



SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

FICSOR ANITA

**Gödöllő
2017**

A doktori iskola

megnevezése: Szent István Egyetem

tudományága: Agrártudományok

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

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

Társ-témavezető: Dr. Tóth Beáta
Ph.D., tudományos főmunkatárs
Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ
Növénytermesztési Önálló Kutatási Osztály

.....
iskolavezető jóváhagyása

.....
témavezető jóváhagyása

.....
társ-témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) igen értékes és fontos gabonaféle, melyet világszerte termesztnek. 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). Magyarországon 2014-ben 322 ezer tonna a 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). Hazánkban legjelentősebbek – évjáratonként és fajtánként eltérő mértékben – a vírusok által kiváltott törpülések, az árpalisztharmat, az árpalevéltrozsa, a pirenofóras levélfoltosságok és a kalászfuzáriózis, de a rinospóriumos és ramuláriás levéltbetegségek előfordulása is fokozódik (MANNINGER és MURÁNYI 2009, TOMCSÁNYI et al. 2006).

Az árpa pirenofóras, 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 levélsíkoltságot 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. neveket 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 fajsztíntű 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* képes ivarosán és ivartalanul is szaporodni, ezért a gomba populációk genetikai szerkezete jelentősen függ e két szaporodási mód relatív gyakoriságától (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.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. *Izolátumgyűjtemény*

2006 és 2010 között mintegy 157 tipikus, atipikus vagy szokatlan tüneteket mutató őszi és/vagy tavaszi árpa leveleket gyűjtöttünk országszerte (nyugati, központi, délkeleti és északkeleti-régió), jelentős részben a megyei Kormányhivatalok Növény- és Talajvédelmi Osztályain dolgozók segítségével. A búzáról származó 51 db izolátumot és a hozzátartozó adatokat Dr. Csősz Lászlóné biztosította számunkra. A begyűjtött leveleket feldolgozásig szárított, lepréselt állapotban, papírzacskóban tároltuk szobahőmérsékleten. Izoláláskor a léziókról nedveskamrás inkubálás után sztereomikroszkóp alatt konídiumokat távolítottunk el, és burgonya-dextróz-agaron egykonídiumos tenyészeteket állítottunk elő. Izolátumaink fenntartása ferde burgonya-dextróz-agaron történt 15°C-on steril paraffinolaj alatt.

2.2. *Atipikus levéltünetekről származó izolátumok morfológiai és patogenitási vizsgálata*

Négy olyan árpalevélről származó izolátumot (kiszombori, röjtökmuzsaji, szeged-kecskéstelepi és táplánszentkereszti) választottunk ki, melyek számunkra szokatlan nekrotikus tüneteket mutató levélről származtak, gyaníthatóan valamilyen pirenofóra gomba általi fertőzés következtében. Kontrollként általunk korábban molekuláris módszerrel azonosított két *P. teres* f. *teres* törzset vontunk be a laboratóriumi tesztekbe.

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 9 cm-es Petri-csészékben (20 ml agar/csésze) 22°C-on.

A kórokozók fertőzőképességének bizonyítására mesterséges visszafertőzést hajtottunk végre micélium-szuszpenziók Botond hatsoros

takarmány árpa 2–4 leveles fiatal növénykéire való permetezésével (5 növény/cserép, 2 cserép/izolátum). Kontrollként vizes kezelést alkalmaztunk. A fertőzés után a növényeket 24 óráig 100% relatív páratartalom mellett 20°C-on sötétben, majd 70% páratartalom mellett 24°C/20°C-os fény/sötét ciklusban neveltük három hétig, majd a törzseket visszaizoláltuk és újra morfológiai és molekuláris genetikai vizsgálatoknak vetettük alá őket.

Mikroszkóp segítségével 200–400× nagyításon izolátumonként 25 konídiumnak és konídiumtartónak jegyeztük fel a jellemző alak- és mérettani paramétereit. Adataink eltéréseinek statisztikai megbízhatóságát t-próbával és egytényezős varianciaanalízissel teszteltük.

2.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok

DNS-kivonás

A DNS-kivonáshoz fagyasztva szárított tenyészetekből micéliumport készítettünk. A teljes genomi DNS kivonását három különböző módszerrel végeztük. Egyrészt AUSUBEL és munkatársai (1994) CTAB-alapú módszerét alkalmaztuk kisebb módosítással, valamint 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.

Kórokozók azonosítása specifikus PCR-rel

Valamennyi izolátumunkat teszteltük a *P. teres* f. *teres*, *P. teres* f. *maculata* és *P. graminea* PCR-es azonosítására kifejlesztett indítószekvencia-párokkal. Összesen 25 µl végtérfogatú PCR-elegyet készítettünk (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). Indítószekvenciapáronként külön reakciókban történt a DNS-sokszorosítás Bio-Rad C1000-es PCR-készülékkel

WILLIAMS és munkatársai (2001), illetve TAYLOR és munkatársai (2002) szerint (1. táblázat). Negatív kontrollként DNS helyett steril Milli-Q vizet használtunk. A kapott termékeket etídium-bromiddal festettük és UV-fénnyel tettük láthatóvá.

Párosodási típusok meghatározása specifikus PCR-rel

A párosodási típus meghatározására mások által (RAU et al. 2005) a MAT1 és MAT2 allélokra kifejlesztett specifikus indítószekvenciákkal dolgoztunk. A PCR-reakció (1. táblázat) során 20 µl végtérfogatú elegyet készítettünk (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), majd a DNS-sokszorosítást követően, mintánként 5 µl PCR-termékeket 1,2 % agarózgélben (Gibco) futtattuk, és a gélt UV-fényben fotóztuk és értékeltük, a várt termék megléte vagy hiánya alapján.

A *Pyrenophora teres f. teres* genetikai változékonyságának vizsgálata RAPD-analízissel

RAPD-hoz az Operon Technologies Inc. (Alameda, Amerikai Egyesült Államok) 30 db indítószekvenciáit használtuk (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). A PCR-elegy 20 µl volt (10 µl Dream Taq™ PCR Master Mix, 2-2 µl primer, 4 µl steril desztillált víz és 2 µl DNS). A DNS-sokszorosítást Eppendorf Mastercycler® 96-well PCR típusú készülékkel végeztük (elő-denaturáció: 94°C – 2 min, 45 ciklus (denaturáció: 94°C – 1 min; anelláció: 35°C – 1 min; elongáció: 72 °C – 2 min) utó polimerizáció: 72°C – 5 min), majd elektroforézist követően UV-fény segítségével tettük láthatóvá a termékeket. Minden amplifikálást háromszor ismételtünk.

Kiértékelés során, a látható RAPD-fragmentekből bináris mátrixot hoztunk létre, majd a mátrix alapján kiszámoltuk az izolátumaink közötti genetikai távolságot NEI és Li együtthatóval (NEI és LI 1979), majd UPGMA (Unweighted

Pair-Group Method with Arithmetic mean) klaszter analízissel (SNEATH és SOKAL 1973) készítettük az izolátumok közötti genetikai távolságot képileg ábrázoló dendrogramot. Mindezekhez a TREECON 1.3b szoftvert használtuk (VAN DE PEER és DE WACHTER 1994).

Különböző izolátum-csoportokon belüli és azok közötti genetikai polimorfizmusok és differenciáltság mérésére kiszámoltuk a polimorf lokuszok gyakoriságát és Nei-féle gén diverzitást (NEI 1973, 1987). A Nei-féle genetikai differenciáltság statisztikai megbízhatóságát a X^2 (Khí-négyzet) próba mintájára genetikai tanulmányokban alkalmazott G^2 -teszttel vizsgáltuk. A genotípusos változékonyság mérésére a Shannon-index és a Simpson-féle index szolgált.

Árpát fertőző *Pyrenophora* fajok filogenetikai rokonságának vizsgálata

A filogenetikai vizsgálatokba bevont izolátumok különböző földrészekről és országokból származtak. Összesen 13 *P. graminea*, 13 *P. teres* f. *maculata* és 15 *P. teres* f. *teres* törzset tanulmányoztunk. Külcsoportnak a közelrokon *Pyrenophora tritici-repentis* faj egy izolátumát (WAC11137) választottunk.

Filogenetikai vizsgálatainkhoz négy olyan sejtmagi DNS-szakaszt választottunk (riboszomális DNS ITS, β -tubulin, aktin és a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz), mely más gombák esetében alkalmasnak bizonyultak rokonsági kapcsolatok feltárására. PCR-es sokszorosításuk során a reakció-elegyek 50 μ l végtérfogatúak voltak. Az egyes fragmentumok sokszorosítását 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.

A közvetlen szekvencia-meghatározáshoz PCR-termékeinket elküldtük a Macrogen Europe (Amszterdam, Hollandia) részére, ahol tisztítást követően Sanger-féle eljárással határozták meg azok nukleotidsorrendjét. A kapott

elektroforegramokat a Staden programcsomaggal (STADEN et al. 2000) ellenőriztük és manuálisan javítottuk a szekvenciákat.

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.

A 4 genomszakasz illesztett szekvenciáiból egy összesen 2375 nukleotid hosszúságú többgénese adatfájlt állítottunk össze, s a korábbiakban kiválasztott modelleket alkalmazva készítettünk ML és Bayesian 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 MrBayes v3.2.3 (RONQUIST et al. 2011) szoftverrel végeztük.

1. táblázat A vizsgálatok során alkalmazott PCR-ciklusok és primerek

primerpár	fejlesztő	elődenaturáció		ciklusok száma	denaturáció		összekapcsolás		elongáció		utópolimerizáció	
		s	°C	db	s	°C	s	°C	s	°C	s	°C
PTT-F/R	WILLIAMS et al. (2001)	150	94	35	30	94	35	65»56	35	72	120	72
PG-F/R	TAYLOR et al. (2001)	120	94	35	60	94	60	68	60	72	600	72
PTM-F/R	WILLIAMS et al. (2001)	150	94	35	30	94	35	65»56	35	72	120	72
MAT 1 F/R	RAU et al. (2005)	180	94	30	30	94	30	56	30	72	600	72
MAT 2 F/R	RAU et al. (2005)	180	94	30	30	94	30	57	30	72	600	72
ITS1 F/ ITS4R	WHITE et al. (1990)	180	94	35	45	94	30	57	60	72	600	72
T1-F Bt2b-R	GLASS and DONALDSON (1995)	300	94	40	60	94	60	57	120	72	420	72
actin17-F actin 18-R	VOIGT et al. (2005)	300	94	40	60	94	60	57	120	72	420	72
gpd 1-F gpd-2-R	BERBEE et al. (1999)	300	94	40	60	94	60	65	120	72	420	72

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

3. EREDMÉNYEK

3.1. Atipikus tünetekről származó izolátumok jellemzői

Szokatlan tünetekről származó négy ismeretlen *Pyrenophora* izolátumunk jellemzőit hasonlítottuk össze a PTT két referenciatörzsével. A konídiumtartók és többsejtű, hengeres konídiumaik alakja, valamint mérettani jellemzői tekintetében a két csoport nagyon hasonló paraméterekkel rendelkezett. Közöttük T-próbával statisztikailag igazolt, de csak igen kismértékű mérettani különbséget a konídiumtartók csúcsi sejtjeinek szélessége, valamint a konídiumok maximális szélessége, alapi sejtjeik hossza és szélessége, álharántfalaik száma és csúcsi sejtjeik szélessége vonatkozásában állapítottunk meg. Ennek ellenére varianciánalízissel, a konídiumok álharántfalainak száma kivételével, mindegyik vizsgált jellemző vonatkozásában volt olyan ismeretlen identitású izolátum, amelyik szignifikánsan nem különbözött a PTT-törzsektől, vagyis az egyes izolátumok a legtöbb vizsgált határozójellegben nagyon hasonlóak voltak.

Négy ismeretlen izolátumunkat nem lehetett elkülöníteni egymástól és a PTT-törzsektől tenyészetmorfológiájuk alapján. Telepeik színe halványszürkétől olajzöldig terjedt, szélük többnyire ép, ritkábban kissé szabdalt volt. Kukoricaliszt-agar kivételével tömött és alacsony, esetenként felálló csomókkal tarkított légmicélium fejlődött. Ivaros és ivartalan szaporító- és kitartóképleteket nem képeztek. Azonosítandó tenyészeink telepnövekedési sebessége tág határok között változott. Leggyorsabban rendszerint BD-agarokon, leglassabban malátakivonat-agaron nőttek, de ez utóbbi kivételével valamennyi táptalaj esetében átfedéseket figyeltünk meg a PTT referenciaizolátumokkal.

A patogenitási vizsgálat során már a kezelést követő 4. nap nagyon apró nekrozisok jelentek meg mind az ismeretlen izolátumainkkal, mind pedig a két PTT referenciatörzssel fertőzött növények levelein. Ekkor még nem voltak tünettani eltérések. A nekrozisok fokozatosan növekedtek, és végül a 19. napon már két markánsan elhatárolható tünettípus alakult ki. 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 kontroll növények levelei tünetmentesek maradtak.

3.2. Molekuláris vizsgálatok eredményei

3.2.1. Izolátumok azonosítása specifikus PCR-rel

Összesen 208, pirenofórás 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. A minták nyolc helyszínről származnak 2006-ban, harminckettő helyszínről 2007-ben, harminchárom helyszínről 2008-ban, tizennégy helyszínről 2009-ben és két helyszínről 2010-ben. A legtöbb izolátumot 2007-ben (az izolátumok 29%-a) és 2008-ban (34%) gyűjtöttük. Izolátumaink legnagyobb része (32%) a nyugati régióból, míg legkevesebb (13%) Magyarország központi régiójából származnak. Az izolátumok nagy részét (102 db, 49%) őszi árpáról, 26% tavaszi árpáról (55 db) és 25% őszi búzáról (51 db) gyűjtöttük.

Molekuláris vizsgálataink során 142 db (68%) *Pyrenophora teres* f. *teres* törzset azonosítottunk. A PTT-k legnagyobb része (31%) az északkeleti régióból, legkisebb része (15%) 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 PTT volt a domináns kórokozó árpán és búzán egyaránt mindegyik évben, 2010 kivételével, mely évről csak 5 izolátumot vizsgáltunk.

A megvizsgált izolátumok közül 53 db (26%) *Pyrenophora teres* f. *maculatanak* bizonyult. Az izolátumok szintén az ország különböző régióiból származnak: legtöbbet (46%) a délkeleti régióból gyűjtöttünk. PTM-et izoláltunk a következő, számunkra szokatlan tünettípusokról: - szabálytalan alakú apró

nekrózisok; - ovális nekrotikus foltok, melyek tipikus PTM tüneteknek felelnek meg, mellettük az elszórtan elhelyezkedő nekrotikus pettyek; - rövid, hosszúkás nekrosis, melyek mind a korábbi irodalmi adatokkal, mind a saját vizsgálatainkkal egybevágnak.

Izolátumgyűjteményünkben 13 db (6%) *Pyrenophora graminea* törzset azonosítottunk, aminek nagyobb része (84,6%) a nyugati régióból származik. Az izolátumok minden esetben alaptól induló hosszanti nekrotikus csíkokról származtak. 2010 kivételével minden évben gyűjtöttünk PG izolátumot.

3.2.2. Párosodási típusok eloszlása

Összesen 8 PG, 31 PTM és 109 PTT izolátum párosodási típusát határoztuk meg és vizsgáltuk azok eloszlását különböző régiókban, gyűjtési években és gazdanövényeken.

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 *P. 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, a délkeleti és a nyugati régiókban a MAT1, míg az északkeleti régióban a MAT2 volt nagyobb arányban.. 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, 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. 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 (48%) PTT izolátum őszi árpáról származik, míg 28%-a búzáról és 24% 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.

3.2.3. *A Pyrenophora teres* f. *teres* genetikai variabilitása RAPD-analízissel

A RAPD-vizsgálatba bevont hatvannyolc PTT izolátumot 43 árutermelő üzemi tábláról és 4 kísérleti állomásról gyűjtöttük összesen 45 helyszínről 4 földrajzi régióban (nyugati, központi, délkeleti és északkeleti). 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.

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

Az izolátumok genetikai rokonságát UPGMA klaszter analízissel vizsgáltuk. 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. 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 tagjaitól. A IV. klaszterbe 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 alkládjában 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 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 alpopulációtól. 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 % ($P < 0,0001$).

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

A többgénés **filogenetikai** elemzésünk során az illeszték hossza összesen 2375 nukleotid volt, mely 762 bp actin, 508 bp β -tubulin, 596 bp *gpd* és 509 db ITS1-5,8S-ITS2 szakaszból állt. 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 többgénes szekvenciátípus és összességében kicsi változékonyságot mutattak.

Az aktin szekvenciákat 3 haplotípusba lehetett sorolni, 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 partíció szekvenciáit 4 haplotípusba lehetett sorolni. A PG monomorfnak mutatkozott. A 26PTM és 21PTT egyedülként tartalmaztak azonos haplotípust, a maradék PG, PTM és PTT izolátumok pedig kórokozónként más-más haplotípusokat képviseltek.

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.

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.

A többgénes szekvenciákból készített *P. tritici-repentis*hez gyökereztetett ML-törzsfán 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 külcsoporthoz vezető gyökér kivételével egyetlen elágazás bootstrap-értéke sem érte el a statisztikai megbízhatósághoz általában minimálisan megkívánt 70%-ot.

A Bayes-módszerrel készített törzsfa 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.

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.

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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. Atipikus tünetekről származó izolátumok azonosítása

A 2006 és 2010 között gyűjtött, atipikus tüneteket mutató árpa levelek vizsgálata során 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 fajsztíű meghatározásban véleményünk szerint megkérdőjelezhető e képletek változékonysága miatt. Az atipikus levéltünetekről származó kórokozó izolátumainkat nem lehetett elkülöníteni egymástól, sem a PTT referenciatörzsektől tenyészetmorfológiájuk 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 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.

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

A három kórokozó hazai eloszlását tekintve, a legtöbb (68%) izolátum *Pyrenophora teres* f. *teres* volt, míg *P. teres* f. *maculata* törzsből 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.

A *P. graminea* törzsek kismértékű előfordulásának az alkalmazott fungicid 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 konídiumai képesek újabb fertőzéseket okozni egy tenyészidőszakban. 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.

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. 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). Vizsgálataink során mindkét párosodási típust azonosítottuk mindhárom kórokozónál. Továbbá, néhány évben (2007, 2008 és 2009) az összes régióban előfordult mindegyik vizsgált gomba faj/forma MAT1 és MAT2 izolátuma. Sőt mindkét párosodási típus előfordult 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.

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

Magyarországon elsőként vizsgáltuk a PTT populációinak genetikai variabilitását. Összesen 29 MAT1 és 39 MAT2 monospóras izolátumot vontunk be RAPD-vizsgálatainkba. Minden izolátumunk egyedi többlokuszos RAPD-haplotípusba tartozott. Ez a nagy genotípusos diverzitás egybeesik több *P. teres* populáció (svéd, lengyel, cseh, szlovák, litván, finn, ausztrál) vizsgálatának eredményével. 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). 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.

Mind a klaszterezés, mind a Nei-féle géndiverzitás analízis szerint az időbeli változások (évjárat) nagyobb hatással voltak izolátumaink genetikai változékonyságára, mint a párosodási típus, táblatípus vagy a származási hely. Ebben az értelemben eredményeink összhangban vannak cseh és finn *P. teres* populációkkal kapcsolatos megfigyelésekkel. Nem találtunk statisztikailag igazolt

genetikai eltérést a két párosodási típusba tartozó izolátumok között. Ennek legvalószínűbb magyarázata az lehet, hogy a populációban gyakori az ivaros szaporodás. Statisztikailag szignifikáns genetikai differenciát csak nagyon alacsony mértékben kaptunk a kétféle tábla típus (üzemi, illetve kísérleti) és a négy földrajzi régió között, valamint közepes mértékben az évjáratok között. Igaz, az üzemi és a kísérleti parcellák, valamint a földrajzi régiók közötti eltérés igen alacsony szintje azt valószínűsíti, hogy a mintázási időszak alatt az érintett területek között történt bizonyos mértékű génáramlás.

Hozzánk hasonlóan BATURO-CIESNIEWSKA és munkatársai (2012) négy lengyel vidékről származó, valamint PELTONEN és munkatársai (1996) Finnország különböző helyeiről gyűjtött izolátumok esetében sem találtak szoros összefüggést a RAPD-klaszterek és a *P. teres* származási helye között. Ugyanakkor a mi eredményeinkkel ellentétben évjáratonkénti eltérést nem figyeltek meg. 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. A *Cochliobolus sativus* (ivartalan alak: *Bipolaris sorokiniana*) gomba esetében a lézió belüli genetikai változékonyság fő okaként a konídiumképzés során bekövetkező kromoszómaátrendeződést valószínűsítették. Jelenleg nem tudjuk, hogy a mi két izolátumunk közötti eltérés is erre vezethető-e vissza, vagy pedig különböző genotípusok egyidejű fertőzése fordult elő. Ennek a kérdésnek a megválaszolása kívül esett vizsgálataink célján.

4.4. 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 izolátumokat és 4 különböző

génszakaszt vontunk be. Kulcsoportnak a búza fahéjbarna foltosságát okozó közelrokon *P. tritici-repentis* választottuk.

Többgénes 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.

5. FELHASZNÁLT IRODALOM

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- ERWIN, D.C., RIBERIO, O.K. (1996): *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St Paul, USA.
- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783–791.
- 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.
- HARTL, D.L., CLARK, A.G. (1989): *Principles of Population Genetics*. 2nd ed. Sunderland, MA, USA, Sinauer Associates.
- 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.
- KATOH, 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.
- 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., TEKAUZ, A. (1982): Occurrence and pathogenicity of *Drechslera teres* isolates causing spot-type symptoms on barley in Western Australia. *Plant Disease*, **66**: 423–425.
- 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.
- 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.
- MANNINGER, S., MURÁNYI, I. (2009): Új kihívás a növénytermesztők számára: új betegség, a ramuláriás levélfoltosság hazai előfordulása és terjedése árpán. *Agrofórum*, **20**(6): 40–42.
- MATHRE, D.E. (1997): *Compendium of Barley Diseases*. 2nd edition. St. Paul, MN: APS Press
- MCDONALD, B.A., LINDE, C. (2002): The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, **124**: 163–180.
- 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.
- MILLER, MA, 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.
- 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., 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.

- PALÁGYI, A., TOMCSÁNYI, A. (2006): Őszi árpák természetes fertőződése lisztharmattal és hálózatos levélfoltossággal 2003-2005 között. *Gyakorlati Agroforum*, **17**(6): 18–20.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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): MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, **61**(3): 539–542.
- 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. (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.
- 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 *Stagonosporanodorum* 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.
- STEFFENSON, B.J., WEBSTER, R.K. (1992): Pathotype diversity of *Pyrenophora teres* f. *teres* in barley. *Phytopathology*, **82**: 170–177.

- 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 Plant Pathology* On-line. Available on the internet: <http://www.bspp.org.uk/mppol/> 1998/1111stevens/paper.htm Reference: 15.2.2006.
- 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.
- TOMCSÁNYI, A., SZEŐKE, K., TÓTH, Á. (2006): Az őszi árpa védelme. *Növényvédelem*, **42**: 87–106.
- 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.
- 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.
- 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, K.J., SMYL, 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.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Idegen nyelvű impakt faktoros közlemény:

Ficsor, A., Bakonyi, J., Tóth, B., Tomcsányi, A., Palágyi, A., Csősz, M., Károlyi-Cséplő, M., Mészáros, K., Vida, Gy. (2010): First report of spot form of net blotch of barley caused by *Pyrenophora teres* f. *maculata* in Hungary. *Plant Disease* **94** (8): 1062. . DOI: 10.1094/PDIS-94-8-1062C. **IF: 2,387**

Ficsor, A., Bakonyi, J., Csősz, M., Tomcsányi, A., Varga, J., Tóth, B. (2014): Occurrence of barley pathogenic *Pyrenophora* species and their mating types in Hungary. *Cereal Research Communications* **42** (4): 612–619. DOI: 10.1556/CRC.2014.0014. **IF: 0,624**

Ficsor, A., Tóth, B., Varga, J., Csősz, M., Tomcsányi, A., Kótai, É., Bakonyi, J. (2014): Variability of *Pyrenophora teres* f. *teres* in Hungary as revealed by mating type and RAPD analyses. *Journal of Plant Pathology* **96** (3): 515–523. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I3.020>. **IF: 0,768.**

Magyar nyelvű lektorált tudományos közlemény:

Ficsor, A., Bakonyi, J., Csősz, L., Tomcsányi, A., Tóth, B., Palágyi, A., Cséplő, M., Mészáros, K., Vida, Gy. (2011): A *Pyrenophora teres* f. *maculata* magyarországi előfordulása árpa. *Növényvédelem* **47** (10): 405–412.

Magyar nyelvű egyéb közlemény:

Mészáros, K., Sztankovszky, P., **Ficsor, A.,** Bányai, J., Károlyiné Cséplő, M., Bakonyi, J. (2016): Amit tudni érdemes az árpa hálózatos levélfoltosságáról. *Agrárágazat* (ISSN: 1586-3832) **17**: 72–74.

Magyar nyelvű konferencia összefoglalók (abstracts):

Ficsor, A., Bakonyi, J., Csősz, L., Tomcsányi, A., Tóth, B., Palágyi, A., Károlyi Cséplő, M., Mészáros, K., Vida, Gy. (2009): A *Pyrenophora teres* f. *maculata* előfordulása Magyarországon. In: 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, 23-24 Február 2009., Budapest.

Ficsor, A., Tóth, B., Bakonyi, J., Varga, J., Kótai, É. (2012): Árpáról származó *Pyrenophora teres* izolátumok genetikai változékonysága. In: 58. Növényvédelmi Tudományos Napok, 21-22 Február 2012, Budapest.