4/2	1/0	0/1	-
PTM	10/3	5/4	2/3	4/0
PTT	14/19	20/9	13/14	9/11
Összes	28/24	26/13	15/18	13/11



18.ábra A párosodási típusok eloszlása különböző években (PTT – *P. teres f. teres*; PTM – *P. teres f. maculata*; PG – *P. graminea*)

A legtöbb (109 db) azonosított párosodási típusú izolátum a *Pyrenophora teres f. teres*hez tartozott, közöttük összesen 56 db MAT1 (51%) és 53 db MAT2 (49%) típusú volt, de 2006-ban és

2007-ben a MAT1 volt többségben (11:6 és 21:16), míg 2008-ban a MAT2 fordult elő gyakrabban (17:22). A 2009-es évben azonos arányban fordult elő a két párosodási típus (7:7), 2010-ben pedig csak két vizsgált izolátumunk volt, ami a MAT2 párosodási típushoz tartozott (**18. ábra**). Hasonlóan a PTM-hez, a párosodási típusok aránya a PTT populáción belül nem azonos régiókon belül: a MAT2 típus volt a kiemelkedő a nyugati, az északkeleti és a központi régiókban, míg ellenkező volt a helyzet a délkeleti régióban ahol az MAT1 párosodási típus volt nagyobb számban. Azonos területről, de különböző párosodási típusba tartozó izolátumokat azonosítottunk: 2006-ban bolyi, valamint székkutasi búza mintáknál, 2007-ben Kiszombor-Makó területéről származó őszi árpa, valamint táplánszentkereszti búzáknál, 2008-ban martonvásári, tordasi és kocsi őszi árpa, továbbá táplánszentkereszti tavaszi árpa esetében. 2009-ben és 2010-ben a táplánszentkereszti őszi és tavaszi árpák vizsgálata során találtunk azonos területen különböző párosodási típusba tartozó izolátumokat.

Ahogy korábban említettük, a legtöbb (70 db, 48%) PTT izolátum őszi árpáról származik, míg 28%-a (41 db) búzáról és 24% (35 db) tavaszi árpáról. Minden gazdanövény esetében a MAT1 volt gyakoribb, bár nem szignifikáns mértékben, vagyis a búza esetében 24:17, az őszi árpa esetében 38:32, a tavaszi árpa esetében pedig 18:17 volt a két párosodási típus aránya (**9. táblázat**).

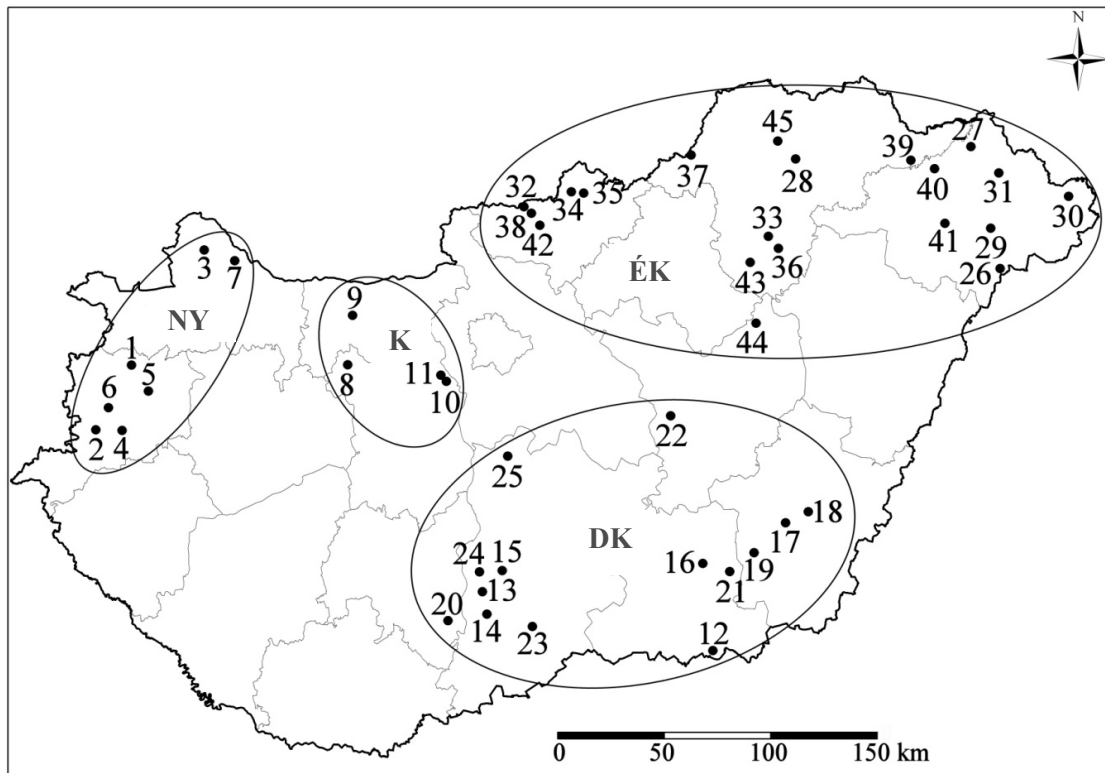
9. táblázat A párosodási típusok eloszlása *Pyrenophora* spp. belül különböző gazdanövényeken

Kórokozó	MAT1/MAT2 párosodási típusok száma			
	Búza	Tavaszi árpa	Őszi árpa	Összesen
<i>P. graminea</i>	-	1/1	4/2	5/3
<i>P. teres f. maculata</i>	6/4	6/3	9/3	21/10
<i>P. teres f. teres</i>	18/13	11/13	25/27	54/53
Összesen	24/17	18/17	38/32	80/66

5.2.3 A *Pyrenophora teres f. teres* genetikai variabilitása RAPD-mintázatok alapján

A RAPD-vizsgálatba összesen 81 monospórás hazai *P. teres* izolátumot vontunk be, melyeket különböző típusú nekrotikus tüneteket mutató árpa levelekről gyűjtöttünk. Tünetek alapján előzetesen föltételeztük, hogy a kiválasztott izolátumok a *P. teres f. teres* képviselik, azonban specifikus PCR-rel csak 68 izolátumról igazolódott föltételezésünk. Eme 68 törzs tipikus hálózatos foltokról, néhány mm-es apró nekrotikus pettyektől, vagy a levél különböző részein található 1–2,5 cm hosszúságú érközi nektrózisokról származtak. Tizenhárom izolátum, melyek

kizárólag pontszerű nektrózisokról vagy rövid hosszúságú nektrózisról származtak, a *P. teres* f. *maculata*hoz tartozott. A hatvannyolc PTT izolátumot 43 árutermelő üzemi tábláról és 4 kísérleti állomásról gyűjtöttük összesen 45 helyszínről 4 földrajzi régióban (nyugati, központi, délkeleti és északkeleti) (10. táblázat, 19. ábra). Praktikus okokból az egy kísérleti állomáson belül mintázott parcellákat egy táblának tekintettük a parcellák közötti kis távolságok (max. 1 km) és az azonos agronómiai kezelések miatt. Egy izolátumot gyűjtöttünk 2006-ban, tizenhatot 2007-ben, harmincötöt 2008-ban, tizennégyet 2009-ben és kettőt 2010-ben.



19. ábra Magyarország térképe az izolátumok gyűjtési helyeivel (fekete pont) és a földrajzi régiókkal (NY=Nyugati, K=Központi, DK=Délkeleti, ÉK=Északkeleti). A pontok melletti szám azonosítja a gyűjtési helyet a 10. táblázatban.

10. táblázat A vizsgálatba vont *Pyrenophora teres* f. *teres* izolátumok eredete és párosodási típus

Törzskód	Gyűjtés ideje	Gyűjtés helye	Terület jellege	Árpa fajtája, nemesítési foka	Párosodási típus
Nyugati régió					
H-230	2007/06/13	Chernelházadamonya (1)	Ü	Jubilant	1
H-196	2007/06/12	Egyházasrádóc (2)	Ü	Ismeretlen	2
H-169	2007/04/03	Mosonmagyaróvár (3)	K	KH Korsó	2
H-198	2007/06/13	Püspökmolnári (4)	Ü	Pasadena	2
H-231	"	Sárvár (5)	Ü	Coralba	2
H-185 ¹	2007	Táplánszentkereszt (6)	K	Ismeretlen	1
H-306/1 ¹	2008/06/18	"	K	Henley	2
H-294 ¹	"	"	K	Ismeretlen	1
H-296 ¹	"	"	K	gks 419	2
H-303 ¹	2008/06/24	"	K	Sebastian	1
H-477	2009/05/26	Hédervár (7)	Ü	Ismeretlen	2
H-472	2009/06/07	Sárvár (5)	Ü	Scarlett	2
H-383/1 ¹	2009/06/22	Táplánszentkereszt (6)	K	Scarlett	2
H-393/1 ¹	"	"	K	GK Judy	1
H-396/1 ¹	"	"	K	Ismeretlen	2
H-497/3 ¹	2010/06/09	"	K	Pasadena	2
H-500/1 ¹	"	"	K	Mandolina	2
Központi régió					
H-112	2006/04	Mór (8)	Ü	Ismeretlen	2
H-327 ^{1,2,3}	2008/06/19	Kocs (9)	Ü	Ismeretlen	1
H-335 ^{1,2,3}	"	"	Ü	Ismeretlen	2
H-284 ¹	2008/05/16	Martonvásár (10)	K	Kh Turul	2
H-287 ¹	2008/05/16	"	K	F74-82/MANAS/ /SZD4002	2
H-288 ¹	"	"	K	20899YH2/Petra	2
H-313/1 ¹	"	"	K	Petra	2
H-317/1 ¹	"	"	K	Nelly	1
H-321/1 ¹	"	"	K	KH Center	2
H-322 ¹	2008/06/10	"	K	Ismeretlen	2
H-310/2 ¹	2008/06/12	Tordas (11)	K	Ismeretlen	1
H-314/1a	"	"	K	Ismeretlen	2
H-323 ¹	"	"	K	Ismeretlen	1
H-324/1 ¹	"	"	K	Ismeretlen	2
H-325 ^{1,2,3,4}	"	"	K	Ismeretlen	1
H-336 ^{1,2,3,4}	"	"	K	Ismeretlen	1
Délkeleti régió					
H-159	2007	Kiszombor-Makó (12)	Ü	Ismeretlen	2
H-201	2007/07/11	Miske (13)	Ü	Ismeretlen	1
H-200	2007/06/08	Nemesnádudvar (14)	Ü	Ebson	2
H-204	2007	Öregcsertő (15)	Ü	Rex	1
H-463	2008/05/28	Derekegyház (16)	Ü	Ismeretlen	1
H-337	2008/05/26	Kétsoprony (17)	Ü	KH Tas	1
H-339	2008/05/27	Murony (18)	Ü	Rex	2

H-357	2008/05/27	Orosháza (19)	Ü	Botond	1
H-469	2008/06/06	Ócsény (20)	Ü	Rex	1
H-308/2	2008/05/22	Székkutas (21)	K	Ismeretlen	2
H-282	2008/04	Szolnok (22)	Ü	Nelly	1
H-447	2009/06/02	Jánoshalma (23)	Ü	Rex	1
H-478	2009	Kalocsa (24)	Ü	Ismeretlen	1
H-410/2	2009/06/02	Kunszentmiklós (25)	Ü	Ismeretlen	2

Északkeleti régió

H-192	2007/0604	Bátorliget (26)	Ü	Palinka	1
H-189	"	Fényeslitke (27)	Ü	Ismeretlen	2
H-209	2007/06/07	Halmai (28)	Ü	Scarlett	2
H-191	2007/06/04	Hodász (29)	Ü	KH Viktor	2
H-186	"	Kölcse (30)	Ü	Petra	1
H-190	"	Nagyvarsány (31)	Ü	Palinka	2
H-464	2008/06/09	Balassagyarmat (32)	Ü	Laverda	2
H-377	2008/06/19	Emőd (33)	Ü	Candesse	1
H-359	2008/06/09	Endrefalva (34)	Ü	Maress	2
H-358	"	Karancsság (35)	Ü	Ismeretlen	1
H-340/1	2008/06/19	Igrici (36)	Ü	Candesse	2
H-360	2008/06/18	Sajópüspöki (37)	Ü	Pasadena	2
H-462	2008/06/09	Szügy (38)	Ü	Vanessa	1
H-361	2008/06/17	Tiszakarád (39)	Ü	Ismeretlen	2
H-458	2008/06/10	Ujdombrád (40)	Ü	Ismeretlen	2
H-428	2009/06/07	Apagy (41)	Ü	Ismeretlen	1
H-438	2009/06/05	Cserháthaláp (42)	Ü	Ebson	2
H-429	2009/06/04	Karancsság (35)	Ü	Jubilant	1
H-473	2009/06/16	Mezőkeresztes (43)	Ü	Mauritia	2
H-433	2009/06/17	Tiszaszőlős (44)	Ü	Imperial	1
H-426	2009	Tomor (45)	Ü	Ismeretlen	1

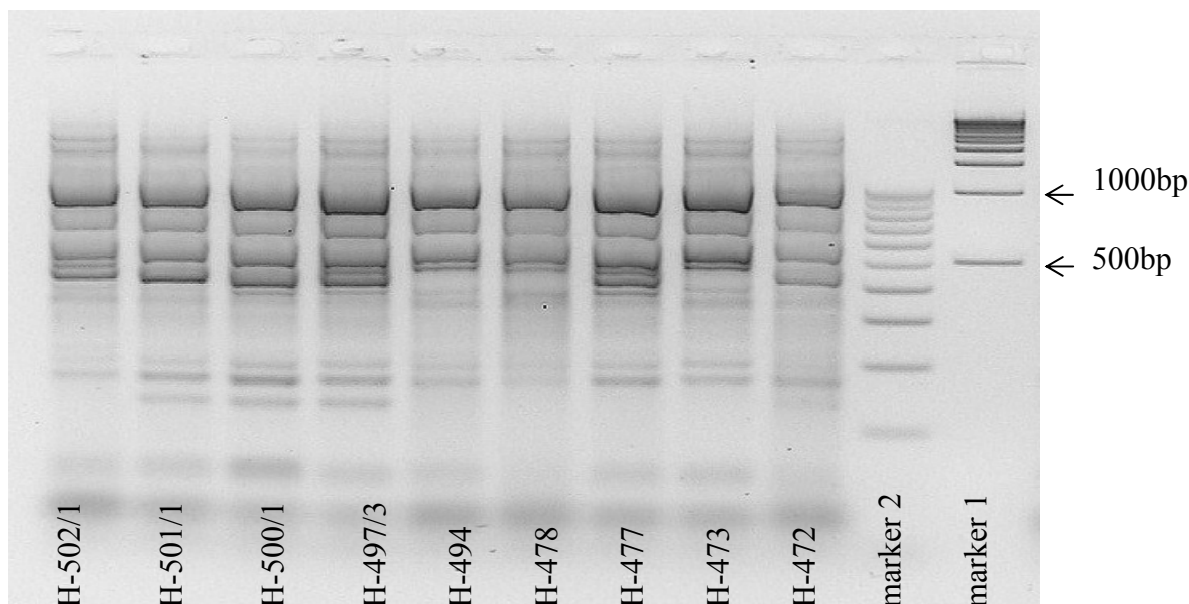
^aMegjegyzés: a törzskód utáni szám jelzi, ha az azonos helyszínen gyűjtött izolátumok azonos tábláról (¹), parcelláról (²), levélről (³) vagy nekrózisról (⁴) származtak.

^bA zárójelbe tett számok segítségével a 13. ábrán jelölt gyűjtési helyek azonosíthatóak.

^cÜ = üzemi, K = kísérleti.

^dPárosodási típus: 1 = MAT1, 2 = MAT2.

A 68 PTT izolátumban összesen 171 (91%) polimorf és 17 (9%) monomorf RAPD-fragmentet azonosítottunk, amelyek méretei 100 és 3000 bp között változtak. Az ampliconok száma lokuszonként átlagosan 1,9 volt. A összes RAPD-fragmentum száma különböző primerkombinációk esetén 7 (OPA14/OPE03) és 19 (OPG04/OPB01) között változott, azaz átlagosan 12,5 fragmentum jelent meg primerkombinációként. Minden izolátum egyedi többlokuszos RAPD-haplotípusba tartozott. A normalizált Shannon-index a maximális 1 értéket mutatta, és a Simpson-index (0,0147) közelített a nullához, mutatva a magas fokú genetikai változékonyságot.

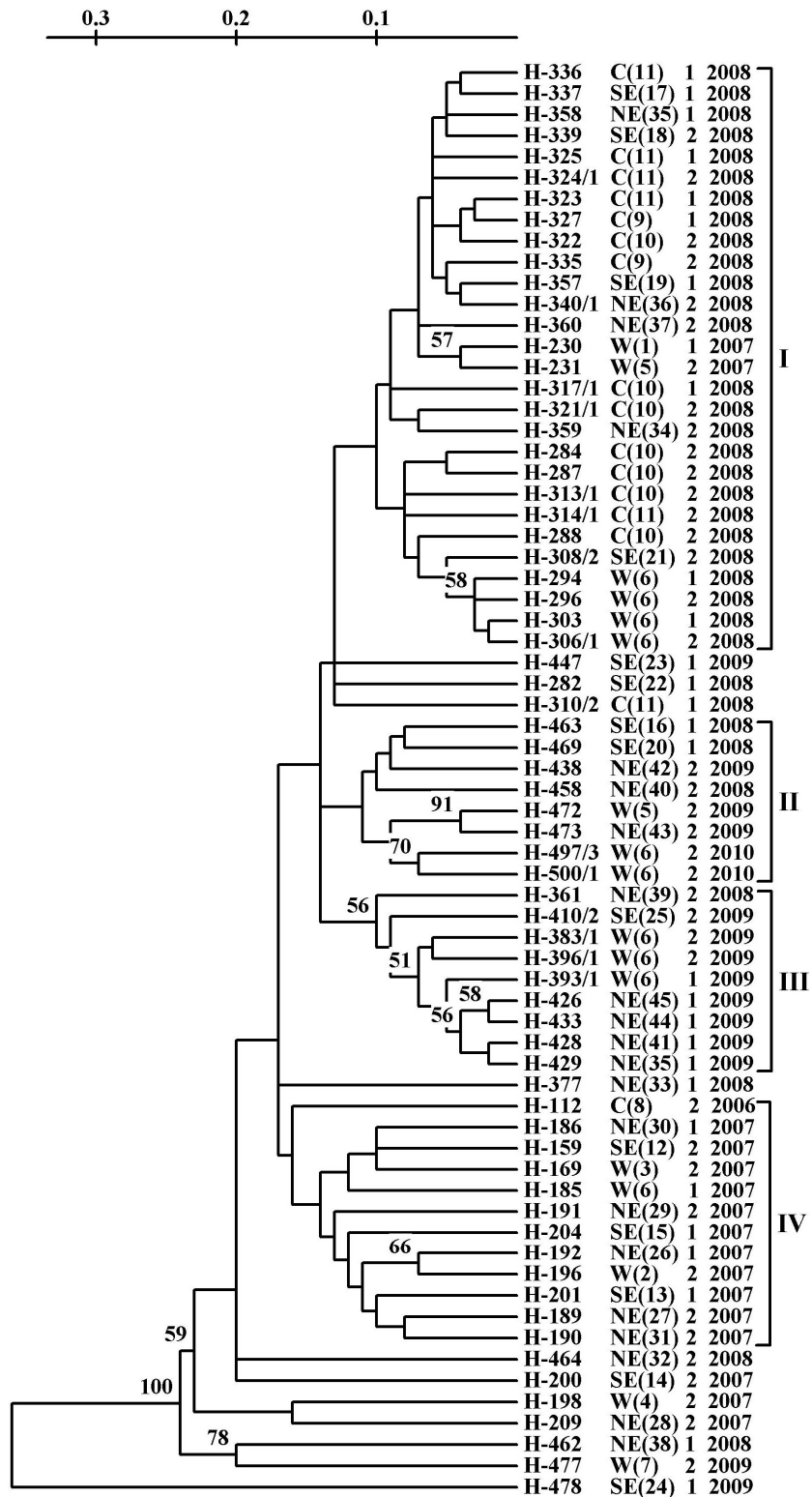


20. ábra Gélképrészlet az OPH03-OPE16-os indítószekvenciákkal kapott RAPD-termékekről (DNS molekulásúly marker1: 1kbp Ladder (SIGMA), 2: PCR 100bp Low Ladder (SIGMA))

Az izolátumok genetikai rokonságát UPGMA klaszter analízissel vizsgáltuk, melyet a **21. ábra** szemléltet. A vizsgált 68 PTT izolátum genetikai távolsága 1,6 és 36% között mozog (átlagosan 9,5%). Ötvenhét izolátum 4 főbb csoportot alkotott (I.–IV. klaszter). Általános összefüggést a kládstruktúra és az izolátumok párosodási típusai vagy származási régiói között nem találtunk, mivel minden klád tartalmazta mindkét párosodási típust, s több régiót képviselt. A II. és III. klaszterek izolátumai három földrajzi régióból, míg az I. és IV. klaszterek tagjai mind a négy régióból származó izolátumot tartalmaztak. Csekély mértékű földrajzi eredet szerinti csoportosulást figyeltünk meg néhány alklaszterben. Például az I. klaszter 6 nyugati régióból származó izolátumból négy (H-294, H-296, H-303, H-306/1), valamint 14 központi régióbéli izolátumából három (H-322, H-323, H-327) egy-egy kisebb alklaszterbe tömörült. Továbbá a III. klaszter 5 északkeleti izolátumából négy (H-426, H-428, H-429, H-433) csoportosult egymással azonos alklaszterbe. Érdekes, hogy a I. III. és IV. klaszterek izolátumainak zöme azonos évben lettek gyűjtve, míg a II. klaszterben három termesztési időszak is megjelenik (2008, 2009 és 2010). Kettő kivételével minden izolátum 2008-ból származik az I. klaszterben. A III. klaszter nyolc 2009-es izolátumot, valamint egy darab 2008-as izolátumot (H-361) tartalmaz, mely tisztán elkülönül a klád többi tagjától. A IV. klaszterben a 2007-ben gyűjtött izolátumok, plusz egy távoli rokonságban álló 2006-os izolátum (H-112) tartozik. Talán meglepő, hogy nem azok az izolátumok genetikai rokonsága a legszorosabb, melyek azonos levélről származtak. Az azonos levélről, de eltérő léziókról származó és különböző párosodási típusba tartozó H-327 és H-335 izolátumok az I. klád

két szomszédos alkkládjában jelentek meg, de az ugyanazon lézióról származó és azonos (MAT1) párosodási típusú H-325 és H-336 izolátumok is tisztán elkülönültek egymástól az I. klaszterben.

A Nei-féle géndiverzitás analízis (**11. táblázat**) rávilágított, hogy az egyes mintaegységeken (párosodási típusok, táblatípusok, régiók, évek) belüli genetikai diverzitás felel azok teljes géndiverzitásának nagy részéért, míg a mintaegységek között a teljes diverzitásnak csak kis hányada található. Mind az egyes mintaegységeken belüli átlagos géndiverzitás ($H_S=0,12849-0,16729$), mind pedig azok teljes géndiverzitása ($H_T=0,13922-0,18353$) hasonló nagyságrendű. A MAT1 és MAT2 izolátumok között az allélgyakoriságban elhanyagolható, statisztikailag nem igazolt különbséget találtunk ($G_{ST}=0,01379$, G^2 nem szignifikáns nagyon magas $P=0,1684$ érték mellett). Kicsi, ugyanakkor erősen szignifikáns különbséget figyeltünk meg az üzemi és a kísérleti parcellákról származó minták között ($G_{ST}=0,03643$), illetve a négy földrajzi régióból származó minták között ($G_{ST}=0,07567$), mindkét esetben $P < 0,0001$ értékkel a G^2 -tesztben. Ez azt jelenti, hogy legalább egy régióból származó PTT alpopuláció szignifikánsan eltér a többi régió alpopulációjától. A régiók páronkénti regionális összehasonlításakor mindegyik régió között statisztikailag igazolt eltéréseket találtunk az allélgyakoriságokban ($G_{ST}=0,03104-0,08195$, $P \leq 0,0111$). A legnagyobb genetikai differenciáltságot a 2007, 2008 és 2009 során gyűjtött minták között mértük ($G_{ST}=0,16558$, $P < 0,0001$), ami azt jelenti, hogy a teljes géndiverzitás kb. 16,5%-át az évjáráthatás okozta a megvizsgált *P. teres* mintákban. A három év páronkénti összehasonlítása is szignifikáns eltérést mutatott, 10,68–14,88% ($P < 0,0001$).



21. ábra PTT izolátumok NEI és LI (1979) genetikai távolság koefficiensen alapuló UPGMA-fenogramja. Az egyes elágazások statisztikai megbízhatóságát a mellettük található bootstrap értékek jelzik (csak az 50% feletti értékeket tüntettük föl). Az ágak végén az izolátumkód, régió (NE–Északkeleti, SE–Délkeleti, W–Nyugati, C–Központi) és zárójelben a gyűjtés helyének sorszama, párosodási típus és gyűjtés éve található. Skála jelzi a genetikai távolság mértékét.

11. táblázat Nei-féle géndiverzitás és genetikai differenciáltság a *P. teres* f. *teres* izolátumok különböző mintavételi egységeiben

Mintavételi egység	H _S	H _T	D _{ST}	G _{ST}	G ²	P érték
Párosodási típus (MAT1:MAT2)	0.1573	0.1595	0.0022	0.01379	188.7	0.1684
Táblatípus (üzemi:kísérleti)	0.1481	0.1537	0.0056	0.03643	319.5*	<0.0001
Régiók						
Összes	0.1478	0.1599	0.0121	0.07567	739.7*	<0.0001
nyugati:központi	0.12849	0.13922	0.01073	0.07707	276.4*	<0.0001
délkeleti:északkeleti	0.16729	0.17265	0.00536	0.03104	198.6*	0.0089
nyugati:délkeleti	0.16497	0.17188	0.00691	0.04020	205.7*	0.0047
központi:északkeleti	0.13073	0.1424	0.01167	0.08195	315.9*	<0.0001
nyugati:északkeleti	0.15313	0.15897	0.00584	0.036736	181.03*	0.0111
központi:délkeleti	0.14245	0.15047	0.00802	0.0533	251.5*	<0.0001
Évek						
2007:2008:2009	0.1411	0.1691	0.028	0.16558	1072.5*	<0.0001
2007:2008	0.15354	0.1767	0.02316	0.13107	570.47*	<0.0001
2007:2009	0.15621	0.18353	0.02732	0.14885	537.72*	<0.0001
2008:2009	0.14143	0.15831	0.0273	0.1068	455.94*	<0.0001

Megjegyzés: H_S= mintaegységen belüli átlagos géndiverzitás; H_T= mintaegységen belüli teljes géndiverzitás; D_{ST}= mintaegységek közötti abszolút géndiverzitás; G_{ST}= teljes géndiverzitiáshoz viszonyított relatív géndiverzitás

5.2.4 A *P. teres* és a *P. graminea* filogenetikai rokonsága

5.2.4.1 Polimorfizmusok a *P. teres f. teres*, *P. teres f. maculata* és *P. graminea* vizsgált izolátumaiban

A *Pyrenophora tritici-repentis* WAC11137 külcsoportot is tartalmazó illesztett szakaszok hossza: aktin 762 bp, β -tubulin 508 bp, *gpd* 596 bp, ITS1-5,8S-ITS2 509 bp, így a többgénés illesztés teljes hossza 2375 nukleotid volt. A PTM_SG1-1 és PTT_0-1 izolátumok ITS1 régiójának elejéről (5' végéről) 17, illetve 14 db nukleotid hiányzott. Mivel e két izolátum nem állt rendelkezésünkre, csak szekvenciáikat kaptuk meg egy ausztrál kutatócsoporttól, a hiányzó helyeket a DNS-t felépítő bármelyik 4 nukleotid előfordulását megengedő „N” betűkóddal töltöttük ki.

A 13 db PG izolátumban nyolc, a szintén 13 db PTM izolátumban hét, a 15 db PTT izolátumban hat különböző többgénés szekvencia-haplotípust azonosítottunk, de a három kórokozó között nem volt közös többgénés szekvenciatípus és összességében kicsi változékonyságot mutattak (12. és 13. táblázatok).

Az aktin partícióban 3 pozícióban (p.) voltak eltérések, közülük kettő pontmutáció csak a 3PG-jelű izolátumot érintette (p. 171-ben „C” helyett „T”, illetve p. 656-ban „A” helyett „G”), míg a 671-es pozícióban a PG és PTM izolátumok „A” vagy „G” nukleotidot, a PTT-k kizárólag „A”-t tartalmaztak. Az aktin szekvenciákat 3 haplotípusba lehetett sorolni (Akt-1–3), a 13 db PG izolátum mindháromat tartalmazta, a szintén 13 db PTM izolátum kettőt, míg a 15 db PTT izolátum teljesen homogén volt erre a génre. Az úgynevezett Akt-1 haplotípus a PG-törzsekben volt gyakoribb, az Akt-2 pedig a *P. teres* két formájában.

A β -tubulin partícióban összesen 5 polimorf helyet azonosítottunk, melyek közül a 773-as és az 1210-es a PG izolátumokban „C”-t, ill. „T”-t tartalmaztak, ellenben a *P. teres*ek csak „G”-t, illetve csak „C”-t. A partíció szekvenciáit 4 haplotípusba (Btub-1–4) lehetett sorolni. A PG monomorfnek mutatkozott. A 26PTM és 21PTT egyedülként tartalmaztak azonos haplotípust, a maradék PG, PTM és PTT izolátumok pedig kórokozónként más-más haplotípusokat képviseltek.

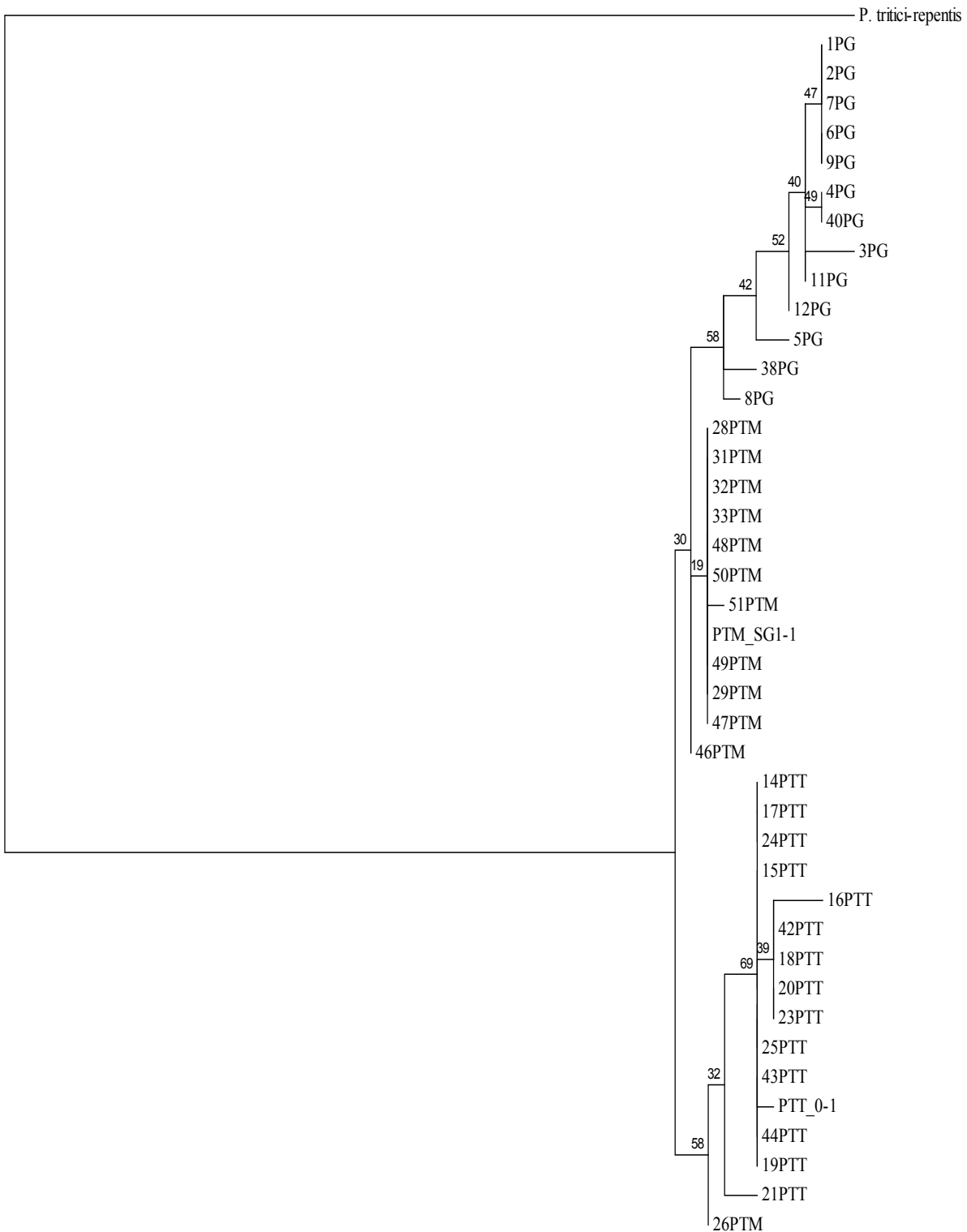
A *gpd*-partícióban összesen 7 polimorf helyet figyeltünk meg, közülük kettőben (1538. és 1589.) mindössze a 3PG és 8PG izolátumokat érintő egy-egy pontmutáció okozott változékonyságot a három árpapatogén között. Érdekeség, hogy az 51PTM izolátum két helyen is tartalmazott kettős nukleotidokat: az 1511-es pozícióban C+T (=Y), az 1518-asban G+T (=K) fordult elő. Összesen 9 haplotípust határoztunk meg (*gpd*-1–9), melyből a PG összesen 6, a PTM és PTT pedig 3–3 különböző *gpd*-haplotípust tartalmazott. Mindhárom kórokozóban előforduló közös *gpd*-szekvenciát nem találtunk, de páronként akadt egy-egy: a 38PG több PTM izolátummal, a 26PTM több PTT izolátummal, a 16PTT pedig több PG-törzssel osztozott ugyanazon a szekvencián.

Az ITS1-5.8S-ITS2 partícióban 15 polimorf helyet azonosítottunk, melyek közül összesen 8 tartalmazott kihagyásokat is az ITS1-ben (p. 2011–2014) vagy az ITS2-ben (p. 2365–2368). Ezen a nyolc helyen a kihagyásokon kívül csak „T” fordult elő valamennyi izolátumban. Pontmutációkat 3 izolátumban figyeltünk meg: az 5PG izolátum az 1884-es pozícióban tért el a többitől (A helyett G), a 21PTT az 1894-es és 1911-es pozíciókban sajátos (T helyett C), az 51PTM-nek pedig a 2357. helyen egyedi (T helyett C). A 43PTT izolátumban C+T (Y) egyaránt előfordult a 2310-es pozícióban. Haplotípusok száma 13 volt (ITS-1–13). A PG- és PTM-törzsek 4–4, a PTT izolátumok pedig 5 különböző ITS-haplotípust képviseltek. A három kórokozó bármelyik párosa között nem volt azonos ITS-szekvencia.

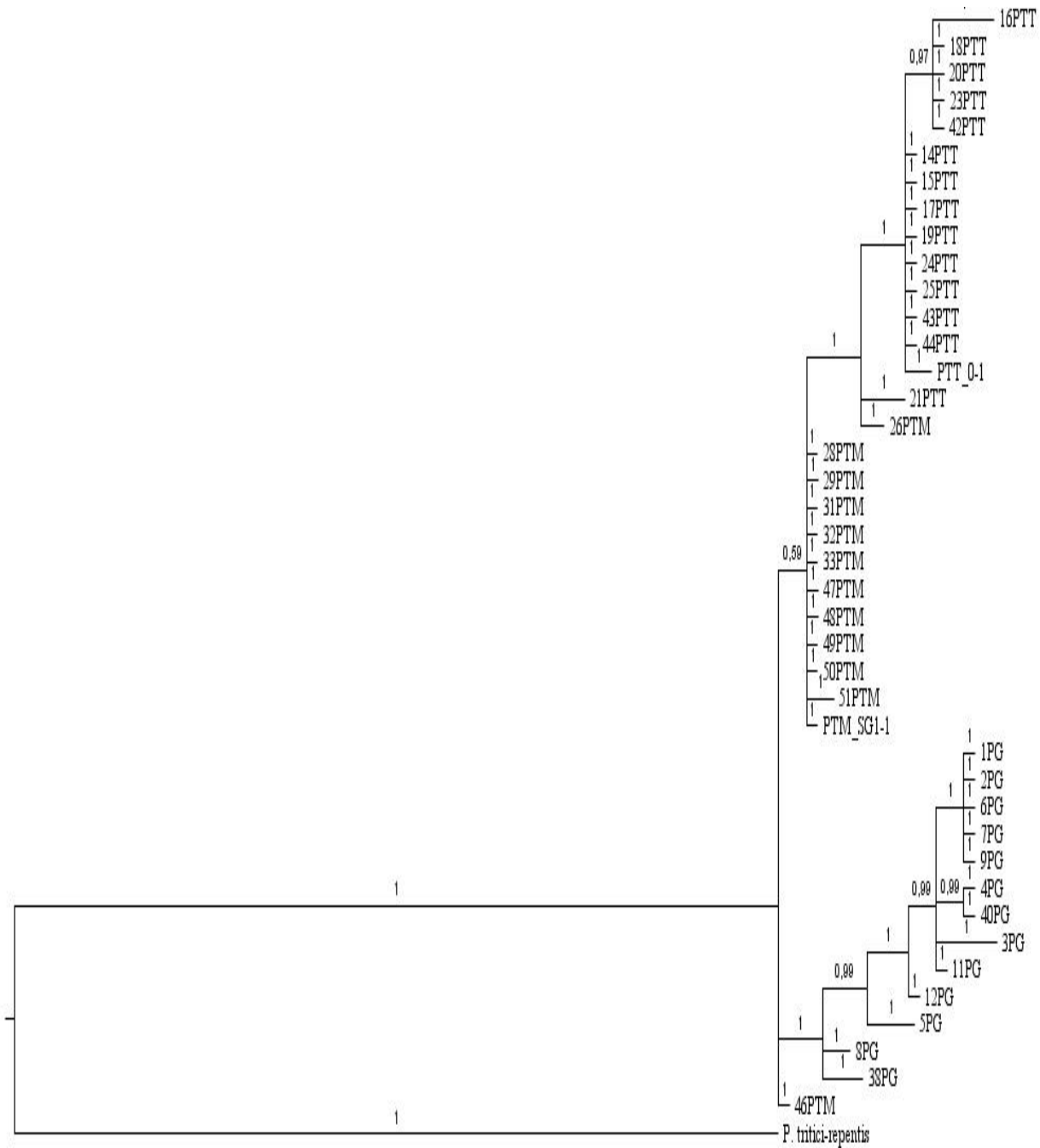
5.2.4.2 A *P. teres f. teres*, *P. teres f. maculata* és *P. graminea* filogenetikai kapcsolatai Maximum Likelihood (ML) és Bayesian analízissel

A többgénes szekvenciákból készített *P. tritici-repentis*hez gyökereztetett ML-törzsfá a **22. ábrán** látható. Három fő csoportot lehetett elkülöníteni, alapvetően a 3 kórokozó szerint csoportosultak izolátumaink. Mindössze a 26PTM izolátum helyzete nem felelt meg ennek, mert határozottan elkülönült a *f. maculata*tól és a közös őstől a *f. teres*ekhez vezető ágon a bazális taxont alkotta. Az ML-fa szerint a 3 kórokozó közös őstől a *P. teres* (és a 26PTM izolátum) önálló, míg a *P. graminea* és *P. teres f. maculata* pedig egy ideig még közös evolúciós utat követett utóbbi kettő taxon szétválásáig. A kulcsozorthoz vezető gyökér kivételével egyetlen elágazás bootstrap-értéke sem érte el a statisztikai megbízhatósághoz általában minimálisan megkívánt 70%-ot.

A BAYES-módszerrel készített törzsfá a **23. ábrán** látható. Ennek ágszerkezete részben megegyezik az ML-fával, az izolátumok többsége szintén a 3 kórokozónak megfelelő csoportokba tömörült, és a 26PTM izolátum szintén a PTT-khez csoportosult. Ugyanakkor ellentétben az ML-módszerrel, a Bayesian analízis szerint a 3 kórokozó közös őstől indulva a *P. graminea* (és a 46PTM izolátum) követett önálló evolúciós utat, a *P. teres f. maculata* és *P. teres f. teres* pedig egy ideig még közösen fejlődtek szétválásukig. A PTM-csoporton belül viszont túlnyomórészt nem dichotómiás elágazásokat kaptunk, azaz a leszármazási kapcsolatokat e kórokozóban nem sikerült felbontani ezzel a módszerrel. A 46 PTM izolátum helyzete azért meglepő, mert az ML-analízissel ellentétben a Bayesian módszer szerint egy ideig a *P. graminea* irányába fejlődött, majd attól határozottan elvált. Az elágazások statisztikai megbízhatóságára utaló Bayesian-féle utólagos valószínűségi értékek a PTM-ek és PTT-k szétválási pontja kivételével, jóval meghaladták megbízhatósághoz általában minimálisan megkívánt 90%-ot.



22. ábra *P. teres* f. *teres* (PTT), *P. teres* f. *maculata* (PTM) és *P. graminea* (PG) izolátumok filogenetikai kapcsolatait ábrázoló Maximum Likelihood törzsfa. Az elágazások statisztikai megbízhatóságát a mellettük található bootstrap értékek jelzik. A fát a *P. tritici-repentis* (WAC11137) kulcsoporthoz gyökerezítettük. Skála jelzi az illesztett szekvenciák egy pozíciójára eső nukleotid szubsztitúciók átlagos számát.



0.0020

23. ábra *P. teres* f. *teres* (PTT), *P. teres* f. *maculata* (PTM) és *P. graminea* (PG) izolátumok filogenetikai kapcsolatait ábrázoló Bayesian törzsfa. Az elágazások statisztikai megbízhatóságát a mellettük található utólagos valószínűségi (posterior probability) értékek jelzik. A fát a *P. tritici-repentis* (WAC11137) kulcsoporthoz gyökerezítettük. Skála jelzi az illesztett szekvenciák egy pozíciójára eső nukleotid szubsztitúciók átlagos számát.

12. táblázat A *Pyrenophora graminea* (PG), *P. teres* f. *maculata* (PTM) és *P. teres* f. *teres* (PTT) vizsgált izolátumaiban tapasztalt nukleotid-polimorfizmusok a *P. tritici-repentis* külső csoportot is tartalmazó többgénés illesztett szekvenciákban. „.” jelöli az 1PG izolátummal azonos nukleotidokat, míg „-” jelöli a kihagyásokat (gap-eket).

Különböző többgénés szekvenciatípusokat képviselő izolátumok	Genomszakasz és pozíció a többgénés illesztésben																																		
	Aktin				β -tubulin					gpd								ITS																	
	171	656	671	Aktin-haplotípus	773	1020	1121	1183	1210	β -tubulin-haplotípus	1413	1511	1515	1518	1519	1538	1589	gpd-haplotípus	1884	1894	1905	1911	2001	2010	2011	2012	2013	2014	2357	2365	2366	2367	2368	ITS-haplotípus	
1PG, 2PG, 6PG, 7PG, 9PG	C	A	G	Akt-1	C	C	C	C	T	Btub-1	T	C	G	G	G	G	G	gpd-1	A	T	G	T	C	T	T	-	-	-	T	T	T	-	-	ITS-1	
3PG	T	G	.	Akt-3	Btub-1	T	.	gpd-5	A	.	.	-	-	-	.	-	-	-	-	-	ITS-2	
4PG, 40PG	.	.	A	Akt-2	Btub-1	gpd-1	A	.	-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	ITS-2	
5PG	.	.	A	Akt-2	Btub-1	C	.	.	.	A	.	gpd-6	G	.	T	.	A	.	-	-	-	-	.	.	.	T	-	-	ITS-3	
8PG	.	.	.	Akt-1	Btub-1	C	.	A	T	A	.	A	gpd-7	.	.	T	.	A	.	-	-	-	.	-	-	-	-	-	ITS-4	
11PG	.	.	.	Akt-1	Btub-1	gpd-1	A	.	-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	ITS-2	
12PG	.	.	.	Akt-1	Btub-1	C	gpd-8	A	.	-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	ITS-2	
38PG	.	.	.	Akt-1	Btub-1	C	.	A	T	A	.	gpd-4	-	-	-	.	.	.	-	-	-	-	ITS-1	
26PTM	.	.	.	Akt-1	G	T	.	.	C	Btub-2	C	T	A	.	A	.	gpd-2	.	.	T	.	A	.	.	T	-	-	.	.	-	-	-	-	ITS-5	
28PTM, 29PTM	.	.	A	Akt-2	G	.	.	.	C	Btub-3	C	.	A	T	A	.	gpd-4	.	.	T	.	A	.	.	T	T	T	.	.	-	-	-	-	ITS-6	
31PTM, 49PTM, 50PTM	.	.	A	Akt-2	G	.	.	.	C	Btub-3	C	.	A	T	A	.	gpd-4	.	.	T	.	A	.	.	T	-	-	.	.	-	-	-	-	ITS-5	
32PTM, 33PTM, 47PTM, 48PTM	.	.	A	Akt-2	G	.	.	.	C	Btub-3	C	.	A	T	A	.	gpd-4	.	.	T	.	A	.	.	T	-	-	.	-	-	-	-	-	ITS-7	
46PTM	.	.	.	Akt-1	G	.	.	.	C	Btub-3	C	.	A	T	A	.	gpd-4	.	.	T	.	A	.	.	T	-	-	.	-	-	-	-	-	ITS-7	
51PTM	.	.	A	Akt-2	G	.	.	.	C	Btub-3	C	Y	A	K	A	.	gpd-9	.	.	T	.	A	.	.	T	-	-	C	-	-	-	-	-	ITS-8	
PTM_SG1-1	.	.	A	Akt-2	G	.	.	.	C	Btub-3	C	.	A	T	A	.	gpd-4	.	.	T	.	A	.	.	T	T	T	.	.	-	-	-	-	ITS-6	
14PTT, 15PTT, 17PTT, 19PTT, 24PTT, 25PTT, 44PTT	.	.	A	Akt-2	G	T	G	T	C	Btub-4	C	T	A	.	A	.	gpd-2	.	.	T	.	A	.	-	-	-	-	.	.	.	T	T	-	-	ITS-9
16PTT	.	.	A	Akt-2	G	T	G	T	C	Btub-4	gpd-1	.	.	T	.	A	.	-	-	-	-	.	.	.	T	T	-	-	ITS-9
18PTT, 20PTT, 23PTT, 42PTT	.	.	A	Akt-2	G	T	G	T	C	Btub-4	C	.	A	.	A	.	gpd-3	.	.	T	.	A	.	-	-	-	-	.	.	.	T	-	-	ITS-10	
21PTT	.	.	A	Akt-2	G	T	.	.	C	Btub-2	C	T	A	.	A	.	gpd-2	.	C	T	C	A	.	.	-	-	-	.	.	-	-	-	-	ITS-11	
43PTT	.	.	A	Akt-2	G	T	G	T	C	Btub-4	C	T	A	.	A	.	gpd-2	.	.	T	.	A	Y	-	-	-	-	.	.	.	T	T	-	-	ITS-12
PTT_0-1	.	.	A	Akt-2	G	T	G	T	C	Btub-4	C	T	A	.	A	.	gpd-2	.	.	T	.	A	C	-	-	-	-	.	.	.	T	T	-	-	ITS-13

13. táblázat A *Pyrenophora graminea* (PG), *P. teres* f. *maculata* (PTM) és *P. teres* f. *teres* (PTT) vizsgált izolátumaiban megfigyelt nukleotid-polimorfizmusok számszerűsítve. Az egyes nukleotidokat jelölő betűket követő számok adott nukleotid gyakoriságára utal. -” jelöli a kihagyásokat (gap-eket).

Kórokozó és izolátumszám	Aktin				β -tubulin					gpd							ITS																	
	171	656	671	Haplotípusok száma (db)	773	1020	1121	1183	1210	Haplotípusok száma (db)	1413	1511	1515	1518	1519	1538	1589	Haplotípusok száma (db)	1884	1894	1905	1911	2001	2010	2011	2012	2013	2014	2357	2365	2366	2367	2368	Haplotípusok száma (db)
PG (n=13)	C12 T1	A12 G1	A2 G10	3	C	C	C	C	T	1	C4 T9	C	A2 G11	G11 T2	A3 G10	G12 T1	A1 G12	6	A12 G1	T	G11 T2	T	A7 C6	T	T7 -6	-	-	-	T	T7 -6	T7 -6	T1 -12	-	4
PTM (n=13)	C	A	A11 G2	2	G	C12 T1	C	C	C	2	C	C11 T1 Y1	A	G1 T11 K1	A	G	G	3	A	T	T	T	A	T	T	T	-11 T3	-11 T3	T12 C1	T7 -6	-	-	-	4
PTT (n=15)	C	A	A	1	G	T	C1 G14	C1 T14	C	2	C14 T1	C5 T10	A14 G1	G	A14 G1	G	G	3	A	T14 C1	T	T14 C1	A	T13 C1 Y1	T1 -14	-	-	-	T	T	T14 -1	T14 -1	T10 -4	5

6 KÖVETKEZTETÉSEK

6.1 Atipikus tünetekről származó izolátumok azonosítása

A 2006 és 2010 között gyűjtött, pirenfórási tüneteket mutató árpa levelek vizsgálatai során talákoztunk olyan nekrotikus tünetekkel, melyeken egy pirenofórafaj ivartalan alakja sporulált, de a léziók nem hasonlítottak a *P. teres* f. *teres* tipikus hálózatos tüneteire, sem pedig a *P. graminea* levélsíkjaira. Ugyanakkor a léziókon képződött konídiumok nagyon hasonlítottak a *P. teres* konídiumaihoz. Összesen négy, szokatlan tünetekről származó izolátumot részletes morfológiai, patogenitási és molekuláris genetikai vizsgálatoknak vetettünk alá az ismeretlen kórokozó azonosítása céljából.

A konídiumok és konídiumtartók alapján ismeretlen identitású izolátumainkat nem tudtuk egyértelműen elkülöníteni az általunk alkalmazott PTT referenciatörzsektől annak ellenére, hogy a statisztikai próbák néhány mérettani paraméterben kicsi (néhány μm), de szignifikáns különbséget mutattak közöttük. E kis különbségek gyakorlati használati értéke a mindennapi fajsztű meghatározásban véleményünk szerint megkérdőjelezhető e képletek változékonysága miatt. Az atipikus tünetekről származó izolátumaink konídiumainak hosszúsága $89,1 \pm 10,2$, μm szélessége pedig $17,6 \pm 1,4$ μm volt átlagosan, mely adatok egybevágóak SIVANESAN (1987) és SHOEMAKER (1962) által vizsgált PTT izolátumok adataival. Az atipikus levéltünetekről származó kórokozó izolátumainkat nem lehetett elkülöníteni egymástól, sem a PTT referenciatörzsektől tenyésztésmorfológiájuk és telepnövekedési intenzitásuk alapján.

Patogenitási tesztekben valamennyi szokatlan tünetről származó izolátumunk fertőzőképesnek bizonyult, és néhány milliméteres, kissé megnyúlt, ovális, illetve ahhoz hasonló alakú levélfoltokat okoztak, melyek egyértelműen különböztek a kontroll PTT izolátumok hálózatos tüneteitől. Ez megerősítette, de még nem bizonyította föltevésünket, hogy ismeretlen izolátumaink nem a *P. teres* f. *teres*hez tartoznak. Specifikus PCR-vizsgálatokkal viszont kétséget kizáróan igazoltuk, hogy azok a *P. teres* f. *maculata*-t képviselik.

A *P. teres* f. *maculata* valamennyi lakott kontinens számos országában előfordul (pl. MÄKELÄ 1972, BOCKELMAN et al. 1983, CAMPBELL et al. 1999, WILLIAMS et al. 2001, PEREYRA és GERMÁN 2004). BAKONYI és JUSTESSEN (2007) korábban azonosítottak egy hazai izolátumot, mely RAPD-mintázata alapján föltehetően a *P. teres* f. *maculata*hoz tartozott, de az izolátumról nem állnak rendelkezésre morfológiai, patogenitási adatok. Egyéb források nem tesznek említést a patogén itthoni előfordulásáról, ezért munkánk tekinthető az első olyan leírásnak, amely tudományosan igazolja e gomba előfordulását Magyarországon. A kórokozót változatos

formájú levélfoltokról mutattuk ki, ami a tünetekre alapozott azonosítás nehézségeire utal, melynek legnagyobb gyakorlati szerepe a rezisztencianemesítés során végzett bonitálási munkában lehet. Mivel a *P. teres* két formájával szembeni növényi rezisztencia egymástól függetlenül is öröklődhet, és az árpa fajták ellenálló képessége eltérő a két kórokozóval szemben (KHAN és TEKAUZ 1982, AFANASENKO et al. 1995, HO et al. 1996), a *P. teres* f. *maculata* hazai jelenléte újabb kihívás a levélbetegségek elleni komplex rezisztencia kialakítását célzó nemesítői törekvésekkel szemben.

6.2 *A Pyrenophora graminea*, *P. teres* formák és párosodási típusaik gyakorisága, elterjedése Magyarországon

Vizsgálataink során összesen 208, pirenofórás tüneteket mutató levelet gyűjtöttünk különböző árpa, valamint búza fajtákról és nemesítési vonalakról összesen 73 különböző helyszínről 2006 és 2010 között. A legtöbb izolátumot 2007 és 2008-ban gyűjtöttük és a legtöbbet a nyugati (33%), valamint a délkeleti régióból (29%). A minták közel felét (49%) őszi árpáról, 26 %-át tavaszi árpáról és 25 %-át őszi búzáról izoláltuk.

A három kórokozó hazai eloszlását tekintve, a legtöbb (68%) izolátum *Pyrenophora teres* f. *teres* volt, míg *P. teres* f. *maculata* törzseből 53 db-ot (26%) azonosítottunk, mely izolátumok az ország különböző régióiból származnak és mindösszesen csak 13 db *P. graminea* törzset identifikáltunk, melyek jelentős része a nyugati régióból származott. Hozzánk hasonlóan nagyobb arányú PTT előfordulást tapasztaltak több földrészen is (AKHAVAN et al. 2014, BOGACKI et al., 2010, RAU et al. 2003)

A *P. graminea* törzsek kismértékű előfordulásának az alkalmazott fungicides csávázás lehetett az oka, mely hatékonyan csökkentette a szisztemikus fertőzést. Továbbá, ez a gomba bár képez konídiumokat a fertőzött levelek felületén, de ezek újabb fertőzéseket a tenyészidőszakban már nem indítanak el, ellentétben a *P. teres* két formájával, melyek multi-ciklusos betegség. Mivel a PG, PTM and PTT elleni növényi rezisztencia rendszerint eltérő és genetikailag nem kapcsolt, e kórokozók gyakoriságára vonatkozó adataink hasznosak lehetnek a rezisztencia nemesítés prioritásainak meghatározásánál.

Két alapvető mód van, ahogyan a gombák és más élőlények a génjeiket átadják a következő generációnak: ivartalan (klonális) szaporodással vagy ivaros párosodás és rekombináció útján. Előbbi esetben minden utódnak egy szülője van és genomja annak pontos mitotikus másolata (eltekintve a mitotikus rekombináció és egyéb genetikai változások általi változásoktól). A rekombináció révén új genotípusok jönnek létre, amely növeli a genetikai diverzitást.

A *P. teres* heterotallikus természetéből és abból a tulajdonságából adódóan, hogy ivartalan és ivaros szaporodásra is képes, a gomba populációinak genetikai szerkezete és változatossága nagymértékben függ a két ellentétes párosodási típus gyakoriságától és együttes előfordulásától, valamint a kétféle szaporodási mód gyakoriságától a vegetációs periódusban (LIU et al. 2011). A *P. graminea* esetében is hasonló a helyzet, de mivel konídiumokkal nem okoz újabb levélfertőzéseket, ivartalan szaporodása korlátozott.

Munkánk során összesen 148 izolátum párosodási típusát határoztuk meg és vizsgáltuk azok éves, régiós és gazdanövények szerinti eloszlását. A *Pyrenophora teres* f. *teres* 109 db izolátuma esetében a MAT1:MAT2 arány közel 1:1 volt, azonban 2006 és 2007-ben a MAT1, míg 2008-ban a MAT2 volt enyhe többségben, 2009-ben pedig közel azonos volt az arányuk. A nyugati, északkeleti és a központi régiókban a MAT2 volt gyakoribb, míg a délkeleti régióban ezzel ellentétes volt a helyzet. A gazdanövények tekintetében mindhárom kórokozónál a MAT1 előfordulása volt nagyobb mértékű, de nem szignifikáns mértékben. Az őszi búzán csak a *P. teres* két formája fordult elő. Az ovális forma esetében 6:4, míg a hálózatos forma esetében 18:13 volt a két párosodási típus aránya. A tavaszi búzáról származó két db PG izolátum MAT1:MAT2 aránya 1:1 volt, azonban a 9 db PTM-nél (6:3) a MAT1 volt a domináns, míg a 24db PTT-nél (11:13) kis mértékben a MAT2 vált gyakoribbá. Az őszi árpáról származó izolátumok vizsgálata során is változatos képet kaptunk, míg a PG (5:3) és PTM (9:3) izolátumoknál a MAT1 párosodási típus, addig a PTT esetében (25:27) a MAT2 volt a gyakoribb, bár nem szignifikáns mértékben.

A párosodási típusokra megvizsgált 31 PTM izolátum 68%-a a MAT1, míg 32%-a MAT2 párosodási típushoz tartozott. Régiós-eloszlás tekintetében: a központi régióban 4:0, a délkeleti régióban 5:4, az északkeleti régióban 2:3, míg a nyugati régióban 10:3 volt a MAT1:MAT2 aránya. Mindegyik évben többségben volt a MAT1 párosodási típus.

A csak árpafélékről gyűjtött nyolc vizsgált PG izolátum közül – melyből 6 izolátum a nyugati országrészből származott – öt a MAT1 és három a MAT2 párosodási típusba tartozott. Mindkét párosodási típust megtaláltuk tavaszi és őszi árpan, valamint a nyugati országrészben.

Több tanulmány hangsúlyozza az ivaros szaporodás jelentőségét a *P. teres* populációkban (PEEVER és MILGROOM 1994, RAU et al. 2003). Ezzel ellentétben más kutatócsoportok az ivartalan szaporodás fokozott jelenlétét emelték ki (CAMPBELL et al. 2002, LEHMENSIEK et al. 2010). RAU és munkatársai (2003, 2005) eredményei alapján az ivaros szaporodás jelentős mértékben fordul elő a *P. teres* mindkét formájánál az olaszországi Szardínián, de az ivaros és ivartalan szaporodás relatív aránya helyszínenként változó. Ezzel szemben SERENIUS és munkatársai (2007) arra a következtetésre jutottak, hogy az azonos helyről származó *P. teres* mindkét típusánál korlátozott volt a rekombináció mértéke, de a lehetőség adott volt a különböző párosodási típusok együttes előfordulása révén. Az egyedi multilokuszos mikroszatellit haplotípus

magas száma és a párosodási típusok 1:1 megoszlása alapján BOGACKI és munkatársai (2010) azt feltételezték, hogy két dél-ausztráliai PTT és PTM populáció esetében az ivaros szaporodás volt az elsődleges, de egy ivartalan szaporodás lehetősége sem zárható ki.

Mindkét párosodási típust azonosítottuk mind a három kórokozó esetében. Továbbá mindhárom gomba faj/forma MAT1 és MAT2 párosodási típusú izolátuma előfordult az összes régióban és minden gyűjtési évben (2007, 2008 and 2009). Mi több mindkét párosodási típus megtaláltuk azonos táblán és levélen a *P. teres f. teres* esetében (H-327 és H-335). A párosodási típusok ezen tér- és időbeli megoszlása még ugyan nem igazolja az ivaros szaporodás megtörténtét a populációkban, de jelzi, hogy annak lehetősége Magyarországon is fennáll e gombák körében.

6.3 *A P. teres f. teres hazai populációjának változékonysága*

A különböző kórokozó populációk szerkezetének és genetikai változékonyságának ismerete közvetetten hozzájárulhat az ellenük való sikeres fellépéshez. Magyarországon elsőként vizsgáltuk a PTT populációinak genetikai variabilitását. Összesen 68 monospóras izolátumot vontunk be RAPD-vizsgálatainkba. A mintákat 43 árutermelő üzemi tábláról és 4 kísérleti állomásról gyűjtöttük. Egy izolátum származott 2006-ból, tizenhat 2007-ből, harmincöt 2008-ból, tizennégy 2009-ből és kettő 2010-ből.

Minden izolátumunk egyedi többlokuszos RAPD-haplotípusba tartozott. Ez a nagy genotípusos diverzitás egybeesik több *P. teres* populáció vizsgálatának eredményével. Maximális genotípusos diverzitást mutatott 64 svéd PTT izolátum, amelyeket egymástól mindössze 20 km-re lévő két helyszínen gyűjtöttek (JONSSON et al. 2000), valamint 41 PTT izolátum is, melyet négy lengyelországi tartományból gyűjtöttek be (BATURO-CIESNIEWSKA et al. 2012). Ezenfelül mind a 30 cseh vagy szlovák, valamint a 145 litván izolátum 100%-a, a 72 finn izolátum 97%-a és a 185 egyéb helyekről származó hálózatos típusú törzs 100%-a egyedi AFLP-genotípussal rendelkezett (LEIŠOVA et al. 2005b, SERENIUS et al. 2005, 2007). Három helyről származó 76 dél-ausztráliai PTT izolátum 84%-a rendelkezett sajátos multilokuszos SSR haplotípussal (BOGACKI et al. 2010).

A magas genotípusos diverzitást általában az ivaros rekombinációval hozzák összefüggésbe (McDONALD és LINDE 2002). Azonban más mechanizmusok is hozzájárulhatnak a populációk változékonyságához, pl. génáramlás, migráció, genetikai sodródás (drift), mutáció, szelekció, paraszexualitás (HARTL és CLARK 1989). A *P. teres* inokuluma vetőmaggal és konídiumokkal is terjed, akár 10-200 km-re is eljuthat (De WOLF et al. 1998), lehetőséget teremtve a különböző genetikai háttérrel rendelkező genotípusok természetes úton történő terjedéséhez. Mivel mintáink nagyszámú árpa fajtáról/genotípusról származtak, elképzelhető, hogy a különböző gazdanövény genotípusok szelekciós nyomása is hatással lehetett a kórokozó populációszerkezetére a gomba eltérő patotípusainak gyakoriságára kifejtett hatás által. Ez elméletileg lehetséges, mert a *P. teres*

mindkét formájának több patotípusát azonosították már korábban Magyarországon (BAKONYI J., nem közölt adat). A paraszexualis (mitotikus) rekombináció jelenségéről mostanáig a *P. teres* esetében nincs tudomásunk, így nehéz megbecsülni a szerepét.

LEIŠOVA és munkatársai (2005b) úgy találták, hogy a *P. teres* mindkét formája inkább csoportosítható a gyűjtés éve, mint a származási hely alapján. SERENIUS és munkatársai (2007) szintén arról számoltak be, hogy a finnországi PTT izolátumok szignifikáns genetikai eltérést mutattak a mintázás éve szerint. A mi adataink is összhangban vannak ezekkel az eredményekkel, vagyis mind a klaszterezés, mind a Nei-féle géndiverzitás analízis szerint az időbeli változások nagyobb hatással vannak az izolátumok genetikai változékonyságára, mint a párosodási típus, talajtípus vagy a származási hely.

SERENIUS és munkatársaihoz (2005) hasonlóan, akik AFLP technikát használtak az egymástól messziről származó, az 1:1 párosodási típus aránytól szignifikánsan nem eltérő két finnországi PTT populáció közötti és azokon belüli genetikai eltérések vizsgálatára, mi sem találtunk a klaszter-analízis során párosodási típusonkénti csoportosulást, sem pedig a két párosodási típus között genetikai eltérést. Statisztikailag szignifikáns genetikai differenciát (G_{ST}) csak nagyon alacsony mértékben kaptunk a kétféle tábla típus (üzemi, illetve kísérleti) és a négy földrajzi régió között, valamint közepes mértékben az évjáratok között. Az üzemi és a kísérleti parcellák közötti eltérés igen alacsony szintje azt mutatja, hogy a mintázási időszak alatt az érintett területek között nagy valószínűséggel történt génáramlás. Ez abból a szempontból is érdekes, hogy a hálózatos levélfoltosság elleni rezisztencia bonitálás általában kísérleti telepeken történik, ahol a gomba helyi populációját/izolátumait használják elsősorban.

Hozzánk hasonlóan BATURO-CIESNIEWSKA és munkatársai (2012), valamint PELTONEN és munkatársai (1996) sem találtak szoros összefüggést a RAPD-klaszterek és a *P. teres* származási helye között. Ugyanakkor a mi eredményeinkkel ellentétben évjáratonkénti eltérést nem figyeltek meg. Más *P. teres* populációk genetikai összetételében is csak hozzánk hasonlóan nagyon alacsony mértékű eltérést vagy annak hiányát figyelték meg viszonylag közeli, egymástól legfeljebb 20 km távolságra lévő területek között Albertában (Kanada) és Svédországban (5 %-os eltérés mindkét esetben) (PEEVER és MILGROOM 1994, JONSSON et al. 2000), illetve számos PTT alpopuláció között Finnországban és Ausztráliában (SERENIUS et al. 2007, BOGACKI et al. 2010). Viszont jelentős genetikai eltérések észlelhetők, feltehetően a migrációs rátának köszönhetően, a szardíniai PTT populációk között (RAU et al. 2003) és egymástól földrajzilag távolról származó *P. teres* populációk között (földrészek között, különböző európai és ausztrál populációk között, és két egymástól 400 km-re lévő finn populáció között) (PEEVER és MILGROOM 1994, SERENIUS et al. 2005, 2007).

Lézió szintjén figyelembe véve a *P. teres* genetikai diverzitását, meglepő lehet, hogy az azonos lézióról származó és azonos párosodási típusú két izolátum (H-325 és H-336) különböző és tisztán elkülönülő multilokuszos RAPD haplotípust mutatott az I. klaszterben (**2. ábra**). Ez a két izolátum 9 RAPD lokuszban tért el egymástól, ezekből 5 megtalálható a H-325-ben, 4 pedig a H-336-ban. A *Cochliobolus sativus* (anamorf alak: *Bipolaris sorokiniana*) esetében LEIŠOVA-SVOBODOVA és munkatársai (2012) valószínűsítették, hogy a konídiumképzés során fellépő kromoszóma átrendeződés okozhat genetikai eltéréseket, főleg egy lézióon belül. Jelenleg nem tudjuk, hogy a H-325 és H-336 izolátumok is hasonló okok miatt térnek-e el egymástól, vagy pedig különböző genotípusok egyidejű fertőzése fordult elő. Ennek a kérdésnek a megválaszolása kívül esett vizsgálataink célján.

6.4 A *P. graminea* és *P. teres* filogenetikai rokonsága

Korábbi filogenetikai tanulmányok az árpát fertőző *Pyrenophora*-fajok csak szűk földrajzi régióból származó kisszámú izolátumát vizsgálták és kevés génszakaszra építettek. Ennek hátrányait elkerülendő, filogenetikai vizsgálatainkba különböző földrészekről és országokból származó 13 *P. graminea*, 13 *P. teres* f. *maculata* és 15 *P. teres* f. *teres* izolátumot és 4 különböző génszakaszt (ITS, β -tubulin, aktin és *gpd*) vontunk be. A törzsek identitását korábbi elemzések során már igazolták, illetve magunk is ellenőriztük a dolgozatban bemutatott specifikus PCR módszerrel. Kulcsoportnak a búza fahéjbarna foltosságát okozó közelrokon *P. tritici-repentis* választottuk.

A sejtmagi rDNS ITS-régiókban kialakult polimorfizmus általában alkalmas fajok közötti differenciálásra és fajmeghatározásra (MARSHALL 2005). STEVENS és munkatársai (1998) viszont nem tudták határozottan elkülöníteni az árpát fertőző *Pyrenophora*-fajokat egymástól ITS-szekvenciáik alapján, mindössze az ITS1-szakasz egyetlen pozíciójában figyeltek meg különbséget a *P. graminea* és a *P. teres* általuk vizsgált izolátumai között (előbbi csak guanint, utóbbi csak timint hordozott). ZHANG és BERBEE (2001) a PG és PTT egy-egy izolátuma között nagyobb homológiát (99,8%) mértek, mint a PTT és PTM között (98,8%), azaz az interspecifikus polimorfizmus kisebb mértékű volt az intraspecifikus polimorfizmusnál. Adataink a két faj ITS alapú sikertelen elkülönítését megerősítik, de a STEVENS és munkatársai (1998) által említett fajspecifikusnak tűnő egynukleotid-polimorfizmust nem támasztják alá, mert két *P. graminea* izolátumunk is timint tartalmazott a kérdéses helyen (**12. táblázat**, 1905-ös pozíció). E megfigyelésünkkel egybevágh az Y10748 génbanki azonosító számú *P. graminea* törzs ITS-szekvenciája is.

ZHANG és BERBEE (2001) a *Pyrenophora* nemzetséget érintő, fent említett tanulmányukban a PTT és PTM egy-egy izolátumának rokonságát glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz szekvenciák segítségével is vizsgálták és közöttük 98,6%-os hasonlóságot állapítottak meg. A szerzők sajnos nem szekvenálták a PG e DNS-szakaszát, de ennek ellenére összesített ITS- és *gpd*-adataikra alapozva felvetették a PG, PTM és PTT szinonimitásának kérdését. ANDRIE és munkatársai (2008) pedig már arra a következtetésre jutottak, hogy a PG, PTM és PTT ugyanahhoz a fajhoz tartozhatnak, mert rDNS ITS-, *gpd*- és MAT2-régiókra épülő kombinált törzsfájukon nem különültek el egyértelműen. Saját többgénés elemzésünkben két PTM-törzs (26PTM és 46PTM) kivételével összes izolátumunk a korábbi tanulmányok és a fajspecifikus PCR során kapott besorolásnak megfelelően csoportosultak mindkét törzsfaszerkesztési módszerrel. Meglepő, hogy a kivételt képező két izolátum közül a 26PTM a *P. teres* f. *maculata* Dániában gyűjtött típus-törzse, s ennek ellenére hordozott PTT-re specifikusnak tűnő nukleotidokat β -tubulin és *gpd*-génjein (**12. táblázat**, 1020-as és 1511-es pozíciók). E két nukleotid szubsztitúció, mely kialakulhatott a PTM és PTT közötti rekombinációval vagy egyszerű pontmutációval is, jelentősen hozzájárulhatott ahhoz, hogy a 26PTM a PTT-kládhoz viszonyítva bazális helyzetet foglaljon el annak ellenére, hogy fajspecifikus PCR és RAPD (BAKONYI és JUSTESEN 2007), mitokondriális DNS-mintázat (CROUS et al. 1995), valamint SSR-genotípus (BAKONYI J., szóbeli közlés) szerint egyaránt a PTM-hez tartozik. Érdekes, hogy a másik kivétel, a 46PTM izolátum nem tartalmazott PG specifikus nukleotidot, pusztán egy sajátosan elkülönülő többgénés genotípust képvisel, amely az ML-törzsfá szerint a PTM-kláddal, a Bayesian törzsfá szerint pedig a PG-kláddal követett egy ideig közös evolúciós utat, de azoktól egyértelműen elválik.

Többgénés filogenetikai elemzésünk, amely az árpát fertőző pirenofórákkal kapcsolatban eddig végzett legrészletesebb ilyen vizsgálat, nem ad egyértelmű választ a PG, PTM és PTT közötti rokonsági kapcsolat minőségére. Ennek oka elsősorban az, hogy a ML- és Bayes-analízis egymásnak ellentmondó evolúciós utakat tártak fel, másodsorban pedig az, hogy az elágazások statisztikai támogatottsága elsősorban az ML-fa esetében alacsony. A Bayes-analízis eredménye egybeesik a patogének jelenlegi taxonómiai besorolásával, azaz a PTM és PTT állnak közelebbi kapcsolatban, míg a ML-analízis a PTM és PG szorosabb kapcsolatára utal. Ez utóbbi faszerkezet megfelel AFLP- és RAPD-markerek, valamint MAT-gének szekvenciája alapján megfigyelt rokonsági kapcsolatoknak (LEIŠOVA et al. 2005a, 2005b, BAKONYI és JUSTESEN 2007, RAU et al. 2007). Tekintettel a még mindig fennálló bizonytalanságokra, további molekuláris genetikai adatok gyűjtését látjuk szükségesnek az árpapatogén pirenofóra fajok rokonsági kapcsolatának tisztázása érdekében.

6.5 Új tudományos eredmények

- Új adatokat szolgáltatunk a *Pyrenophora graminea*, *P. teres* f. *maculata* és *P. teres* f. *teres* magyarországi elterjedtségéről és megállapítottuk, hogy közülük a *P. teres* f. *teres* fordul elő legnagyobb arányban.
- Megállapítottuk a *Pyrenophora graminea*, *P. teres* f. *maculata* és *P. teres* f. *teres* mindkét párosodási típusának széleskörű előfordulását Magyarországon.
- Elsőként igazoltuk tudományos alapossággal a *Pyrenophora teres* f. *maculata* hazai előfordulását.
- Megállapítottuk a *P. teres* f. *teres* nagyfokú genetikai változékonyságát, melyre az évjárat volt a legnagyobb hatással és azt, hogy a különböző párosodási típusú izolátumok között nem volt szignifikáns genetikai differenciáltság.
- A *P. graminea*, *P. teres* f. *maculata* és a *P. teres* f. *teres* többgénés filogenetikai elemzése során egymásnak ellentmondó evolúciós utakat tártunk fel, mellyel alátámasztottuk a kórokozók közötti szoros és bonyolult rokonsági kapcsolatokat.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Az árpa a búza és a kukorica után a legjelentősebb hazai gabonaféle, melynek felhasználási területe igen széleskörű: értékes takarmány, fontos alapanyaga a maláta és sörkészítésnek, és emberi fogyasztásra is alkalmas. Az árpa termesztését számos betegség veszélyeztetheti. Hazánkban legjelentősebbek – évjáratonként és fajtánként eltérő mértékben – a vírusok által kiváltott törpülések, az árpalisztharmat, az árpalevélrozsa, a pirenofóras levélfoltosságok és a kalászfuzáriózis, de a rinhosporiumos és a ramuláriás levélbetegségek előfordulása is fokozódik.

Az árpát több *Pyrenophora* faj támadhatja meg, leggyakrabban a levélcsíkoltságot okozó *P. graminea* (PG) és a levélfoltosságokat okozó *P. teres*. Az általuk okozott termésveszteség általában 20–30%-os, de akár súlyosabb is lehet. E két, konídiumokkal és aszkospórákkal is szaporodó heterotallikus gombafaj jól ismert a világ árpatermesztő régióiban, így Magyarországon is, de meglehetősen korlátozottak voltak ismereteink hazai elterjedtségükről és populációikról, pedig az ellenük való hatékony fellépés egyik feltétele ezen információk minél bővebb ismerete. A *P. teres* izolátumait két faj alatti csoportba sorolják a kiváltott tünettípusok alapján. A hossz- és keresztirányú hálózatos nekrotikus foltokat okozóknak a *P. teres* f. *teres* (PTT), míg az úgynevezett 'spot'-típusú foltokat kiváltóknak a *P. teres* f. *maculata* (PTM) elvevezéseket adták. A *P. graminea* és *P. teres* két formája mind morfológiai, mind pedig genetikai értelemben nagyon hasonlóak, pontos filogenetikai rokonsági kapcsolataik nem teljesen tisztázottak.

Munkánk egyik célkitűzése volt a *P. graminea* és *P. teres* formák, valamint párosodási típusaik azonosítása, elterjedésük és gyakoriságuk vizsgálata árpán különböző magyarországi termőhelyeken. Összesen 208 törzset gyűjtöttünk négy régióból (nyugati, központi, északkeleti és délnyugati) 2006 és 2010 között. Gyakran talákoztunk olyan levéltünettől, amely nem hasonlított a tipikus levélcsíkoltsághoz, sem pedig a hálózatos levélfoltosodáshoz, mégis pirenofóra konídiumot sikerült róla izolálnunk. Ezen izolátumainkat telepmorfológiájuk, konídiumaik és konídiumtartóik méretei alapján nem lehetett egyértelműen elkülöníteni a PTT-től, viszont specifikus PCR segítségével kétséget kizáróan igazoltuk, hogy a PTM-et képviselik. Az atipikus tünetekről származó izolátumaink üvegházi patogenitási tesztekben a PTM tipikus ovális foltosodás tüneteit okozták, ezzel igazolván fertőzőképességüket és további bizonyítékot szolgáltatva identitásukhoz. A PTM magyarországi károkozásáról tudomásunk szerint ez az első tudományosan igazolt adat.

Az árpáról és búzáról izolált 208 *Pyrenophora* törzs között legnagyobb arányban a PTT (142 db, 68%) volt jelen, 53 db (26%) a PTM és 13 db (6%) a PG fajhoz tartozott. A PTT tenyészetek 31%-a (44 db) az északkeleti régióból, 28%-a (40 db) a nyugati országrészből, 26%-a (37 db) a

délkeleti régióból és a legkevesebb (21 db) a központi régióból származott. A PTM izolátumok 46% (24 db) a délkeleti régióból, 32% (17 db) a nyugati országrészről és a központi, valamint az északkeleti régióból azonos mennyiségű (6–6db) izolátum. A PG izolátumok nagyobb része (11 db, 84,6%) a nyugati régióból származik, és 2010 kivételével minden évben gyűjtöttünk.

Heterotallikus jellegükből adódóan a vizsgált kórokozók ivaros szaporodásához, mely a genetikai változékonyság egyik jelentős forrása lehet, mindkét párosodási típusuk (MAT1 és MAT2) jelenléte szükséges. Hogy képet alkossunk hazai populációik hajlamáról a változékonyságra, ismernünk kell genetikai szerkezetüket és a párosodási típusok előfordulását. Munkánk során összesen 148 izolátum párosodási típusát határoztuk meg és vizsgáltuk azok éves, régiós és gazdanövények szerinti eloszlását. A tesztelt 8 *P. graminea* izolátum közül 5 a MAT1 és 3 a MAT2 párosodási típushoz tartozott. Nagyobb számban (6 db) a nyugati régióból származtak az izolátumok. A 2006-ban gyűjtött táplánszentkereszti PG izolátumok esetében mindkét párosodási típust megtaláltuk. Az éves eloszlás tekintetében 2006-ban 1:2, 2007-ben 3:0, 2008-ban pedig 1:1 volt a MAT1:MAT2 izolátumok számaránya. A vizsgált 31 *P. teres* f. *maculata* izolátum 68%-a MAT1 míg 32%-a MAT2 párosodási típushoz tartozott. Tekintetbe véve a teljes gyűjtési periódust a párosodási típusok eloszlása és a vizsgált PTM izolátumok száma sem volt azonos a különböző régiókban. A legtöbb évben többségben volt a MAT1 párosodási típus, 2006-ban 5:2, 2007-ben 8:4, 2008-ban 2:2, 2009-ben 4:2 és 2010-ben 2:0 volt a két párosodási típus előfordulása. A legtöbb (109 db) azonosított párosodási típusú izolátum a *Pyrenophora teres* f. *teres*hez tartozott, közöttük összesen 56 db MAT1 (51%) és 53 db MAT2 (49%) típusú volt, de 2006-ban és 2007-ben a MAT1 volt többségben (11:6 és 21:16), míg 2008-ban a MAT2 fordult elő gyakrabban (17:22). A 2009-es évben azonos arányban fordult elő a két párosodási típus (7:7), 2010-ben pedig csak két vizsgált izolátumunk volt, ami a MAT2 párosodási típushoz tartozott. Izolátumaink őszi árpáról, tavaszi árpáról, valamint őszi búzáról származtak és megállapítottunk, hogy minden gazdanövény esetében a MAT1 volt gyakoribb, vagyis a búza esetében 24:17, az őszi árpa esetében 38:32, a tavaszi árpa esetében pedig 18:17 volt a két párosodási típus számaránya.

Mindkét párosodási típus előfordult a három kórokozónál, minden régióban és minden gyűjtési évben. A párosodási típusok ezen tér- és időbeli megoszlása még ugyan nem igazolja az ivaros szaporodás megtörténtét a populációkban, de jelzi, hogy annak lehetősége Magyarországon is fennáll a gombák körében.

Munkánk második célkitűzése a hálózatos levélfoltosságot okozó *P. teres* f. *teres* hazai izolátumai között a genetikai változékonyság tanulmányozása volt. Összesen 68 monospóras izolátumot vontunk be RAPD-vizsgálatainkba, ahol 30 indítószekvenciát alkalmaztunk. Minden izolátumunk egyedi többlokuszos RAPD-haplotípusba tartozott. Ez a nagy genotípusos diverzitás egybeesik több külföldi *P. teres* populáció vizsgálatának eredményével. Az UPGMA klaszter

analízis során 4 fő csoportba rendeződtek az izolátumok, azonban nem találtunk szoros összefüggést a RAPD-klaszterek és a *P. teres* törzsek származási helye vagy párosodási típusai között. A Nei-féle géndiverzitás analízis rávilágított, hogy az egyes mintaegységeken (párosodási típusok, táblatípusok, régiók, évek) belüli genetikai diverzitás lényegesen nyagobb, mint a mintaegységek közötti diverzitás. A MAT1 és MAT2 párosodási típusú izolátumok között nem volt megfigyelhető szignifikáns genetikai differenciáltság. Bár egy kismértékű differenciáltság volt a különböző táblatípusok (üzemi és kísérleti) és a földrajzi régiók esetében, mégis mind az UPGMA klaszter analízis és a Nei-féle géndiverzitás azt a nézetet erősíti, hogy az időbeli változás (évjárat) volt legnagyobb hatással izolátumaink genetikai változékonyságára.

Harmadik célkitűzésünk volt a *P. graminea* és *P. teres* filogenetikai rokonságának vizsgálata többgénés szekvenciaelemzéssel. Négy, a valódi gombák körében gyakran alkalmazott sejtmagi DNS-szakaszt (ITS, β -tubulin, aktin, gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz [*gpd*]) vizsgáltunk. Az általunk alkalmazott mindkét törzsfaszerkesztési módszerrel (Maximum Likelihood [ML] és Bayes-analízis) – két PTM-törzs kivételével – összes izolátumunk a korábbi tanulmányok és a fajspecifikus PCR során kapott besorolásnak megfelelően rendeződtek a három kórokozó csoportjaiba. A kivételt képező két PTM-izolátum egyike PTT-re specifikusnak tűnő nukleotidokat hordozott két génjén (β -tubulin és *gpd*), mely kialakulhatott a PTM és PTT közötti rekombinációval vagy egyszerű pontmutációval is. A másik kivételes PTM-izolátum pedig egy sajátosan elkülönülő többgénés genotípust képviselt. Nem kaptunk egyértelmű választ a PG, PTM és PTT közötti rokonsági kapcsolat minőségére. Ennek oka elsősorban az, hogy a ML- és Bayes-analízis egymásnak ellentmondó evolúciós utakat tártak fel, másodsorban pedig az, hogy az elágazások statisztikai támogatottsága elsősorban az ML-fa esetében alacsony volt. A Bayes-analízis eredménye egybeesett a patogének jelenlegi taxonómiai besorolásával, azaz a PTM és PTT állnak közelebbi kapcsolatban, míg a ML-analízis a PTM és PG szorosabb kapcsolatára utalt. Ez utóbbi faszerkezet megfelel AFLP- és RAPD-markerek, valamint MAT-gének szekvenciája alapján megfigyelt rokonsági kapcsolatoknak.

Tekintettel a még mindig fennálló bizonytalanságokra, további molekuláris genetikai adatok gyűjtését látjuk szükségesnek az árpapatogén pirenofóra fajok rokonsági kapcsolatának tisztázása érdekében.

8 SUMMARY

Barley is the third most important cereal after wheat and corn in Hungary, with a wide range of application: valuable fodder, important raw material for malt and for beer making, and also suitable for human consumption. Barley production is influenced by lots of diseases. In Hungary the most considerable ones are – depending on the growing season and varieties produced – barley yellow dwarf caused by viruses, barley powdery mildew, barley leaf rust, leaf blotches caused by *Pyrenophora* spp. and *Fusarium* ear blight. However, the frequency of scald and *Ramularia* leaf spot have also been increasing.

Several *Pyrenophora* species can infect barley, the most frequent ones are *P. graminea* (PG) and *P. teres*, the causal agents of leaf stripe and leaf spot diseases, respectively. Yield loss caused by these two pathogens is generally 20-30%, but may be even more serious. These two heterothallic fungi, reproducing with both conidia and ascospores, are well-known in the world's barley growing regions, like in Hungary. The knowledge of their distribution and populations in Hungary was very limited though successful plant protection technology needs this information. Isolates of *P. teres* are assigned into two forms (f.) based on the types of symptoms on leaves. The one which causes net-like longitudinal and transverse necrotic lines is named *P. teres* f. *teres* (PTT), while the other one causing spot-type necrotic blotches is named *P. teres* f. *maculata* (PTM). *P. graminea* and the two forms of *P. teres* are very similar both morphologically and genetically, their accurate phylogenic relationship is not clarified.

One of the objectives of our work was to identify and survey the distribution and frequency of *P. graminea* the two forms of *P. teres* and their mating types on barley in different growing areas in Hungary. Altogether, 208 strains were collected in four geographical regions (western, central, northeaster and southwestern) during 2006-2010. We often met leaf spots that were neither similar to the typical leaf stripe nor to the net form of net blotch, yet *Pyrenophora* conidia were isolated from them. These isolates could not be separated clearly from PTT based on their culture morphology, size of conidia and conidiophores, but specific PCR assay proved unambiguously that they belong to PTM. In artificial inoculation trials, isolates from the 'atypical' leaf spots caused necrotic oval spots characteristic for PTM, verifying their virulence and providing additional evidence to their identity. To our knowledge, this is the first scientifically verified data about the occurrence of PTM in Hungary.

The majority of the 208 *Pyrenophora* strains isolated from barley and wheat were PTT (142 isolates, 68%), 53 (26%) belonged to PTM, and 13 (6%) to PG. Thirty-one percent (44 isolates) of PTT cultures came from north-east, 28% (40 isolates) from the western region, 26% (37 isolates)

originated from south-east and the least (21 isolates) from the central region of Hungary. Forty-six percent (24 isolates) of the PTM cultures came from the south-east region, 32% (17 isolates) from western, and similar number of isolates (6-6) was collected from central and north-east regions. The majority of PG isolates (11 strains, 84.6%) came from the western region and those were collected in each year except for 2010.

The studied heterothallic pathogens require their both mating types (MAT1 and MAT2) for sexual reproduction, which could be an important source of genetic diversity. To gather information on the potential sources of genetic diversity within and between their domestic populations, we need to know their population genetic structure and prevalence of mating types. We identified mating type of 148 isolates and studied the distribution of MAT1 and MAT2 isolates according to years, regions and hosts. Of the 8 *P. graminea* isolates tested 5 belonged to MAT1 and 3 belonged to MAT2. Six of these PG isolates were collected from the western region. The PG isolates collected in Táplánszentkereszt in 2006 represented both mating types. The ratio of MAT1:MAT2 were 1:2 in 2006, 3:0 in 2007 and 1:1 in 2008. Sixty-eight and thirty-two percent of the 31 PTM isolates examined belonged to MAT1 and MAT2, respectively. Considering the whole sampling period, the frequency of the 2 mating types and the number of studied PTM isolates were not equal in different regions. MAT1 was dominant in most years, the ratio of MAT1:MAT2 was 5:2 in 2006, 8:4 in 2007, 2:2 in 2008, 4:2 in 2009 and 2:0 in 2010. The majority of isolates (109) with known mating type belonged to *P. teres* f. *teres*. Fifty-six had MAT1 (51%) and 53 had MAT2 (49%), but MAT1 was more frequent in 2006 and 2007 (11:6 and 21:16), while MAT2 was more prevalent in 2008 (17:22). In 2009, the two mating types occurred in equal number (7:7). In 2010 there were only two isolates, each represented MAT2. Isolates were collected from winter barley, spring barley and winter wheat, and it was found that number of MAT1 isolates was more than that of MAT2 isolates on all hosts, namely 24:17 on wheat, 38:32 on winter barley and 18:17 on spring barley. Both mating types of each of the three pathogen occurred in all regions and in each year. Although this distribution of mating types does not verify that sexual sexual reproduction took place in these pathogens' Hungarian populations, it indicates the possibility of it.

Our second aim was to collect information on the genetic variability of *P. teres* f. *teres*, the causal agent of net type of net blotch disease of barley. A total of 68 monoconidial isolates were tested with RAPD analysis using 30 random primers. Each isolate represented a unique multilocus RAPD haplotype. The high genotypic diversity in our collection coincides with results observed in several studies on *P. teres* populations. UPGMA cluster analysis revealed 4 main isolate groups and no general correlation between RAPD clusters and mating type or geographic origin of PTT isolates was detected. Nei's gene diversity analysis showed that genetic diversity within sampling units (mating types, field types, regions, years) accounted for most of the total genetic diversity, while

genetic diversity among sampling units represented a small proportion of total diversity. No significant genetic differentiation was observed between MAT1 and MAT2 isolates. Although a low level of allelic differentiation was obtained according to field type (commercial vs. experimental) and geographical origin of isolates, both UPGMA clustering of multilocus RAPD haplotypes and Nei's gene diversity analysis supported the view that seasonal changes had the greatest effect on our isolate's genetic divergence.

Our third aim was to study the phylogenetic relationship of *P. graminea* and *P. teres* with multigene sequence analysis. Four nuclear DNA regions, often used for studying true fungi, were examined (ITS, β -tubulin, actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [*gpd*]). Based on both Maximum Likelihood (ML) and Bayesian analysis, all but 2 PTM isolates grouped to three clusters corresponding to the 3 pathogens and to their species identity determined by species specific PCR assay. One of these 2 exceptional PTM strains carried nucleotides characteristic for PTT on two genes (β -tubulin and *gpd*), which might be a result of recombination between PTT and PTM or of simple point mutations. The other exceptional PTM isolate represented a unique multigene genotype. No unambiguous answer on the exact phylogenetic relationship among PG, PTM and PTT was obtained. The primary reason for this was that ML and Bayesian analyses revealed contradictory evolutionary relationship; secondly statistical support of branches on the ML tree was low. Bayesian analysis supported the present taxonomical status of these pathogens, i.e. PTM and PTT are in closer relationship, whereas. ML analysis showed closer relationship between PTM and PG. In this sense, result of ML analysis coincided with those of previous studies using AFLP and RAPD markers as well as MAT gene sequences.

Considering the still existing uncertainties, additional molecular genetic data are required to clarify the phylogenetic relationship among barley pathogen *Pyrenophora* species.

M1. IRODALOMJEGYZÉK

- AFANASENKO, O.S., HARTLEB, H., GUSEVA, N.N., MINAŘÍKOVÁ, V., JANOSHEVA, M.A. (1995): A set of differentials to characterize populations of *Pyrenophora teres* Drechs. for international use. *Journal of Phytopathology*, **143**: 501–507.
- AFANASENKO, O.S., LEVITIN, M.M. (1979): The population structure of the pathogen of net blotch of barley as regards its virulence. I. Identification of races. *Mikologija i Fitopatologija*, **13**: 230–234.
- AKHAVAN, A., TURKINGTON, T.K., KEBEDE, B., TEKAUZ, A., KUTCHER, H.R., KIRKHAM, C., XI, K., KUMAR, K., TUCKER, J.R., STRELKOV, S.E. (2014): Prevalence of mating type idiomorphs in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* populations from the Canadian prairies. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **37**(1): 52–60.
- ALCORN, J.L. (1988): The taxonomy of *Helminthosporium* species. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 37–56.
- ANDRIE, R.M., SCHOCH, C.L., HEDGES, R., SPATAFORA, J.W., CIUFFETTI, L.M. (2008): Homologs of *ToxB*, a host-selective toxin gene from *Pyrenophora tritici-repentis*, are present in the genome of sister-species *Pyrenophora bromi* and other members of the Ascomycota. *Fungal Genetics and Biology*, **45**: 363–377.
- ARIYAWANSA, H.A., KANG, J.C., ALIAS, S.A., CHUKEATIROTE, E., HYDE, K.D. (2014): *Pyrenophora*. *Mycosphere* **5**(2): 351–362.
- ATANASOFF, D., JONHSON, A.G. (1920): Treatment of cereals seeds by dry heat. *Journal of Agricultural Research*, **18**(7): 379–390.
- AUGUSZTA, G., SDROVICH HORVÁTH, E., VIOLA, J. (1988): Tavaszi árpafajták *Helminthosporium teres*-fertőzöttség vizsgálata. In: SEPRŐS, I., BORSODI, O. (szerk.): *Növényvédelmi Tudományos Napok*, 1988. Budapest, 44.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1994): *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 27, Unit 2.3). John Wiley and Sons Inc., New York, NY.
- BAKONYI, J., JUSTESEN, A.F. (2007): Genetic relationship of *Pyrenophora graminea*, *P. teres* f. *maculata* and *P. teres* f. *teres* assessed by RAPD analysis. *Journal of Phytopathology*, **155**: 76–83.
- BALDAUF, S.L., PALMER, J.D. (1993): Animals and fungi are each other's closest relatives' congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **90**: 11558–11562.
- BALDAUF, S.L., ROGER, A.J., WENK-SIEFERT, I., DOOLITTLE, W.F. (2000): A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, **290**: 972–977.

- BATES, J.A., TAYLOR, E.J.A., KENYON, D.M., THOMAS, J.E. (2001): The application of real-time PCR to the identification, detection and qualification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Molecular Plant Pathology*, **2**(1): 49–57.
- BATURO-CIESNIEWSKA, A., GRABOWSKI, A., PANKA, D. (2012): Diversity in the Polish isolates of *Drechslera teres* in spring barley as determined through morphological features, mating types, reaction to control agents and RAPD markers. *Journal of Plant Pathology*, **942**: 339–351.
- BERBEE, M.L., PIRSEYEDI, M., HUBBARD, S. (1999): *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, **91**(6): 964–977.
- BHATTACHARYA, D., STICKEL, S.K., SOGIN, M.L. (1991): Molecular phylogenetic analysis of actin genic regions from *Achlya bisexualis* (Oomycota) and *Costaria costata* (Chromophyta). *Journal of Molecular Evolution*, **33**(6): 525–536.
- BINDER, M., HIBBETT, D.S. (2002): Higher level phylogenetic relationships of homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22**: 76–90.
- BOCKELMAN, H.E., SHARP, E.L., BJARKO, M.E. (1983): Isolates of *Pyrenophora teres* from and The Mediterranean region that produce spot-type lesions on barley. *Plant Disease*, **67**: 696–697.
- BOGACKI, P., KEIPER, F.J., OLDACH, K.H. (2010): Genetic structure of South Australian *Pyrenophora teres* populations as revealed by microsatellite analyses. *Fungal Biology*, **114**(10): 834–841.
- BOUAJILA, A., ZOGHLAMI, N., MURAD, S., BAUM, M., GHORBEL, A., NAZARI, K. (2013): Genetic differentiation in *Pyrenophora teres* f. *teres* populations from Syria and Tunisia as assessed by AFLP markers. *Letters in Applied Microbiology*, **56**(6): 389–400.
- BROWN, J.K.M. (1996): The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytology*, **133**: 183–195.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J., GRESSHOFF, P.M. (1992): Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Molecular and General Genetics*, **235**(2-3): 157–165.
- CAMPBELL, G.F., CROUS, P.W., LUCAS, J.A. (1999): *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot of barley in South Africa. *Mycological Research*, **103**: 257–267.
- CAMPBELL, G.F., LUCAS, J.A., CROUS, P.W. (2002): Evidence of recombination between net- and spot-type populations of *Pyrenophora teres* as determined by RAPD analysis. *Mycological Research*, **106**: 602–608.
- CHEN, X., LINE, R.F., LEUNG, H. (1993): Relationship between virulence and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*, **83**(11): 1489–1497.
- COCKERELL, V., RENNIE, W.J., JACKS, M. (1995): Incidence and control of barley leaf stipe (*Pyrenophora graminea*) in Scottish barley during the period 1987-1992. *Plant Pathology*, **44**: 655–661.

- COOKE, D.E.L., KENNEDY, D.M., GUY, D.C., RUSSEL, J., UNKLES, S.E., DUNCAN, J.M. (1996): Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycological Research*, **100**: 297–303.
- COX, G.M., RUDE, T.H., DYKSTRA, C.C., PERFECT, J.R. (1995): The actin gene from *Cryptococcus neoformans*: structure and phylogenetic analysis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **33**(4): 261–266.
- CROUS, P.W., JANSE, B.J.H., TUNBRIDGE, J., HOLZ, G. (1995): DNA homology between *P. teres* and *P. japonica*. *Mycological Research*, **99**(9): 1098–1102.
- CSERHÁTI, Z., DENKE, G., FEHÉR, A. (1986): Az árpa helmintospóriumos levélfoltossága és csikoltsága elterjedésének vizsgálata asz ország több megyéjében. In: BORSODI, O., MOLNÁR, J., VIRÁNYI, F. (szerk.): Növényvédelmi Tudományos Napok '86, Budapest, 64.
- CSŐSZ, L., TÓTH, B., KOPAHNKE, D., VARGA, J. (2007): A *Drechslera teres* magyarországi előfordulásai őszi búzán. In: HORVÁTH, J., HALTRICH, A., MOLNÁR, J. (szerk.): 53. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2007. február 20–21. 67.
- DANIEL, H.M., MEYER, W. (2003): Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, **86**(1–2): 61–78.
- DARRIBA, D., TABOADA, G.L., DOALLO, R., POSADA, D. (2012): jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**(8): 772.
- De WOLF, E.D., EFFERTZ, R.J., ALI, S., FRANCL, L.J. (1998): Vistas of tan spot research. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **20**: 349–370.
- DEADMAN, M.L., COOKE, B.M. (1989): Effects of net blotch on growth and yield of spring barley. *Annals of Applied Biology*, **110**:33–42.
- DIEDICKE, H. (1903): Ueber den Zusammenhang zwischen *Pleosora*- und *Helminthosporium*-Arten. II. Centralbl. Bakt. etc. II Abt. XI, pp. 52–59.
- DONG, J., CRANE, W., CRANE, J.L. (1998): Phylogenetic studies of the *Leptosphaeriaceae*, *Pleosporaceae* and some other *Loculoascomycetes* based on nuclear ribosomal NA sequences. *Mycological Research*, **102**: 151–156.
- DRECHSLER, C. (1923): Some graminicolous species of *Helminthosporium*: I. *J. Agricultural Research*, **24**: 641–739.
- DROUIN, G., MONIZ de SÁ, M., ZUKER, M. (1995): The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, **41**(6): 841–849.
- DUNCAN, S., BARTON, J.E. OBREIN, A.P. (1993): Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycology Research*, **93**(9): 1075–1082.
- EDWARDS, K., JOHNSTONE, C., THOMPSON, C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19**(6): 1349.

- EDLIND, T.D., LI J., VISVESVARA, G.S., VODKIN, M.H., McLAUGHLIN, G.L., KATIYAR, S.K. (1996): Phylogenetic analysis of β -tubulin sequences from a mitochondrial protozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **5**: 359–367.
- EL FAHL, A.M., ABDEL-AL, H.R., GHOBRIAL, E., SHATA, H.M., HAMMOUDA, A.M. (1982): Pathogenic races of *Helminthosporium teres* in Egypt. Ain Shams Univ Fac Agric Res Bull No 1824. pp 13.
- ELLIS, M.B. (1971): *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- ELLIS, M.B., WALLER, J.M. (1973): *Pyrenophora teres* (conidial state: *Drechslera teres*). Description of pathogenetic fungi and bacteria. No. 390, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.
- ELLWOOD, S.R., SYME, R.A., MOFFAT, C.S., OLIVER, R.P. (2012): Evolution of three *Pyrenophora* cereal pathogens: Recent divergence, speciation and evolution of non-coding DNA. *Fungal Genetics and Biology*, **49**(10): 825–829.
- ERIKSSON, J. (1886): Fungi Parasitici scandinavici exsiccati no 187. *Helminthosporium gramineum* (Rabh.) Erikss. Stockholm, Sweden, July 1885.
- ERIKSSON, O.E. (2005): Outline of Ascomycota 2005. *Myconet*, **11**: 1–113.
- ERWIN, D.C., RIBERIO, O.K. (1996): *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St Paul, USA.
- ÉRSEK, T., GÁBORJÁNYI R. (1998): Növénykórokozó mikroorganizmusok (természettudományi tankönyv), ELTE Eötvös kiadó, Budapest.
- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783–791.
- FISCHL, G. (1991): Az árpa betegségei. Oktatási Segédlet. Pannon Agrártudományi Egyetem, Keszthely.
- FLETCHER, L.D., McDOWELL, J.M., TIDWELL, R.R., MEAGHER, R.B., DYKSTRA, C.C. (1994): Structure, expression and phylogenetic analysis of the gene encoding actin I in *Pneumocystis carinii*. *Genetics*, **137**: 743–750.
- FOLK, GY., GLITS M. (1993): Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- FRAZZON, A.P.G., MATSUMURA, A.T.S., VAN DER SAND, S.T. (2002): Morphological characterization and genetic analysis of *Drechslera teres* isolates. *Genetics and Molecular Biology*, **25**:235–241.
- FRØSLEV, T.G., JEPPESEN, T.S., LÆSSØE, T., KJØLLER, R. (2007): Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section *Calochroi* (*Basidiomycota*, *Agaricales*) in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**: 217–227.
- GATTI, A., RIZZA, F., DELOGU, G., TERZI, V., PORTA-PUGLIA, A., VANACCI, G. (1992): Physiological and biochemical variability in a population of *Drechslera graminea*. *Journal of Genetics and Breeding*, **46**: 179–186.

- GIGLIANO, G.S. (1999): Preliminary data on the usefulness of Internal Transcribed Spacer I (ITS1) sequence in *Cannabis sativa* L. identification. *Journal of Forensic Sciences*, **44**: 475–477.
- GLASS, N.L., DONALDSON, G.C. (1995): Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology*, **61**(4): 1323–1330.
- GUPTA, S., LOUGHMAN, R. (2001): Current virulence of *Pyrenophora teres* on barley in Western Australia. *Plant Disease*, **85**: 960–966.
- HANSEN, L.R., MAGNUS, H.A. (1968): Bladdfleksopper på bygg i Norge. *Melding. Report-Norwegian Plant Protection Institute, Division of Plant Pathology, Vollebekk. No. 42*: 95–105.
- HARA, K. (1925): Text-book of phytopathology. In Japanese
- HARMSSEN, M.C., SCHUREN, F.H.J., MOUKHA, S.M., VANZUILEN, C.M., PUNT, P.J., WESSELS, J.G.H. (1992): Sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycetes *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Agaricus bisporus*. *Current Genetics*, **22**: 447–454.
- HARTL, D.L., CLARK, A.G. (1989): *Principles of Population Genetics. 2nd ed.* Sunderland, MA, USA, Sinauer Associates.
- HARGREAVES, J.A., KEON, J.P.R. (1983): The binding of isolated mesophyll cells from barley leaves to hyphae of *Pyrenophora teres*. *Plant Cell Reports*, **2**: 240–243.
- HESZKY, L., GALLI, ZS. (2006): Genetika, egyetemi jegyzet, SZIE, Gödöllő.
- HIGHTOWER, R.C., MEAGHER, R.B. (1986): The molecular evolution of actin. *Genetics*, **114**: 315–332.
- HOFSTETTER, V., MIADLIKOWSKA, J., KAUFF, F., LUTZONI, F. (2007): Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the *Lecanoromycetes* (*Ascomycota*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**: 412–426.
- HO, K.M., TEKAUZ, A., CHOO, T.M., MARTIN, R.A. (1996): Genetic studies on net blotch resistance in barley cross. *Canadian Journal of Plant Sciences*, **76**: 715–719.
- INDERBITZIN, P., BOSTOCK, R.M., DAVIS, R.M., USAMI, T., LATT, H.W., SUBBARAO, K.V. (2011): Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE* **6**(12): e28341
- IRINYI, L.M. (1999): Phoma-szerű gombák taxonómiájának konvencionális és molekuláris biológiai összehasonlítása, Egyetemi Doktori értekezés, Debrecen, 2009.
- ITO, S. (1930): On some new ascigerous satages of the species of *Helminthosporium* parasitic on cereals. *Proceeding of the Imperial Academy Japan* **6**: 352–355.
- ITO, S., KURIBAYASHI, K. (1931): The ascigerous forms of some graminicolous species of *Helminthosporium* in Japan. *Journal of Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo* **29**: 85–125.

- IRWIN, D.M., WILSON, A.C. (1991): Limitation of molecular methods for establishing the phylogeny of mammals, with special reference to the position of elephants. In: SZALAY, F.S., NOVACEK, M.J., McKENNA, M.C. (eds) American Museum of Natural History symposium on mammalian phylogeny. Princeton University Press, Princeton NJ (in press).
- JACOB, H.J., LINDPAINTNER, K., LINCOLN, S.E., KUSUMI, K., BUNKER, R.K., MAO, Y.P., GANTEN, D., DZAU, V.J., LANDER, E.S. (1991): Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell*, **67**: 213–224.
- JAMES, T.Y., KAUFF, F., SCHOCH, C.L., MATHENY, P.B., HOFSTETTER, V., COX, C.J. et al. (2006): Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, **443**(7113): 818–822.
- JAYASENA, K.W., GEORGE, E., LOUGHMAN, R., HARDY, G. (2004): First record of the teleomorph stage of *Drechslera teres* f. *maculata* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, **33**(3): 455–456.
- JAYASENA, K.W., VAN BURGEL, A., TANAKA, K., MAJEWSKI, J., LOUGHMAN, R. (2007): Yield reduction in barley in relation to spot-type net blotch. *Australasian Plant Pathology*, **36**(5): 429–433.
- JESUS, J., CASCARDO, J.C.M., FIGUEIRA, A. (1995): Uso de marcadores RAPD no estudo de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Magistra*, **7**: 127–149.
- JOHNSTON, R. H., METZ, S.G., RIESELMAN, J.H. (1982): Seed treatment — for control of *Pyrenophora* leaf stripe of barley. *Plant Disease*, **66**: 1122–1124.
- JONSSON, R., SALL, T., BRYNGELSSON, T. (2000): Genetic diversity for random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **22**: 258–264.
- JORDAN, V.W.L. (1981): Aetiology of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres* and some effects on yield. *Plant Pathology*, **30**: 77–87.
- JORDAN, V.W.L., ALLEN, E.C. (1984): Barley net blotch: influence of straw dispersal and cultivation methods on inoculum potential, and on incidence and severity of autumn disease. *Plant Pathology*, **33**: 547–559.
- JØRGENSEN, J.H., BECH, C., JENSEN, J. (2000): Reaction of European spring barley varieties to a population of the net blotch fungus. *Plant Breeding*, **119**(1): 43–46.
- JUSTESEN, A.F., HANSEN, H.J., PINNSCHMIDT, H.O. (2008): Qualification of *Pyrenophora graminea* in barley seed using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **122**: 253–263.
- KAPLAN, W., CHANDLER, F.W., AJELLO, L., GAUTHER, R., HIGGINS, R., CAYOUTTE, P. (1975): Equine phaeohyphomycosis caused by *Drechslera spicifera*. *The Canadian Veterinary Journal*, **16**(7): 205–208.
- KATO, K., STANDLEY, D.M. (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(4): 772–780.

- KEVEI, F., KUCSERA, J., VARGA, J., VÁGVÖLGYI, CS. (1999): Fejezetek a mikológiából. Szeged, JATE Press.
- KHAN, T.N. (1987): Relationship between net blotch (*Drechslera teres*) and losses in grain yield of barley in Western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, **38**(4): 671–679.
- KHAN, T.N. (1989): Effect of spot-type net blotch (*Drechslera teres* (sacc.) Shoem) infection on barley yield in short season environment of northern cereal belt of Western Australia. *Australasian Journal of Agricultural Research*, **40**(4): 745–752.
- KHAN, T.N., TEKAUZ, A. (1982): Occurrence and pathogenicity of *Drechslera teres* isolates causing spot-type symptoms on barley in Western Australia. *Plant Disease*, **66**: 423–425.
- KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C., STALPERDS, J.A. (2001): Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 9th ed. CABI Publishing.
- KUSABA, M., TSUGE, T. (1995): Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics*, **28**: 491–498.
- KYTÖVUORI, I., NISKANEN, T., LIIMATAINEN, K., LINDSTRÖM, H. (2005): *Cortinarius sordidemaculatus* and two new related species, *C. anisatus* and *C. neofurcolaesus*, in Fennoscandia (Basidiomycota, Agaricales). *Karstenia*, **45**: 33–49.
- LEHMENSIEK, A., BESTER-VAN DER MERWE, A.E., SUTHERLAND, M.W., PLATZ, G., KRIEL, W.M., POTGIETER, G.F., PRINS, R. (2010): Population structure of South African and Australian *Pyrenophora teres* isolates. *Plant Pathology*, **59**: 504–515.
- LEIŠOVA, L., MINAŘIKOVA, V., KUČERA, L., OVESNÁ, J. (2005a): AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net forms of *Pyrenophora teres*. *Plant Pathology*, **54**: 66–73.
- LEIŠOVA, L., MINAŘIKOVA, V., KUČERA, L., OVESNÁ, J. (2005b): Genetic diversity of *Pyrenophora teres* isolates as detected by AFLP analysis. *Journal of Phytopathology*, **153**: 569–578.
- LEIŠOVA-SVOBODOVA, L., MINAŘIKOVA, V., KUČERA, L., PEREYRA, S.A. (2012): Structure of the *Cochliobolus sativus* population variability. *Plant Pathology*, **61**: 709–718.
- LEIŠOVA-SVOBODOVA, L., MINAŘIKOVA, V., MATUSINSKY, P., HUDCOVICOVA, M., ONDREICKOVÁ, K., GUBIS, J. (2014): Genetic structure of *Pyrenophora teres* net and spot populations as revealed by microsatellite analysis. *Fungal Biology*, **118**(2): 180–192.
- LITT, M., LUTY, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 397–401.
- LIU, Z., ELLWOOD, S.R., OLIVER, R.P., FRIESEN, T.L. (2011): *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. *Molecular Plant Pathology*, **12**: 1–19.
- LOUGHMAN, R., KHAN, T.N. (1993): Effect of fungicide seed dressing on leaf stripe of barley caused by *Pyrenophora graminea* S. Ito & Kuribay. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **33**: 465–467.

- LOUW, J.P.J., CROUS, P.W., HOLZ, G. (1994): *Pyrenophora japonica* occurring on barley in South Africa. *Plant Pathology*, **43**: 420–423.
- LOUW, J.P.J., CROUS, P.W., HOLZ, G. (1996): Relative importance of the barley net blotch pathogens *Pyrenophora teres* f. *teres* (net type) and *P. teres* f. *maculata* (spot type) in South Africa. *African Plant Protection*, **2**: 89–95.
- LU, S., PLANTZ, G.J., EDWARDS, M.C., FRIESEN, T.L. (2010): Mating type locus-specific polymerase chain reaction markers for differentiation of *Pyrenophora teres* f. *teres* and *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the causal agents of barley net blotch. *Phytopathology*, **100**(12): 1298–1306.
- LUTZONI, F., KAUFF, F., COX, C.J., McLAUGHLIN, D., CELIO, G., DENTINGER, B., et al. (2004): Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*, **91**(10): 1446–1480.
- LUTTRELL, E.S. (1951): A key to species *Helminthosporium* reported on grasses in the United States, *USDA Plant Disease Reporter Supplies*, **201**: 59–67.
- LYAMANI, A., ROLLI, K. (1979): Importance of main diseases transmitted by the barley seed and effect of chemical treatments on the yields (in Morocco). Direction de la Recherche Agronomique, Rabat (Morocco). Microfiche 79-0906. Conference, Hommes, Terre-et-Eaux Morocco) 37–39.
- MAGNUS, H.A. (1979): Relationship between barley strip disease and yield decrease in seed dressing trials. *Forskning og Forsoek i Landbriket*, **30**: 259–267.
- MÄKELÄ, K. (1972): Leaf spot fungi on barley in Finland. *Acta Agralia Fennica* **124**(3): 22.
- MANAMGODA, D.S., ROSSMAN, A.Y., CASTEBURY, L.A., CROUS, P.W., MADRID, H., CHUKEATIROTE, E., HYDE, K.D. (2014): The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, **79**: 221–288.
- MANNINGER, S.-NÉ, MURÁNYI, I. (2009): Új kihívás a növénytermesztők számára: új betegség, a ramuláriás levélfoltosság hazai előfordulása és terjedése árpán. *Agrofórum*, **20**(6): 40–42.
- MARTIN, W., BRINKMANN, H., SAVONNA, C., CREFF, R. (1993): Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: Eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **90**: 8692–8696.
- MARSHALL, E. (2005) Taxonomy. Will DNA bar codes breathe life into classification? *Science*, **18**: Vol. 307. no. 5712: 1037.
- MASI, M., MEYER, S., CLEMENT, S., ANDOLFI, A., CIMMINO, A., EVIDENTE, A. (2014): Spirostaphylotrichin W, a spirocyclic γ -lactam isolated from liquidculture *Pyrenophora seminiperda*, a potential mycoherbicide for cheatgrass (*Bromus tectorum*) biocontrol. *Tetrahedron*, **70**: 1497–1501.
- MATHRE, D.E. (1987): *Compendium of Barley Diseases*. St. Paul, MN: APS Press, 18–20.
- MATHRE, D.E. (1997): *Compendium of Barley Diseases*. 2nd edition. St. Paul, MN: APS Press.

- MATHUR, R.S., MATHUR, S.C., BAJPAI, G.K. (1964): An attempt to estimate loss caused by the stripe disease of barley. *Pant Disease Reporter*, **48**: 708–710.
- MAURER, J.J., LEE, M.D., LOBSINGER, C., BROWN, T., MAIER, M., THAYER, S.G. (1998): Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Disease*, **42**: 431–451.
- MAY, G.S., TSANG, M.L.S., SMITH, H., FIDEL, S., MORRIS, N.R. (1987): *Aspergillus nidulans* β -tubulin genes are unusually divergent. *Genetics*, **55**(2-3): 231–243.
- McCARTNEY, H.A., FOSTER, S.J., FRAAIJE, B.A., WARD, E. (2003): Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, **59**(2): 129–142.
- McDONALD, B.A., LINDE, C. (2002): The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, **124**: 163–180.
- McDONALD, W.C. (1963): Heterothallism in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology*, **53**:771–773.
- McDONALD, W.C. (1967): Variability and the inheritance of morphological mutants in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology*, **57**: 747–755.
- McLEAN, M.S., HOWLETT, B.J., HOLLAWAY, G.J. (2009): Epidemiology and control of spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*) of barley, a review. *Crop Pasture Science*, **60**: 303–315.
- McLEAN, M.S., KEIPER, F.J., HOLLAWAY, G.J. (2010): Genetic and pathogenic diversity in *Pyrenophora teres* f. *maculata* in barley crops of Victoria, Australia. *Australasian Plant Pathology*, **39**: 319–325.
- MENZIES, J.G., BAKKEREN, G., MATHESON, F., PROCUNIER, J.D., WOODS, S. (2003): Use of inter-simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphisms to analyze genetic relationships among small grain infecting species of *Ustilago*. *Phytopathology*, **93**: 167–175.
- MEYER, S.E., QUINNEY, D., NELSON, D.L., WEAVER, J. (2007): Impact of the pathogen *Pyrenophora seminiperda* on *Bromus tectorum* seedbank dynamics in North American cold deserts. *Weed Research*, **47**: 54–62.
- MILLER, M.A., PFEIFFER, W., SCHWARTZ, T. (2010): “Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees” in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1–8.
- MISHRA, P. K., TEWARI, J. P., CLEAR, R. M., TURKINGTON, T. K. (2004): Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annual Applied Biology*, **145**: 299–307.
- NEI, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **70**: 3321–3323.
- NEI M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*, New York, Columbia University Press.
- NEI, M., CHESSER, R.K. (1983): Estimation of fixation indices of gene diversities. *Annual Human Genetics*, **47**: 253–259.

- NEI M., LI, W.H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**:5269–5273.
- NGUYEN, L.T., SCHMIDT, H.A., VON HAESLER, A., MINH, B.Q. (2015): IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **32**(1): 268–274.
- NISHIKADO, Y. (1925): On the *Helminthosporiose* on cereal-plants. Res. Agr. (Nogaku Kenkyu) VII: 163–193. In Japanese.
- NOACK, F. (1905): *Helminthosporium gramineum* Rabenh. und *Pleospora trichostoma* Wint. (Zeits. Pflanzenkr. XV. 193–205.
- NYLANDER, J.A.A., WILGENBUSCH, J.C., WARREN, D.L., SWOFFORD, D.L. (2008): AWTY (are we there yet?): A system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics*, **24**: 581–583.
- O'DONNELL, K., CIGELNIK, E., NIRENBERG, H.I. (1998): Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, **90**: 465–493.
- PANACCIONE, D.G., HANAU, R.M. (1990): Characterization of two divergent β -tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. *Genetics*, **86**(2): 163–170.
- PALÁGYI, A., TOMCSÁNYI, A. (2006): Őszi árpák természetes fertőződése lisztharmattal és hálózatos levélfoltossággal 2003-2005 között. *Gyakorlati Agroforum*, **17**(6): 18–20.
- PAXTON, G.E. (1922): Studies on *Helminthosporium* species found on cultivated barley in California. (Abstract) *Phytopathology*, XII: 446–447.
- PECCHIA, S., MERCATELLI, E., VANMACCI, G. (1998): PCR amplification and characterization of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA in *Pyrenophora graminea*. *FEMS Microbiology Letters*, **166**: 21–27.
- PEEVER, T.L., MILGROOM, M.G. (1994): Genetic structure of *Pyrenophora teres* populations determined with random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal Botany*, **72**: 915–923.
- PENG, G., BOYETCKO, S.M. (2006): Effect of variable dew temperatures on infection of green foxtail by *Pyricularia setariae*, *Drechslera gigantea* and *Exserohilum rostratum*. *Biological Control*, **39**: 539–546.
- PELTONEN, S., JALLI, M., KAMMIOVIRTA, K., KARJALAINEN, R. (1996): Genetic variation in *Drechslera teres* populations have indicated by RAPD markers. *Annual Applied Biology*, **128**:465–477.
- PEREYRA, S.A., GERMÁN, S.F. (2004): First report of spot type of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* in Uruguay. *Plant Disease*, **88**(10): 1162.
- PINTYE, A. (2012): *Ampleomyces* hiperparaziták lisztharmatgombákban: gazdagomba-specializáció, intracelluláris termőtestképzés és gyakorlati alkalmazás. Doktori értekezés, ELTE.

- PLATZ, G.J., BELL, K.L., REES, R.G., GALEA, V.J. (2000): Pathotype variation of the Australian net blotch populations. In.: LOGUE S., ed. *Proceedings of the 8th International Barley Genetics Symposium*, Vol. III., Adelaide S.A.: Manning Press, 160–162.
- PON, D.S. (1949): Physiologic specialization and variation in *Helminthosporium teres*. (Abstr.) *Phytopathology*, **38**: 18.
- PUNT, P.J., DINGEMANSE, M.A., JACOBS-MEIJSSING, B.J., POUWELS, P.H., VAN DEN HONGEL, C.A. (1988): Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, **69**(1): 49–57.
- PRYOR, M. B., GILBERTSON, R. L. (2000): Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, **104**: 1312–1321.
- RABENHORST, G.L. (1856): Klotzschii Herbarium vivum mycologicum sistens fungorum per totam germaniam crescentium collectionem perfectam...Ed. II., Century III., no. 332.
- RAU, D., BROWN, A.H.D., BRUBAKER, C.L., ATTENE, G., BALMAS, V., SABA, E., PAPA, R. (2003): Population genetic structure of *Pyrenophora teres* Drechs. the causal agent of net blotch in Sardinian landraces of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **106**: 947–959.
- RAU, D., MAIER, F.J., PAPA, R., BROWN, A.H.D., BALMAS, V., SABA, E., SCHAFER, W., ATTENE, G. (2005): Isolation and characterization of the mating-type locus of the barley pathogen *Pyrenophora teres* and frequencies of mating-type idiomorphs within and among fungal populations collected from barley landraces. *Genome*, **48**: 855–869.
- RAU, D., ATTENE, G., BROWN, A.H.D., NANNI, L., MAIER, F.J. BALMAS, V., SABA, E., SCHAFER, W., PAPA, R. (2007): Phylogeny and evolution of mating-type genes from *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley ‘net blotch’ disease. *Current Genetics*, **51**: 377–392.
- RICHARDSON, M.J.A., WHITTLE, A.M., JACKS, M. (1976): Yield-loss relationship in cereals. *Plant Pathology*, **25**: 21–30.
- ROBINSON, J. (2000): Yield of doubled haploid lines of Nordic spring barley infected of net blotch, *Pyrenophora teres*. *Plant Breeding*, **119**(3): 219–222.
- RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M.A., HUELSENBECK, J.P. (2011): MrBayesian3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, **61**(3): 539–542.
- ROSTRUP, E. (1888): Fungi Groenlandiae: Medd. an Gronland, 3, 517-590. Kobenhavn.
- SAYOUD, R., BENDIF, N. (1995): Barley leaf blights in Algeria. *Rachis*, **14**(1/2): 61–63.
- SCOTT, D.B. (1992): Assessment of resistance in barley to *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora japonica*. *Crop Protection*, **11**: 240–242.
- SDROVICHNÉ HORVÁTH, E., VIOLA, J.-NÉ (1986): Terjedő tavasziárpa betegségek. *Magyar Mezőgazdaság*, **41**(20): 11.

- SERENIUS, M., MANNINEN, O., WALLWORK, H., WILLIAMS, K. (2007): Genetic differentiation in *Pyrenophora teres* populations measured with AFLP markers. *Mycological Research*, **111**: 213–223.
- SERENIUS, M., MIRONENKO, N., MANNINEN, O. (2005): Genetic variation, occurrence of mating types and different forms of *Pyrenophora teres* causing net blotch of barley in Finland. *Mycological Research*, **109**: 809–817.
- SHELDON, A.L. (1969): Equitability indices: dependence on the species count. *Ecology*, **50**: 466–467.
- SHIPTON, W.A., KHAN, T.N., BOYD, W.J.R. (1973): Net blotch of barley. *Annual Review of Plant Pathology*, **52**: 269–290.
- SHOEMAKER, R.A. (1959): Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris* grass parasites segregated from 'Helminthosporium'. *Canadian Journal of Botany*, **37**: 879–887.
- SHOEMAKER, R.A. (1962): *Drechslera* Ito. *Canadian Journal of Botany*, **40**: 829–830.
- SIMPSON, E.H. (1949): Measurement of diversity. *Nature*, **163**: 688.
- SIVANESAN, A. (1987): Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*, **158**: 180–181.
- SKORDA, E. (1972): Effect of the fungus *Helminthosporium gramineum* on yield of barley and its control by disinfection of the seeds with fungicides. *Geoponika*, **18**(208): 230–239.
- SMEDEGÅRD-PETERSEN, V. (1971): *Pyrenophora teres* f. *maculata* f. nov. and *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley in Denmark. *Yearbook of the Royal Veterinary and Agricultural University*. Copenhagen, DK 124–144.
- SMEDEGÅRD-PETERSEN, V. (1972): The perithecial and pycnidial stages of *Pyrenophora teres* and their significance in disease development of net blotch of barley. *Physiological Plant Pathology*, **10**: 203–211.
- SMEDEGÅRD-PETERSEN, V. (1983): Cross fertility and genetic relationship between *Pyrenophora teres* and *P. graminea*. The causes of net blotch and leaf stripe of barley. *Seed Science and Technology*, **11**: 673–680.
- SMITH, R.L. (1989): Extreme value analysis of environmental time series: An example based on ozone data (with discussion). *Statistical Science*, **4**: 367–393.
- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. (1973): Numerical taxonomy. W.h. Freeman, San Fransisco.
- SOMMERHALDER, R.J., MCDONALD, B.A., ZHAN, J. (2006): The frequencies and spatial distribution of mating types in *Stagonospora nodorum* are consistent with recurring sexual reproduction. *Phytopathology*, **96**(3): 234–239.
- STADEN, R., BEAL, K.F., BONFIELD, J.K. (2000): The Staden package 1998. *Methods in Molecular Biology*, **132**: 115–130.
- STATKEVIČIŪTĖ, G., BRAZAUSKAS, G., SEMASKIENE, R., LEISTRUMAITE, A., DABKEVICIUS, Z. (2010): *Pyrenophora teres* genetic diversity as detected by ISSR analysis. *Žemdirbystė-Agriculture*, **97**: 1392–1396.

- STEFFENSON, B.J., WEBSTER, R.K. (1992): Pathotype diversity of *Pyrenophora teres* f. *teres* in barley. *Phytopathology*, **82**: 170–177.
- STEFFENSON, B.J., WEBSTER, R.K., JACKSON, L.F. (1991): Reduction in yield loss using incomplete resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in barley. *Plant Diseases*, **75**: 96–100.
- STEVENS, E.A, BLAKEMORE, E.J.A., REEVERS, J.A. (1998): Relationships amongst barley and oat infecting isolates of *Pyrenophora* spp. based on sequences of internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. Molecular PlantPathology On-line. Available on the internet: <http://www.bspp.org.uk/mppl/1998/1111stevens/paper.htm> Reference: 15.2.2006.
- STEWART, T.E., ALLEN, P.S. (2009): First report of *Pyrenophora seminiperda* in Turkey and Greece. *Plant Disease*, **75**(12): 1351.
- SUNESON, C.A. (1946): Effect of barley stripe, *Helminthosporium gramineum* Rab. on yield. *Journal American Society of Agronomy*, **38**: 945–955.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725–2729.
- TANABE, Y., SAIKAWA, M., WATANABE, M.M., SUGIYAMA, J. (2004): Molecular phylogeny of *Zygomycota* based on EF-1 α and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**(2): 438–449.
- TAYLOR, E.J.A., STEVENS, E.A., BATES, J.A., MORREALE, G., LEE, D., KENYON, D.M., THOMAS, J.E. (2001): Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. *Plant Pathology*, **50**: 347–355.
- TAYLOR, J.W., JACOBSON, D.J., FISHER, M.C. (1999): The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, **37**: 197–246.
- TEKAUZ, A. (1990): Characterization and distribution of pathogenic variation in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* from western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **12**(2): 141–148.
- TEKAUZ, A., MILLS, J.T. (1974): New types of virulence in *Pyrenophora teres* in Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, **54**: 731–734.
- TIBAYRENC, M., KJELLBERG, F., ARNAUD, J., OURY, B., BRENIERE, S.F., DARDE, M., AYALA, F.J. (1991): Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**: 5129–5133.
- TOMCSÁNYI, A., SZEŐKE, K., TÓTH, Á. (2006): Az őszi árpa védelme. *Növényvédelem*, **42**: 87–106.
- TÓTH, B., CSŐSZ, M., KOPAHNKE, D., VARGA, J. (2008): First report on *Pyrenophora teres* causing lesions of wheat leaves in Hungary. *Plant Pathology*, **57**: 385.
- UBRIZSY, G. (1965): Növénykórtan I-II. Akadémiai Kiadó, Budapest

- VAN DE PEER, Y., DE WACHTER, R. (1994): TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, **10**: 569–570.
- VAN DEN BERG, C.G.J., ROSSNAGEL, B.G. (1991): Epidemiology of spot-type net blotch on spring barley in Saskatchewan. *Phytopathology*, **81**: 1446–1452.
- VOIGT, K., COZIJNSEN, A.J., KROYMANN, J., PÖGGELER, S., HOWLETT, B.J. (2005): Phylogenetic relationships between members of the crucifer pathogenic *Leptosphaeria maculans* species complex as shown by mating type (MAT1-2), actin and β -tubulin sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**: 541–557.
- WAINWRIGHT, P.O., HINKLE, G., SOGIN, M.L., STICKEL, S.K. (1993): Monophyletic origins of the Metazoa: An evolutionary link with fungi. *Science*, **260**: 340–342.
- WALLWORK, H., LINCHON, A., SIVANESAN, A. (1992): *Drechslera wirreganensis* – a new hyphomycete affecting barley in Australia. *Mycological Research*, **96**(10): 886–888.
- WANG, Y., GENG, Y., MA, J., PEI, Y.F., ZHANG, X-G. (2010): Molecular and morphological description of the two new species of *Stemphylium* from China and France. *Mycologia*, **102**: 708–717.
- WEBSTER, J. (1951): Graminicolous *Pyrenomyces* II. The occurrence of the perfect stage of *Helminthosporium teres* in Britain. *Transaction of the British Mycological Society*, **34**: 309–317.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 7213–7218.
- WERY, J., DALDERUP, M.J., TER LINDE, J., BOEKHOUT, T., VAN OOYEN, A.J. (1996): Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast*, **12**(7): 641–651.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J., (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. (eds): *PCR protocol, a guide to method and applications*. 315–322. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531–6535.
- WILLIAMS, K.J., SMYLL, C., LICHON, A., WONG, K.Y., WALLWORK, H. (2001): Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens causing spot form and net form of net blotch of barley. *Australian Plant Pathology*, **30**: 37–44.
- WOLFF, A.M., ARNAU, J. (2002): Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal Genetics and Biology*, **35**(1): 21–29.
- WU, H.L., STEFFENSON, B.J., LI Y., OLESON, A.E., ZHONG, S. (2002): Genetic variation for virulence and RFLP markers in *Pyrenophora teres*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **25**: 82–90.

- YEH, F.C., BOYLE, T.J.B. (1997): Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, **129**: 157.
- YOUSFI, B.E., EZZAHIRI, B. (2002): Net blotch in semiarid regions of Morocco II. Yield and yield-loss modeling. *Field Crops Research*, **73**: 81–93.
- ZABEAU, M., VOS, P. (1993): Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, Publication 0534858-A1, Office européen des brevets, Paris.
- ZANE, L., BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, **11**: 1–16.
- ZHANG, G., BERBEE, M. (2001): *Pyrenophora* phylogenetics inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, **93**: 1048–1063.

M2. A dolgozat során vizsgált izolátumok adatai

Sor-szám	Fajnév	Törzskód	Párosodási típus	Gazdanövény	Fajtanév, vagy kombináció	Gyűjtés helye	Gyűjtés éve	Terület jellege
Délkeleti régió								
1	Drechslera graminea	H-172	1	ŐÁ		Szeged	2007.03.28	K
2	Drechslera teres f. maculata	H-236	2	B	KG Bendegúz	Bóly	2006	K
3	Drechslera teres f. maculata	H-247	1	B	GK Holló	Bóly	2006	K
4	Drechslera teres f. maculata	H-262	1	B	GK Kalász	Szeged-Kecskés	2006	K
5	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-160	1	ŐÁ	Vanessa	Kiszombor-Makó	2007	K
6	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-161	1	ŐÁ		Kiszombor-Makó	2007	K
7	Drechslera teres f. maculata	H-269	2	B	Mv 11-04	Eszterágpusztá	2007	K
8	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-371		ŐÁ	Vanessa	Kiszombor	2008	K
9	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-372	2	ŐÁ	Vanessa	Kiszombor	2008	K
10	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-373		ŐÁ	Vanessa	Kiszombor	2008	K
11	Drechslera teres f. maculata	H-430		ŐÁ	Nelly	Bácsborsod	2009	Ü
12	Drechslera teres f. maculata	H-494		ŐÁ	GK Árpád	Szeged	2010	K
13	Drechslera teres f. maculata	H-170	2	ŐÁ		Eszterágpusztá	2007.04.04	K
14	Drechslera teres f. maculata	H-332	1	ŐÁ	Rex	Békéssámsón	2008.05.26	Ü
15	Drechslera teres f. maculata	H-461		ŐÁ	Botond	Gyula	2008.05.26	Ü
16	Drechslera teres f. maculata	H-468		ŐÁ		Hódmezővásárhely	2008.05.28	Ü
17	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-297/2		TÁ	Sebastian	Szeged	2008.06.25	K
18	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-298/2		TÁ	Sebastian	Szeged	2008.06.25	K
19	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-470		ŐÁ		Szegvár	2008.05.28	Ü
20	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-471		ŐÁ		Szegvár	2008.05.28	Ü
21	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-456		ŐÁ	Nelly	Fadd	2008.06.03	Ü
22	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-457		ŐÁ	Nelly	Fadd	2008.06.03	Ü
23	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-453		ŐÁ		Nagykereké	2008	Ü
24	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-454		ŐÁ		Nagykereké	2008	Ü
25	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3}	H-455		ŐÁ		Nagykereké	2008	Ü
26	Drechslera teres f. teres	H-237	1	B	Gaspard	Bóly	2006	K

27	Drechslera teres f. teres	H-238		B	GK Kapos	Bóly	2006	K
28	Drechslera teres f. teres	H-239	2	B	GK Csillag	Bóly	2006	K
29	Drechslera teres f. teres	H-241		B	Pannónia	Székkutas	2006	K
30	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-243	2	B	BY-15	Székkutas	2006	K
31	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-244	2	B	BY-15	Székkutas	2006	K
32	Drechslera teres f. teres	H-245	1	B	GK Élet	Székkutas	2006	K
33	Drechslera teres f. teres	H-250	1	B	Pliska / GK Réka // GK Élet	Szeged-Kecskés	2006	K
34	Drechslera teres f. teres	H-251	1	B	Pliska / GK Réka // GK Élet	Szeged-Kecskés	2006	K
35	Drechslera teres f. teres	H-255		B	GK Holló 2 / GK Holló 6	Szeged-Kecskés	2006	K
36	Drechslera teres f. teres	H-256	1	B	Pliska / GK Réka // GK Élet	Szeged-Kecskés	2006	K
37	Drechslera teres f. teres	H-257	1	B	Pliska / GK Réka // GK Élet	Szeged-Kecskés	2006	K
38	Drechslera teres f. teres	H-258		B	Pliska / GK Réka // GK Élet	Szeged-Kecskés	2006	K
39	Drechslera teres f. teres	H-159	2	ŐÁ		Kiszombor-Makó	2007	Ü
40	Drechslera teres f. teres	H-162	1	ŐÁ		Kiszombor-Makó	2007	K
41	Drechslera teres f. teres	H-204	1	ŐÁ	Rex	Öregcsertő	2007	Ü
42	Drechslera teres f. teres	H-205	1	ŐÁ	Rex	Homokmégy	2007	Ü
43	Drechslera teres f. teres	H-267	1	B	Mv Pálma	Eszterárgpuszta	2007	K
44	Drechslera teres f. teres	H-268	1	B	GK Kalász	Eszterárgpuszta	2007	K
45	Drechslera teres f. teres	H-376	2	B		Márok	2008	Ü
46	Drechslera teres f. teres	H-200	2	TÁ	Ebson	Nemesnádudvar	2007.06.08	Ü
47	Drechslera teres f. teres	H-201	1	TÁ		Miske	2007.07.11	Ü
48	Drechslera teres f. teres	H-282	1	ŐÁ	Nelly	Szolnok	2008.04.	Ü
49	Drechslera teres f. teres	H-337	1	ŐÁ	KH Tas	Kétsoprony	2008.05.26	Ü
50	Drechslera teres f. teres	H-339	2	ŐÁ	Rex	Murony	2008.05.27	Ü
51	Drechslera teres f. teres	H-357	1	ŐÁ	Botond	Orosháza	2008.05.27	Ü
52	Drechslera teres f. teres	H-463	1	ŐÁ		Derekegyház	2008.05.28	Ü
53	Drechslera teres f. teres	H-469	1	ŐÁ	Rex	Öcsény	2008.06.06	Ü
54	Drechslera teres f. teres	H-410/2	2	ŐÁ		Kunszentmiklós	2009.06.02	Ü
55	Drechslera teres f. teres	H-478	1	ŐÁ		Kalocsa	2009.06.12	Ü
56	Drechslera teres f. teres	H-308/2	2	ŐÁ		Székkutas	2008.05.22	Ü

57	Drechslera teres f. teres	H-309/2	1	ÖÁ	NKI152	Eszterágpuszta	2008.05.26	K
58	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3}	H-465		ÖÁ		Szentes	2008.05.28	Ü
59	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3}	H-466		ÖÁ		Szentes	2008.05.28	Ü
60	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3}	H-467		ÖÁ		Szentes	2008.05.28	Ü
61	Drechslera teres f. teres^{1,2,3}	H-447	1	ÖÁ	Rex	Jánoshalma	2009.06.12	Ü
62	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3}	H-448		ÖÁ	Rex	Jánoshalma	2009.06.12	Ü
Északkeleti régió								
63	Drechslera graminea	H-164	2	ÖÁ	Vanessa	Debrecen	2006.05.24	K
64	Drechslera teres f. maculata	H-266		B		Debrecen	2007	K
65	Drechslera teres f. maculata	H-365	2	B	SWS 700.1574	Jászboldogháza	2007	K
66	Drechslera teres f. maculata	H-163	2	ÖÁ	Fridericus	Debrecen	2006.05.24	K
67	Drechslera teres f. maculata	H-171	1	ÖÁ	KH Viktor	Kompolt	2007.03.28	K
68	Drechslera teres f. maculata	H-187	1	ÖÁ	Petra	Tiszabecs	2007.06.04	Ü
69	Drechslera teres f. maculata	H-364	2	B	SWS 700.1574	Jászboldogháza	2007	Ü
70	Drechslera teres f. teres	H-265	2	B	GK Kovász	Debrecen	2006	K
71	Drechslera teres f. teres	H-173		ÖÁ		Jászfényszaru	2007	Ü
72	Drechslera teres f. teres	H-178		ÖÁ		Szolnok	2007	Ü
73	Drechslera teres f. teres	H-179		ÖÁ		Törökszentmiklós	2007	Ü
74	Drechslera teres f. teres	H-203	2	ÖÁ		Jászágó	2007	Ü
75	Drechslera teres f. teres	H-431		ÖÁ		Bodroghalom	2009	Ü
76	Drechslera teres f. teres	H-444		ÖÁ		Bodroghalom	2009	Ü
77	Drechslera teres f. teres	H-165	1	ÖÁ	Nelly	Debrecen	2006.05.24	Ü
78	Drechslera teres f. teres	H-166	1	ÖÁ	Amorosa	Debrecen	2006.05.24	Ü
79	Drechslera teres f. teres	H-186	1	ÖÁ	Petra	Kölse	2007.06.04	Ü
80	Drechslera teres f. teres	H-189	2	ÖÁ		Fényeslitke	2007.06.04	Ü
81	Drechslera teres f. teres	H-190	2	ÖÁ	Palinka	Nagyvarsány	2007.06.04	Ü
82	Drechslera teres f. teres	H-191	2	ÖÁ	KH Viktor	Hodász	2007.06.04	Ü
83	Drechslera teres f. teres	H-192	1	ÖÁ	Palinka	Bátorliget	2007.06.04	Ü
84	Drechslera teres f. teres	H-209	2	TÁ	Scarlett	Halma	2007.06.07	Ü
85	Drechslera teres f. teres	H-358	1	TÁ		Karanesség	2008.06.09	Ü

86	Drechslera teres f. teres	H-359	2	TÁ	Maress	Endrefalva	2008.06.09	Ü
87	Drechslera teres f. teres	H-462	1	ŐÁ	Vanessa	Szügy	2008.06.09	Ü
88	Drechslera teres f. teres	H-464	2	ŐÁ	Laverda	Balassagyarmat	2008.06.09	Ü
89	Drechslera teres f. teres	H-458	2	TÁ		Ujdombrád	2008.06.10	Ü
90	Drechslera teres f. teres	H-361	2	TÁ		Tizsakarád	2008.06.17	Ü
91	Drechslera teres f. teres	H-360	2	TÁ	Passadéna	Sajópüspöki	2008.06.18	Ü
92	Drechslera teres f. teres	H-340/1	2	ŐÁ	Candessen	Igrici	2008.06.19	Ü
93	Drechslera teres f. teres	H-377	1	ŐÁ	Candessen	Emőd	2008.06.19	Ü
94	Drechslera teres f. teres	H-438	2	TÁ	Ebson	Cserháthaláp	2009.06.05	Ü
95	Drechslera teres f. teres	H-428	1	TÁ		Apagy	2009.06.07	Ü
96	Drechslera teres f. teres ^{1,2}	H-175	1	ŐÁ		Szolnok	2007	Ü
97	Drechslera teres f. teres ^{1,2}	H-176	1	ŐÁ		Szolnok	2007	Ü
98	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-432		TÁ		Tomor	2009	Ü
99	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-436		TÁ		Tomor	2009	Ü
100	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-426	1	TÁ		Tomor	2009	Ü
101	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-427		TÁ		Tomor	2009	Ü
102	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-429	1	TÁ	Jubilant	Karancsság	2009.06.04	Ü
103	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-437		TÁ	Jubilant	Karancsság	2009.06.04	Ü
104	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-433	1	TÁ	Imperiál	Tizaszőlős	2009.06.17	Ü
105	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-434		TÁ	Imperiál	Tizaszőlős	2009.06.17	Ü
106	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-435		TÁ	Imperiál	Tizaszőlős	2009.06.17	Ü
107	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-439		TÁ	Imperiál	Tizaszőlős	2009.06.17	Ü
108	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-440		TÁ	Imperiál	Tizaszőlős	2009.06.17	Ü
109	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-441		TÁ	Imperiál	Tizaszőlős	2009.06.17	Ü
110	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-442		TÁ	Imperiál	Tizaszőlős	2009.06.17	Ü
111	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-443		TÁ	Imperiál	Tizaszőlős	2009.06.17	Ü
112	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-473	2	ŐÁ	Mauritia	Mezőkeresztes	2009.06.17	Ü
113	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-474		ŐÁ	Mauritia	Mezőkeresztes	2009.06.17	Ü
Központi Régió								
114	Drechslera teres f. maculata	H-248	1	B	GK Jupiter	Kocs	2006	K

115	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3,4}	H-259	1	B	GK Jupiter	Kocs	2006	K
116	Drechslera teres f. maculata ^{1,2,3,4}	H-260		B	GK Jupiter	Kocs	2006	K
117	Drechslera teres f. maculata	H-261	1	B	GK Jupiter	Kocs	2006	K
118	Drechslera teres f. maculata	H-285		ŐÁ	KH-CENTER	Martonvásár	2008.05.16	K
119	Drechslera teres f. maculata	H-320/2	1	ŐÁ		Tordas	2008.06.12	Ü
120	Drechslera teres f. teres	H-240	2	B	GK Öthalom	Bábolna	2006	K
121	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-252	1	B	GK Ati	Kocs	2006	K
122	Drechslera teres f. teres ^{1,2,3,4}	H-253	1	B	GK Ati	Kocs	2006	K
123	Drechslera teres f. teres	H-264	1	B	GK Ati	Kocs	2006	K
124	Drechslera teres f. teres	H-112	2	ŐÁ		Mór	2006.04.	Ü
125	Drechslera teres f. teres	H-289		ŐÁ	F74-82/MANAS//SZD0205	Martonvásár	2008.05.16	K
126	Drechslera teres f. teres¹	H-284	2	ŐÁ	KH-TURUL	Martonvásár	2008.05.16	K
127	Drechslera teres f. teres¹	H-287	2	ŐÁ	F74-82/MANAS//SZD4002	Martonvásár	2008.05.16	K
128	Drechslera teres f. teres¹	H-288	2	ŐÁ	20899YH2/PETRA	Martonvásár	2008.05.16	K
129	Drechslera teres f. teres¹	H-313/1	2	ŐÁ	Petra	Martonvásár	2008.05.16	K
130	Drechslera teres f. teres¹	H-317/1	1	ŐÁ	Nelly	Martonvásár	2008.05.16	K
131	Drechslera teres f. teres¹	H-321/1	2	ŐÁ	KH-Center	Martonvásár	2008.05.16	K
132	Drechslera teres f. teres¹	H-322	2	ŐÁ		Martonvásár	2008.06.10	K
133	Drechslera teres f. teres¹	H-310/2	1	ŐÁ		Tordas	2008.06.12	K
134	Drechslera teres f. teres¹	H-314/1	2	ŐÁ		Tordas	2008.06.12	K
135	Drechslera teres f. teres¹	H-323	1	ŐÁ		Tordas	2008.06.12	K
136	Drechslera teres f. teres¹	H-324/1	2	ŐÁ		Tordas	2008.06.12	K
137	Drechslera teres f. teres^{1,2,3}	H-327	1	ŐÁ		Kocs	2008.06.19	Ü
138	Drechslera teres f. teres^{1,2,3}	H-335	2	ŐÁ		Kocs	2008.06.19	Ü
139	Drechslera teres f. teres^{1,2,3,4}	H-325	1	TÁ		Tordas	2008.06.12	K
140	Drechslera teres f. teres^{1,2,3,4}	H-336	1	TÁ		Tordas	2008.06.12	K
Nyugati Régió								
141	Drechslera graminea	H-184	1	TÁ		Táplánszentkereszt	2008	K
142	Drechslera graminea	H-119/2	2	ŐÁ	Annabell	Táplánszentkereszt	2006.05.31	K

143	Drechslera graminea	H-120/2	1	ÖÁ	Gotic	Táplánszentkereszt	2006.05.31	K
144	Drechslera graminea	H-157	1	ÖÁ		Keszthely	2007.05.04	K
145	Drechslera graminea	H-158	1	ÖÁ		Keszthely	2007.05.04	K
146	Drechslera graminea	H-290		ÖÁ	Paris	Táplánszentkereszt	2008.05.09	K
147	Drechslera graminea	H-311/1		ÖÁ	(madison x khmalko)	Táplánszentkereszt	2008.05.09	K
148	Drechslera graminea	H-312		ÖÁ	(khagria x ns 54o m)	Táplánszentkereszt	2008.05.09	K
149	Drechslera graminea	H-291		ÖÁ	((osk 439 x vdh 2115-89) x lp 2-935)	Táplánszentkereszt	2008.05.21	K
150	Drechslera graminea	H-408/2	2	TÁ	CI 9819	Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
151	Drechslera graminea	H-305/2		TÁ	Habzó	Táplánszentkereszt	2008.06.18	K
152	Drechslera teres f. maculata	H-183	1	ÖÁ		Táplánszentkereszt	2007	K
153	Drechslera teres f. maculata	H-276	1	B	GK Holló	Táplánszentkereszt	2007	K
154	Drechslera teres f. maculata	H-501/1	1	ÖÁ	Fridericus	Táplánszentkereszt	2010	K
155	Drechslera teres f. maculata	H-502/1	1	ÖÁ	Pasadena	Táplánszentkereszt	2010	K
156	Drechslera teres f. maculata	H-197	1	TÁ		Egyházashollós	2007.06.12	Ü
157	Drechslera teres f. maculata	H-229	1	TÁ	Scarlett	Szombathely	2007.06.13	Ü
158	Drechslera teres f. maculata	H-301		TÁ	Dán Sebastian 1	Táplánszentkereszt	2008.06.24	K
159	Drechslera teres f. maculata	H-302	2	TÁ	Sebastian	Szeged	2008.06.24	K
160	Drechslera teres f. maculata	H-387/1	1	TÁ		Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
161	Drechslera teres f. maculata	H-388/1	1	TÁ		Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
162	Drechslera teres f. maculata	H-398	1	TÁ	Pasadena	Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
163	Drechslera teres f. maculata	H-399/1	2	TÁ	Cyrl	Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
164	Drechslera teres f. maculata	H-407/2	1	TÁ	CI 5791	Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
165	Drechslera teres f. maculata	H-409/1	2	TÁ	Pasadena (ha 534)	Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
166	Drechslera teres f. maculata	H-195		TÁ	Xanadu	Rum	2007.06.13	Ü
167	Drechslera teres f. maculata	H-307/3		ÖÁ	KA 08020 (fajtajelölt)	Röjtökmuzsaj	2008.06.18	K
168	Drechslera teres f. maculata ¹	H-476		ÖÁ		Hédervár	2009.05.26	Ü
169	Drechslera teres f. teres	H-182	1	ÖÁ		Táplánszentkereszt	2007	K
170	Drechslera teres f. teres	H-202	1	ÖÁ	KA 15293 fj.	Győr	2007	K
171	Drechslera teres f. teres	H-270	2	B	Bd 546 / Pnd // Hrd / Btd	Táplánszentkereszt	2007	K
172	Drechslera teres f. teres	H-271	2	B	GK Kalász	Táplánszentkereszt	2007	K

173	Drechslera teres f. teres	H-272		B	GK Élet / GK Kalász	Táplánszentkereszt	2007	K
174	Drechslera teres f. teres	H-273		B	GK Héja / Kharkovskaya	Táplánszentkereszt	2007	K
175	Drechslera teres f. teres	H-275	1	B	GK Rába / GK Kalász	Táplánszentkereszt	2007	K
176	Drechslera teres f. teres	H-277		B	Bd 546 / Pnd // Hrd / Btd	Táplánszentkereszt	2007	K
177	Drechslera teres f. teres	H-278		B	24.97 /3/ 28.97 // Chil / Chum 18	Táplánszentkereszt	2007	K
178	Drechslera teres f. teres	H-279	1	B	24.97 /3/ 28.97 // Chil / Chum 18	Táplánszentkereszt	2007	K
179	Drechslera teres f. teres	H-346	2	B	GK Holló	Táplánszentkereszt	2007	K
180	Drechslera teres f. teres	H-347	2	B	GK Cipó / GK Borona	Táplánszentkereszt	2007	K
181	Drechslera teres f. teres	H-348	2	B	GK Cipó / GK Borona	Táplánszentkereszt	2007	K
182	Drechslera teres f. teres	H-350	1	B	GK Borona / GK Öthalom	Táplánszentkereszt	2007	K
183	Drechslera teres f. teres	H-352	1	B	GK Borona / GK Öthalom	Táplánszentkereszt	2007	K
184	Drechslera teres f. teres	H-353	1	B	GK Favorit / GK Dávid	Táplánszentkereszt	2007	K
185	Drechslera teres f. teres	H-354	1	B	GK Favorit / GK Dávid	Táplánszentkereszt	2007	K
186	Drechslera teres f. teres	H-355	1	B	GK Tiszatáj/81.F.379	Táplánszentkereszt	2007	K
187	Drechslera teres f. teres	H-374	2	B		Bőny	2008	Ü
188	Drechslera teres f. teres	H-375	2	B		Bőny	2008	Ü
189	Drechslera teres f. teres	H-114/1		TÁ	Pasadena	Táplánszentkereszt	2006.05.31	K
190	Drechslera teres f. teres	H-169	2	ŐÁ	KH Korsó	Mosonmagyaróvár	2007.04.03	K
191	Drechslera teres f. teres	H-196	2	TÁ		Egyházasdaróc	2007.06.12	Ü
192	Drechslera teres f. teres	H-198	2	TÁ	Passadéna	Püspökmolnári	2007.06.13	Ü
193	Drechslera teres f. teres	H-230	1	TÁ	Jubilant	Chernelházadamonya	2007.06.13	Ü
194	Drechslera teres f. teres	H-231	2	TÁ	Coralba	Sárvár	2007.06.13	Ü
195	Drechslera teres f. teres	H-472	2	ŐÁ	Scarlett	Sárvár	2009.06.07	Ü
196	Drechslera teres f. teres	H-386/1		TÁ	GK Habzó	Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
197	Drechslera teres f. teres	H-304		TÁ	Dán Sebastian	Táplánszentkereszt	2008.06.24	K
198	Drechslera teres f. teres¹	H-294	1	TÁ		Táplánszentkereszt	2008.06.18	K
199	Drechslera teres f. teres¹	H-296	2	TÁ		Táplánszentkereszt	2008.06.18	K
200	Drechslera teres f. teres¹	H-306/1	2	TÁ	Henley	Táplánszentkereszt	2008.06.18	K
201	Drechslera teres f. teres¹	H-303	1	TÁ	Dán Sebastian 2	Táplánszentkereszt	2008.06.24	K
202	Drechslera teres f. teres¹	H-185	1	ŐÁ		Táplánszentkereszt	2007	K

203	Drechslera teres f. teres ¹	H-477	2	ŐÁ		Hédervár	2009.05.26	Ü
204	Drechslera teres f. teres ¹	H-383/1	2	TÁ	Scarlett	Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
205	Drechslera teres f. teres ¹	H-393/1	1	TÁ	GK Judy	Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
206	Drechslera teres f. teres ¹	H-396/1	2	ŐÁ		Táplánszentkereszt	2009.06.22	K
207	Drechslera teres f. teres ¹	H-497/3	2	ŐÁ	Pasadena	Táplánszentkereszt	2010.06.09	K
208	Drechslera teres f. teres ¹	H-500/1	2	ŐÁ	Mandolina	Táplánszentkereszt	2010.06.09	K

Megjegyzés: az indexszámok jelzik az azonos helyszínen gyűjtött izolátumok esetében, az azonos tábláról (1), parcelláról (2), levélről (3), vagy nektrózisról (4) való származást. A félkövéren szedett izolátumok szerepeltek a RAPD-analízis során is.

Ü = üzemi; K = kísérleti

B = búza; TA = tavaszi árpa; ŐÁ = őszi árpa

Párosodási típus: 1 = MAT1; 2 = MAT2

M3. A vizsgálatok során alkalmazott PCR reakciók és primerek

primerpár	szekvencia	elődenaturáció		ciklus szám	denaturáció		összekapcsolás		elongáció		utópolimerizáció	
		s	°C	db	s	°C	s	°C	s	°C	s	°C
PTT-F PTT-R	5'TCTGGCGAACCGTTC3' 5'ATGATGGAAAAGTAATTTGTA3'	150	94	35	30	94	35	65»56	35	72	120	72
PG2-F PG2-R	5'CTTCTTAGCTGGGGCTACCGTC3' 5'ACCGACTCGGAAAAGAGCA3'	120	94	35	60	94	60	68	60	72	600	72
PTM-F PTM-R	5'TGCTGAAGCGTAAGTTTC3' 5'ATGATGGAAAAGTAATTTGTG3'	150	94	35	30	94	35	65»56	35	72	120	72
MAT1-F MAT1-R	5'AACAGACTCCTCTTGACAACCCG3' 5'TGACGATGCATAGTTTGTAAGGGT3'	180	94	30	30	94	30	56	30	72	600	72
MAT 2-F MAT2-R	5'CAACTTTTCTCTACCACACGTATCCC3' 5'TGTGGCGATGCATAGTTCGTAC3'	180	94	30	30	94	30	57	30	72	600	72
ITS1-F ITS4-R	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	180	94	35	45	94	30	57	60	72	600	72
T1-F Bt2b-R	5'AACATGCGTGAGATTGTAAGT3' 5'ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC3'	300	94	40	60	94	60	57	120	72	420	72
actin17-F actin 18-R	5'TGGGACGATATGGAAAATCTGGCA3' 5'TTAGAAGCACTTGCGGTG3'	300	94	40	60	94	60	57	120	72	420	72
gpd 1-F gpd-2-R	5'CAACGGCTTCGGTCGCATTG3' 5'GCCAAGCAGTTGGTTGTGC3'	300	94	40	60	94	60	65	120	72	420	72

Megjegyzés: s=másodperc; 65»56=ciklusonként csökkentettük a hőmérsékletet 65°C-ról 56°C-ra

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Bakonyi Józsefnek, aki megismertette velem a pirenofóra gombákat és a kutatói munka izgalmas világába bevezetett, valamint Dr. Tóth Beátának, aki a molekuláris technikák rejtelseit tanította meg nekem és lelkes szavaival támogatott és biztatott végig a munkám során.

Köszönettel tartozom Szabó Lászlónénak, Csorba Ildikónak és Kótai Évának a laboratóriumi munkálatokban nyújtott hasznos segítségükért.

Külön köszönetet szeretnék mondani dr. Kovács M. Gábornak, aki a filogenetikai elemzések során nyújtott szakmai segítséget a kezdetekben.

Hálával tartozom Kollégáimnak, a megyei Kormányhivatalok Növény- és Talajvédelmi Osztály dolgozóinak a számos levélminta begyűjtéséért, Szamák Tibornak a térképek elkészítéséért, valamint Szabóné Komlósi Évának az angolban nyújtott segítségéért.

Köszönetet szeretnék mondani dr. Csősz Lászlónénak, aki a búzáról származó pirenofórákat biztosította számomra.

Ez a munka nem jöhetett volna létre, ha a főnökeim Jordán László és Holló László nem biztosít számomra erre lehetőséget. Köszönöm!

És végül de, nem utolsó sorban a férjemnek tartozom mérhetetlen hálával, aki elindított és végig biztatott ebben a munkában, köszönöm a türelmét, a szakmai segítségét és a támogatását.

A kutatást az NKTH OMFB-01505/2006 számú, valamint a DTR_2007 azonosítójelű pályázatait támogatták.