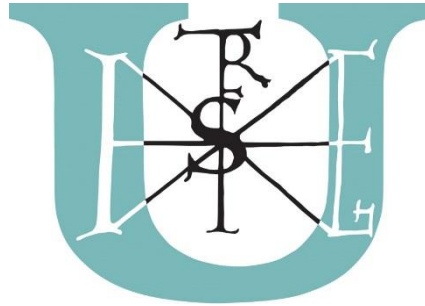




SZENT ISTVÁN EGYETEM

MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ
MONILINIA FAJOK BIOLÓGIAI DIVERZITÁSA
ÉS FUNGICID ÉRZÉKENYSÉGE

LANTOS ANNA LÍVIA
GÖDÖLLŐ
2016.

A doktori iskola

megnevezése:	Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok
vezetője:	Zámboriné dr. Németh Éva egyetemi tanár, DSc Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyógy és Aromanövények Tanszék
Témavezető:	Dr. Petróczy Marietta adjunktus, PhD Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszék Tanszék

1. A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. A monilíniás betegség általános jellemzése	9
2.1.1. A betegség jelentősége.....	9
2.1.2. A betegség tünetei.....	10
2.2. A <i>Monilinia</i> nemzetség jellemzése.....	13
2.2.1. A nemzetség rendszertana.....	13
2.2.2. Hazánkban jelenlévő fajok.....	14
2.2.3. A hazai fajok biológiája	16
2.2.4. <i>Monilinia</i> fajok dominanciája csonthéjas ültetvényekben	17
2.3. <i>Monilinia</i> fajok azonosítása.....	18
2.3.1. <i>Monilinia</i> fajok azonosítását segítő morfológiai és tenyészbélyegek.....	18
2.3.2. A molekuláris azonosítás módszerei.....	20
2.4. <i>Monilinia</i> fajok genetikai diverzitása	21
2.4.1. Az ITS régió szekvenciája alapján.....	23
2.5. A monilíniás betegség elleni védekezés lehetőségei	24
2.5.1. Agrotechnikai és mechanikai védekezés	24
2.5.2. Kémiai növényvédelem	25
2.6. A fungicid rezisztencia kialakulásának mechanizmusai	28
2.6.1. <i>Monilinia</i> fajok benzimidazol rezisztenciája	29
2.6.2. <i>Monilinia</i> fajok strobilurin rezisztenciája	31
2.6.3. <i>Monilinia</i> fajok triazol rezisztenciája.....	32
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	34
3.1. A vizsgálatok anyaga.....	34
3.1.1. Izolátumok	34
3.1.2. Táptalajok	34
3.1.3. Növényi részek.....	35
3.1.4. Eszközök.....	35
3.1.5. Fungicidek.....	35
3.1.6. Primerek.....	36
3.2. A vizsgálatok módszere.....	39
3.2.1. Szabadföldi felmérések	39

3.2.2. Laboratóriumi <i>in vitro</i> vizsgálatok	41
3.2.3. Molekuláris biológiai módszerek	43
3.2.4. Statisztikai módszerek	47
4. EREDMÉNYEK.....	49
4.1. Szabadföldi felmérések	49
4.1.1. <i>Monilinia</i> fajok dominanciája csonthéjasokon	49
4.1.2. A <i>Monilinia fructicola</i> virágfertőzésének.....	52
4.1.3. <i>Monilinia</i> fajok gyakorisága birsen	52
4.2. <i>Monilinia</i> fajok okozta tünetek.....	52
4.2.1. Csonthéjasokon megjelenő tünetek	52
4.2.2. Birsen megjelenő tünetek	55
4.3. <i>Monilinia</i> fajok azonosítása.....	56
4.3.1. <i>Monilinia</i> fajok morfológiai- és tenyészbélyegei	56
4.3.2. <i>Monilinia</i> fajok szekvenciaalapú azonosítása és rokonsági viszonyai	61
4.4. Patogenitás igazolása.....	70
4.5. Fungicidek hatékonysága	71
4.5.1. Az izolátumok fungicid érzékenysége mérgezett agarlemezen	71
4.5.2. A fungicid érzékenység molekuláris háttere.....	77
4.6. Új tudományos eredmények.....	81
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	82
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	95
7. SUMMARY	97
8. MELLÉKLETEK	99
1. melléklet: Irodalomjegyzék.....	99
2. melléklet: Az izolátumok neve, begyűjtött mintaszám, gazdanövénye, a gyűjtés helyszíne és éve	117
3. melléklet: Össznukleinsav kivonása tenyészetből.....	126
4. melléklet: Izolátumok hasonlóságának vizsgálata során felhasznált izolátumok génbanki azonosító kódjai.....	127
5. melléklet: A <i>Monilinia linhartiana</i> kórokozó általunk meghatározott génrészeinek azonosító kódjai.....	128
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	129

Rövidítések jegyzéke

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism, amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus
AKG	Agrár-Környezetgazdálkodási Program
ANOVA	Analysis of variance, varianciaanalízis
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BEAST	Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees
cDNS	complementary deoxyribonucleic acid, komplementer dezoxiribonukleinsav
CTAB	cetiltrimetil-ammónium-bromid
<i>cyp51</i>	14-demetiláz enzim
<i>cytb</i>	citokróm b
DNS	dezoxiribonukleinsav
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization, Európai és Mediterrán Növényvédelmi Szervezet
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee, Fungicid Rezisztencia Bizottság
HKY85 modell	Hasegawa, Kishino és Yano 1985 modell
ISSR	Inter Simple-Sequence Repeat, egyszerű belső szekvencia ismétlődés
ITS régió	Internal Transcribed Spacer region, köztes átíródó elválasztó régió
LMA	Leonian malt agar, Leonian maláta agar
<i>M.</i>	<i>Monilinia</i>
MCMC	Markov chain Monte Carlo, Markov-lánc Monte Carlo
MEA	Malt Extract Agar, maláta kivonat agar
MfABC1	ABC transzporter gén
MFC	<i>Monilinia fructicola</i>
MFG	<i>Monilinia fructigena</i>
MLX	<i>Monilinia laxa</i>
MLH	<i>Monilinia linhartiana</i>
MP-PCR	Microsatellite-primed PCR, PCR mikroszatellit primerrel
MPS	<i>Monilinia polystroma</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Biotechnológiai Információ Nemzeti Központja
PCR	Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció
PDA	Potato Dextrose Agar, burgonya dextróz agar

RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA, véletlen amplifikált mikroszatellitek
rDNS	riboszomális dezoxiribonukleinsav
SCAR	Sequence-Characterized Amplified Region, feltárt szekvenciájú amplifikált régió
SHAM	szalicilhidroxamin
SSR	Simple-Sequence Repeat, egyszerű szekvencia ismétlődés
<i>tub2</i>	β -tubulin

1. BEVEZETÉS

A monilíniás betegség világszerte a csonthéjasok és almatermésűek termesztésének gazdaságilag meghatározó tényezője. A fertőzés következtében kialakuló virágelhalás és gyümölcsrothadás súlyosan veszélyezteti az azévi termésmennyiséget, míg a hajtáselhalás és a fertőzés továbbterjedése következtében kialakuló rákos sebek az évek során a fák kondíciójának fokozatos leromlását, más tényezőkkel együtt pedig a fák pusztulását okozhatják. Napjainkig a magyarországi ültetvényekben öt *Monilinia* faj kártétele ismert, közülük kettő az utóbbi évtizedben került hazánkba.

A *Monilinia laxa* és *Monilinia fructigena* őshonos kórokozók Európában, az ellenük történő védekezés módszerei régóta kidolgozottak. Az elmúlt években azonban a növényvédelmi technológiák következetes alkalmazása mellett is gyakran járványszerűen károsított a *M. laxa* kórokozó az ország különböző termesztőközreteiben. Egyes feltételezések szerint a faj új, agresszívebb törzsei, patotípusai jelentek meg (Rozsnyai és Vajna 2001), amelyek a korábbiaktól eltérően nem csak a meggyvirágok tömeges elhalásáért felelősek, hanem kajszin és egyes szilvafajtákon is rendszeresen járványos fertőzést okoznak. A különösen fogékony gazdanövények körének bővülése mellett a kórokozó növényvédő szerekre való érzékenysége is változóban van. Az utóbbi években végzett felmérések során több speciális hatáshelyű készítménnyel szemben ellenálló *M. laxa* és *M. fructigena* szubpopulációk kialakulását mutatták ki (Szödi és mtsai. 2008, Fazekas 2014).

A birs specifikus kórokozója, a *Monilinia linhartiana* szintén őshonos hazánk területén, elnevezését Linhart Györgyről a neves magyar botanikusról és mikológusról kapta. Jellemző tüneteit már az 1930-as években megfigyelték Magyarországon, viszont a kórokozó az utóbbi időben ritkábban jelent meg. A birs termőterületének növekedésével a kórokozó ismételtelen elterjedt a hazai ültetvényekben, amely akár súlyos kártétel kialakulásával fenyegethet, hiszen a mediterrán régióban esetenként 90–95%-os termésvesztésről is beszámolnak.

A *Monilinia fructicola* faj kártételét a hazai ültetvényekben először 2006-ban bizonyították (Kiss 2007). A gomba az utóbbi tíz évben az Európai Unió területén széles körben elterjedt, így 2014-ben megszűnt karantén státusza (Plant 2014), viszont hazai gyakoriságáról nem végeztek felméréseket. Elterjedése a hazai ültetvényekben a növényvédelmi technológia módosítását is maga után vonhatja, ahogyan ez a mediterrán területeken is történt. Olaszországban, Spanyolországban és Görögországban a kórokozó fertőzésének megakadályozása érdekében a termésérés időszakában további fungicides kezelések válnak szükségessé a gyümölcsök megóvása érdekében (Ogawa és mtsai. 1995).

A *Monilinia polystroma* faj 2008-ban egy újfelhértői almaültetvény hajtásainak elhalását okozta (Petróczy és Palkovics 2009). Hazánkban ez volt az egyetlen alkalom, amikor ennek a fajnak a károsítását figyelték meg. Azonban az utóbbi években Európa számos országában kimutatták jelenlétét csonthéjas és almatermésű gyümölcsökön egyaránt. Olaszországban jelenleg az almatermésűek gyümölcseit leggyakrabban fertőző *Monilinia* faj (Martini és mtsai. 2014a).

A monilíniás betegségekkel kapcsolatos vizsgálatok több szempontból is aktuálisak. Az ültetvényben jelen lévő fajok ismerete elengedhetetlen, hiszen meghatározzák a betegségek elleni védekezés módszereit. Jelenleg a *Monilinia* fajok gyakorisága Európa-szerte változóban van. A *M. fructicola* és *M. polystroma* fajok hazai elterjedésével a kórokozók gazdanövényköre, a gazdanövény fajok és fajták fogékonysága, az okozott tünetek és a szükséges növényvédelmi technológia is módosulhat.

Az új fajok megismerése mellett elengedhetetlen az őshonos fajok populációnak nyomon követése is. Csonthéjasok kultúrákban szükséges a monilíniás betegség kórokozói ellen a vegyszeres védekezés, így kiemelkedően fontos a fungicidek hatékonyságának megőrzése. Korábbi kutatások kimutattak ellenálló populációkat hazánkban, viszont rezisztens populációk egyelőre nem jelentek meg. Vizsgálataink során ezt a monitoring munkát folytattuk hatékony és fenntartható védekezési technológiák fejlesztése érdekében.

Vizsgálataink során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- A monilíniás betegséget okozó fajok hazai dominanciájának meghatározása Magyarország számos termesztőközvetének bevonásával;
- A *Monilinia* fajok által okozott tünetek megfigyelése és fertőzött minták begyűjtése;
- A fajok azonosítása morfológiai és tenyészbélyegek alapján, valamint molekuláris módszerekkel;
- A fajok rokonsági viszonyainak vizsgálata genetikai állományuk jellegzetes régióinak szekvenciái alapján (ITS régió, β -tubulin gén, 14 α -demetiláz gén);
- A kórokozók fungicid érzékenységeinek vizsgálata mérgezett agarlemez módszer segítségével;
- A rezisztencia kialakulásáért felelős mutációk molekuláris biológiai vizsgálata.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A monilíniás betegség általános jellemzése

2.1.1. A betegség jelentősége

A monilíniás betegség a gyümölcstermő növények jelentős betegsége világszerte (Agrios 1978), mely egyike a legrégebben ismerteknek (Glits 2000). A jellegzetes barna rothadásos tüneteket már a 18. század végén megfigyelték (Roberts és Dunegan 1932). Feltehetően először Persoon írta le a betegséget 1796-ban Európában, majd Peck (1881) már a gyümölcsrothadás gazdasági jelentőségére is felhívta a figyelmet. A virágpusztulás tünetet csak jóval később, 1900 körül jegyezték fel (Glits 2000). A hazai források már a 20. század elején fontos betegségként tartották számon a monilíniás betegséget és ismertették az ellene való védekezés módszereit (Kern 1912, Gróf és Révy 1929). Azóta is a hazai gyümölcsösök növényvédelmét meghatározó betegségek körébe tartozik (Balogh és Kovács 1974).

A *Monilinia* fajok a *Rosaceae* és az *Ericaceae* család számos fajt képesek megbetegíteni, közülük Batra (1991) nyolcat tart gazdaságilag jelentősnek. Károsításuk hazánkban csonthéjasokon és almatermésűeken jelentkezik: Batra (1991) szerint az őszibarack, a nektarin, a kajszi, a cseresznye legjelentősebb kórokozói, Moral és mtsai. (2008) a birsen okozott súlyos kártételüket ismerteti, míg Holb és Schnabel (2005) a *M. laxa* fajt a meggy pusztító kórokozójaként említi.

A monilíniás betegség a csonthéjasokon jelentős termés kiesést okoz a virág- és hajtáselhalás, valamint a termésrothadás következményeként (Zehr 1982, Batra 1991). Hazai megfigyelések alapján súlyos fertőzés esetén a meggyvirágok 60–90%-a, a hajtások és a vesszők 40–80%-a is elpusztulhat (Rozsnyay és Vajna 2001). A termésérés időszakában is súlyos veszteségeket okozhat, üzemi meggy ültetvényekben Szepessy (1967) 50–70%-os termésrothadásról számol be. Tárolás során további károk keletkezhetnek, Új-Zélandon 8 napos 20 °C-on történő tárolást követően a kajszi gyümölcsök 50%-a fertőződött (McLaren és mtsai. 1996). A betegség a gyümölcsfapusztulásban is jelentős szerepet játszik: a kialakuló rákos sebek a fák kondícióját és élettartamát is veszélyeztetik (Olgyay 1943, Wormald 1954). Súlyos tavaszi fertőzést követően a fák akár 2–3 éven belül kipusztulhatnak (Kállay és Szenci 2009).

Birsen is komoly károkat idéz elő a betegség. 2006-ban egy spanyolországi ültetvényben a hajtások 91,5%-a fertőződött (Moral és mtsai. 2011). Nevado és mtsai. (2011) szerint járványos fellépése esetén akár a virágok 95%-is fertőződhet. A birset megbetegítő *Monilinia* fajok (*M. linhartiana*, *M. fructigena*) fertőzése következtében 50–90%-os termés kiesés is jelentkezhet a kezeletlen ültetvényekben (Garic és mtsai. 1990), míg több spanyol szerző is beszámol róla, hogy

súlyosabb fertőzés esetén, akár az összes termés elpusztulhat (Moral és mtsai. 2008, Nevado és mtsai. 2011).

2.1.2. A betegség tünetei

A monilíniás betegség fellépése következtében változatos tünetek jelennek meg (1. táblázat). Csonthéjas növényeken virág- és hajtáselhalás, gyümölcsrothadás, valamint a fás részekben rákos sebek kialakulása jellemző. Almatermésűeken leggyakrabban gyümölcsrothadás alakul ki, de a Magyarországon ritkán megjelenő *Monilinia* fajok levél- és hajtáselhalást, valamint a fiatal gyümölcsök abortálódását is okozhatják.

1. táblázat: A hazánkban megbetegedést okozó *Monilinia* fajok által előidézett tünetek (Schellenberg 1923, Wormald 1954, Byrde és Willetts 1977, Glits 2000, van Leeuwen és mtsai. 2002, Gell és mtsai. 2007 nyomán)

Kórokozó	Gazdanövény-kör	Gyakori tünetek	Konídium-tömeg színe
<i>M. laxa</i>	almatermésűek	termésrothadás	szürke
	csonthéjasok	virág és hajtáselhalás, termésrothadás, ágrákosodás	
<i>M. fructigena</i>	almatermésűek, csonthéjasok	termésrothadás	okkersárga
<i>M. fructicola</i>	almatermésűek	termésrothadás	mogyoróbarna
	csonthéjasok	virág és hajtáselhalás, termésrothadás, ágrákosodás	
<i>M. polystroma</i>	almatermésűek, csonthéjasok	termésrothadás	barnássárga
<i>M. linhartiana</i>	birs	levél, virág és hajtáselhalás, kötődött termések elhalása	szürkésfehér

Virág- és hajtáselhalás

Csonthéjasok esetében a virágokon jelennek meg kora tavasszal az első a tünetek (Kern 1912). A fertőzés következtében a szíromlevelek vagy a bibe barnulni kezd (1. ábra), majd a barnulás az egész virágra kiterjed, végül a virág elhal (Olgyay 1943). Az elhalt virágok gyakran a hajtásokra száradva hónapokon keresztül a fán maradnak. A gomba micéliuma a kocsányon keresztül a hajtásba terjed tovább. A hajtás szövetei elhalnak, a víz- és tápanyagszállítás elmaradása következtében a hajtáson található levelek és kötődött termések is elpusztulnak (Ogawa és English 1960). Prillieux és Delacroix (1893) megfigyelései szerint a birsvirágok is megjelennek tünetek, azok rothadásnak indulnak, míg más szerzők ezt a tünetet nem említik (Schellenberg 1923, Moral és mtsai. 2011).

Levél- és hajtáselhalás

Birsen már a virágzás előtt megjelennek a tünetek (Alexandrescu és Morea 1964). A fiatal levelek a levélalaptól kiindulóan a vastagabb erek mentén vörösesbarnára színeződnek és fokozatosan elhalnak (Nevado és mtsai. 2011). Az elhalás a hajtásokban tovább terjed, a hajtáson található levelek elszáradnak (1. ábra), a hajtásokon repedések, majd rákos sebek alakulnak ki.



1. ábra: A monilíniás betegség következtében elhaló meggyvirág (A) és birs hajtás (B)
(fotó: Lantos 2014)

Kötődött termések elhalása

Birs esetében jellegzetes tünet a *M. linhartiana* fertőzése következtében a fiatal gyümölcsök elhalása. A kötődés után a termések növekedése leáll, majd fokozatosan elveszítik nedvességtartalmukat és az ágakra száradva mumifikálódnak (Batra 1991). Nyéki (2004) szerint a megfertőződött birsvirágok is képesek kötődni, megindulhat a termésfejlődés, de a fiatal 5–10 mm átmérőt elért gyümölcsök megállnak a növekedésben és elszáradnak. A *M. polystroma* kórokozó esetében Petróczy és Palkovics (2006) hasonló tüneteket figyelt meg almán: a fiatal kötődött termések fertőződését és elhalását. A *M. laxa* kórokozó kapcsán Holb és mtsai. (2013) írták le a kötődött termések elhalását meggyen (2. ábra). Megfigyeléseik alapján a szíromhullást követő 31 napig fertőződnek a kötődött termések és akár a 10 mm-es gyümölcsök is elhalhatnak.

Érőfélben lévő és érett gyümölcsök rothadása

A termésérés időszakában a gyümölcsökön barna rothadó foltok jelennek meg. Ezek a tünetek már zöld terméseken is megjelenhetnek (Byrde és Willetts 1977, Holb 2003), de elsősorban az érédo és az érett gyümölcsök fertőződnek könnyen (2. ábra). A barna foltok mérete gyorsan növekszik, a terméshéj alatti szövetek lágyan rothadnak (Kern 1912). A betegség átterjed a szomszédos gyümölcsökre, amennyiben azok összeérnek (Michailides és Morgan 1997). Az

elrothadt gyümölcsök a fán maradnak, fokozatosan kiszáradnak és gyümölcsmúmiákká alakulnak (Wormald 1945).



2. ábra: A monilíniás betegség következtében a fiatal kötődött meggy (A) és az érett őszibarack termékek (B) jellegzetesen rothadnak (fotó: Lantos 2015)

Rákos sebek

Az idősebb fás részeken a betegség következtében rákos sebek alakulnak ki. A csonthéjasoknál a fertőzött ágrészeken, gyümölcskocsánynál gyakran mézgacseppek jelennek meg (Weaver 1950), ezzel a növény - védekező mechanizmusának részeként - a kórokozó továbbterjedését igyekszik megakadályozni (Csorba és Berend 1965).

Szaporítóképletek megjelenése a fertőzött növényi részeken

A fertőzött növényi részeken megjelennek a gomba szaporítóképletei. A sztrómákon képződő konídiumláncok színe fajra jellemző (1. táblázat) (Byrde és Willetts 1977, Kiss 2007). A *M. fructigena* fajnál a sztrómák gyakran koncentrikus körökben jelennek meg a termékek felületén (Mordue 1979b). A *M. polystroma* sztrómáinak színét tekintve igen hasonló a *M. fructigena* sztrómáihoz, viszont a jellegzetes koncentrikus elrendeződést nem említik a szerzők (van Leeuwen és mtsai. 2002, Chalkley 2016). A *M. laxa* és *M. fructicola* sztrómái kisebbek, elszórtan vagy egységes bevonatként jelennek meg a fertőzött gyümölcsök felületén (Mordue 1979a, 1979c).

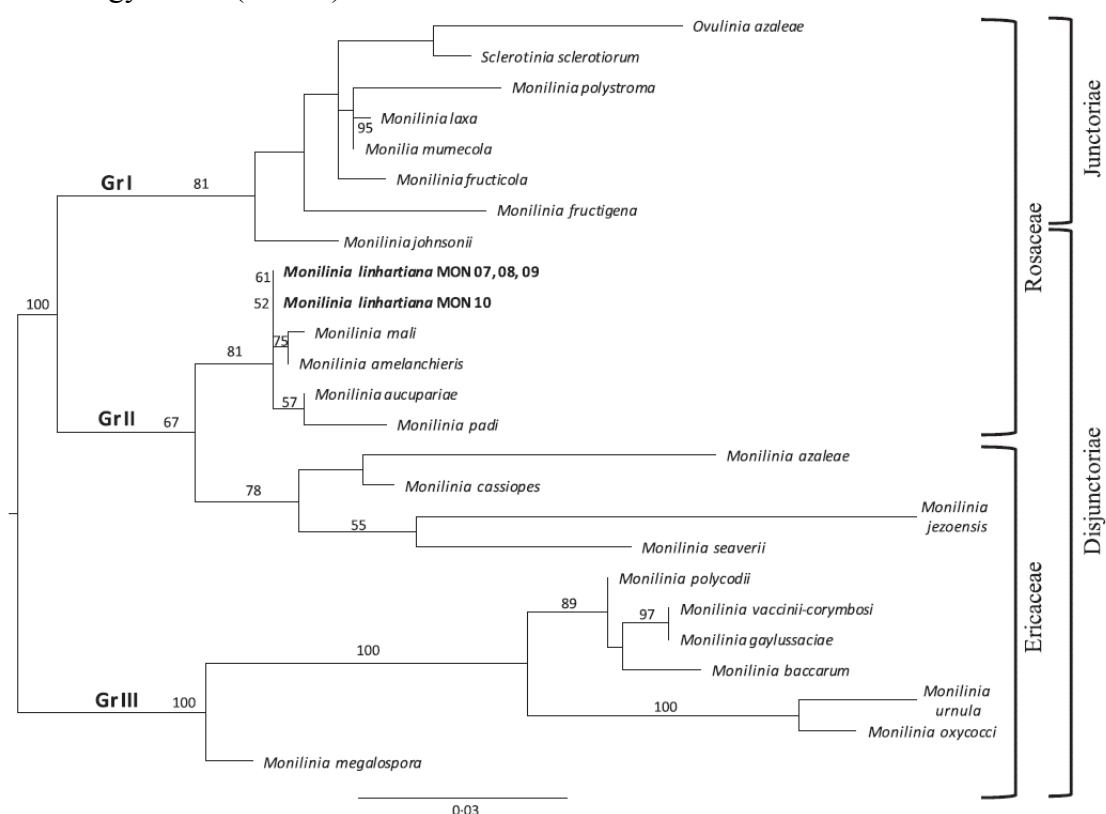
A *M. linhartiana* fertőzése esetén a birslevelek felületén a főbb erek mentén jelenik meg a konídiumláncok tömege szürkésfehér bevonat formájában, amely később akár az egész levéllemezt bevonhatja (Wormald 1926). Moral és mtsai. (2011) a fertőzött birshajtásokon is megfigyelték konídiumok képződését. Batra (1991) szerint sem a hajtáson sem a fiatal gyümölcsökön nem képződnek konídiumok.

2.2. A *Monilinia* nemzetség jellemzése

2.2.1. A nemzetség rendszertana

Honey 1928-ban különítette el a *Monilinia* nemzetséget, amely az aszkuszos gombák törzsébe (*Ascomycota*), az apotéciumos gombák (*Lectiomycetes*) osztályába, a *Sclerotiniaceae* családba tartozik. Batra (1991) monográfiájában a nemzetség 30 fajt említi, de vizsgálatai óta számos új faj került leírásra. Jelenleg a Mycobank adatbázisa 39 *Monilinia* fajt tart számon (Crous és mtsai. 2004).

A nemzetség két nagy csoportra osztható (3. ábra), amelyeket a konídiumláncok szerkezete alapján különített el Honey (1936). A *Juntoriae* csoportra jellemző, hogy a konídiumláncok konídiumai közvetlenül érintik egymást. A *Disjuntoriae* csoport konídiumláncai diszjunktórokat tartalmaznak, azaz a makrokonídiumok apró módosult, csírázásra képtelen konídiumokkal kapcsolódnak egymáshoz. Egyéb különbségek is megfigyelhetők a két csoportba tartozó fajok morfológiájában, gazdanövénykörében, valamint életciklusában. A csoportok az ITS régió (Internal Transcribed Spacer region, köztes átíródó elválasztó régió) szekvenciája alapján is elkülönülnek egymástól (3. ábra).



3. ábra: *Monilinia* és *Monilia* fajok filogenetikai törzsfája az 5,8SrDNA-ITS régió nukleotid sorrendje alapján. Maximum likelihood elemzés alapján, a GTR+G modell felhasználásával, *Monilinia megalospora* gyökérrel készült. Az elágazások fölötti számok a *Monilinia laxa* faj bootstrap értékeit jelölik (az 50%-nál nagyobbak kerültek feltüntetésre).

A *Junctoriae* csoport tagjai közé tartoznak a világszerte elterjedt, igen súlyos károkat okozó fajok. Polifág kórokozók, a *Rosaceae* család számos fajt képesek megbetegíteni (Aderhold és Ruhland 1905, Faes és Staehelin 1924). Általában a gazdanövények virágait is megfertőzik, majd továbbterjednek a hajtásokba, a termésérés időszakában pedig az érető, érett gyümölcsöket fertőzik meg. Életciklusukra jellemző, hogy évente több fertőzési ciklus jön létre. Tavasszal az aszkospórák indítják a fertőzést, majd a vegetációban további fertőzési ciklusok alakulnak ki a konídiumok szóródásának következtében. Néhány fajnál (*M. laxa*, *M. fructigena*) az aszkospórás fertőzés alárendelt szerepű, így tavasszal a konídiumok indítják a fertőzést, de ebben az esetben is számos fertőzési ciklus figyelhető meg (Batra 1991).

A *Disjunctoriae* csoportba kisebb jelentőségű fajok tartoznak, melyek nem képesek járványok kialakítására. Gazdanövénykörüket tekintve monofágok vagy oligofágok. A *Rosaceae* vagy az *Ericaceae* család tagjai közül csak egy fajt, vagy egy nemzetség néhány tagját képesek megfertőzni. Életmódjuk is eltérő, mert a *Disjunctoriae* csoportba tartozó fajoknál csak két fertőzési ciklus figyelhető meg. Tavasszal az aszkospórák a leveleket fertőzik, majd a leveleken képződő konídiumok fertőzik a megtermékenyített terméskezdeményeket. A fiatal terméseken egyes fajoknál képződnek konídiumok (*Monilinia padi* (Woronin) Honey, *Monilinia azaleae* Honey), de ezek szerepe a gomba biológiájában nem bizonyított, mert a gazdanövény ebben az időszakban már nem fogékony a betegségre (Batra 1991).

2.2.2. Hazánkban jelenlévő fajok

A következő fajok hazánk ültetvényeiben is jelen vannak:

- *Junctoriae* csoport:
 - *Monilinia laxa* (Aderh. és Ruhland) Honey
 - *Monilinia fructigena* (Aderh. és Ruhland) Honey in Whetzel
 - *Monilinia fructicola* (Winter) Honey
 - *Monilinia polystroma* (Leeuwen) Kohn
- *Disjunctoriae* csoport:
 - *Monilinia linhartiana* (Prill. és Delacr.) Dennis

A *Monilinia laxa* és *M. fructigena* fajok őshonosak Európában. A *M. laxa* járványos fertőzésére régóta számíthatunk a tavaszi időszakban (Heald 1933), az utóbbi évtizedben fokozódó gyakorisággal idézett elő járványokat (Szódi és mtsai. 2008, Kállay és Szenci 2009). Régebben elsősorban a meggyültetvényekben okozott súlyos fertőzést, míg a 2000-es évek elején Rozsnyay és Vajna (2001) szerint agresszívabb törzsek, patotípusok jelenhettek meg, amelyek a meggy

mellett kajszin, őszibarackon, cseresznyén, mandulán és egyes szilva fajtákon is súlyos virágelhalást okoztak (Némethy 2013).

A *M. fructicola* Amerikában, Ázsiában, Ausztráliában és Új-Zélandon már a 20. század elején elterjedt volt (Roberts és Dunegan 1932, Wormald 1954). A nemzetség legjelentősebb faja (Byrde és Willets 1977), melynek európai elterjedését van Leeuwen és mtsai. (2001) gazdaságilag pusztítónak nevezik. Európában karantén kórokozóként tartották számon (EPPO/CABI 1997). Magyarországon először Petróczy és Palkovics (2005, 2006) olasz import őszibarackokról azonosították, majd 2006-ban már hazai ültetvényekből is kimutatták jelenlétét, összesen hat megyéből (Kiss 2007). A kórokozó hazai terjedéséről kevés adat áll rendelkezésre, viszont az Európai Unió tagállamainak karantén szervezeteit tartalmazó keretirányelv (2000/29/EK) 2014. október 1-től hatályos módosítása értelmében a *M. fructicola* kórokozót törölték a karantén szervezetek listájáról, mert az EU területén széles körben elterjedt (Plant 2014). Habár az EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization, Európai és Mediterrán Növényvédelmi Szervezet) A2-es listájának legutóbbi (2015. szeptemberi) frissítésén még megtalálható, mint az EPPO területén elszórtan jelenlevő, karantén kórokozóként kezelendő faj (EPPO Reporting Service 2016).

A *M. polystroma* dél és kelet ázsiai származású faj, van Leeuwen és mtsai. (2002) morfológiai és molekuláris módszerekkel különítették el a *M. fructigena* fajtól. Európában először a kórokozót 2009-ben ‘Ashton Bitter’ boralma hajtásain és kötődött termésein figyelték meg, Újfehértón (Petróczy és Palkovics 2009). Az elmúlt években Európa számos országában kimutatták jelenlétét, almatermésűeken és csonthéjasokon egyaránt: Spanyolország (De Cal és mtsai. 2009), Svájc (Hilber-Bodmer és mtsai. 2010), Csehország (EPPO Reporting Service 2011), Lengyelország (Poniatowska és mtsai. 2013), Szerbia (Vasic és mtsai. 2013), Olaszország (Martini és mtsai. 2014a), de hazai fellépéséről új adatok nem jelentek meg.

A *M. linhartiana* eurázsiai elterjedésű, hazánkban őshonos kórokozó. A betegség tüneteit az 1930-as években figyelték meg először Magyarországon (Glits 2000), viszont a kórokozó az utóbbi évtizedekben ritkábban jelent meg. A birs termőterületének növekedésével a kórokozó ismételten elterjedt a hazai ültetvényekben, amely akár súlyos kártétel kialakulásával fenyegethet, hiszen a mediterrán régióban esetenként 90–95%-os termésvesztésről is beszámolnak (Altinyay 1975, Garic és mtsai. 1990, Moral és mtsai. 2008, Nevado és mtsai. 2011).

2.2.3. A hazai fajok biológiája

A *Monilinia* fajok gyümölcsmúmiákban sztrómatikus képletek formájában vagy a rákos sebekben micéliummal telnek át (Holb 2008). A hazánkban jelen lévő fajok ivartalan úton fejlődnek tovább, azaz tavasszal konídiumok képződnek a gyümölcsmúmiákon és a rákos sebek felületén, ezek indítják a fertőzést. Az ősszel képződött konídiumok is képesek átvészelni a telet (Bertram 1916), akár 8–10 órán keresztül is elviselik a -20 °C-os hőmérsékletet (Károva 1974). Ivaros szaporodás esetén nyeles apotéciumok képződhetnek a gyümölcsmúmiák felületén (Byrde és Willetts 1977), azonban ezt egyik fajnál sem figyelték meg hazánkban (Glits 2000, Holb 2003). A konídiumok vagy az apotéciumokban képződő aszkospórák a virágrészekre kerülve csíráznak. A virágrészek kolonizálása után a kórokozó micéliuma a kocsányon keresztül a hajtásba nő (Holb 2008).

A *M. laxa* apotéciumai Európában ritkán jelennek meg (Aderhold és Ruhland 1905), spanyol kísérletek során mesterségesen sem sikerült indukálni képződésüket (De Cal és mtsai. 2014). A *M. fructigena* apotéciumainak természetes képződését Európa egyes területein (Aderhold és Ruhland 1905, Fawcett és Spencer 1966) és Japánban (Batra és Harada 1986) is megfigyelték. A *M. fructicola* életciklusában az ivaros alaknak számottevő jelentősége van (OEPP/EPPO 2009). Amerikában gyakran megjelenik és Japánban is megfigyelték már a termőtesteket (Willems és Harada 1984, Holtz és mtsai. 1998). Papavasileiou és mtsai. (2015b) *M. laxa* és *M. fructicola* populációk genetikai diverzitásából arra következtettek, hogy Görögországban egyik faj sem szaporodik ivaros úton. A *M. fructicola* aszkospóráit sem mutatták ki 2011-ig európai őszibarack ültetvényekben (EFSA 2011). Willems és Harada (1984) és Batra és Harada (1986) feltehetően a *M. polystroma* apotéciumait figyelték meg Japánban, habár a szerzők a fajra még *M. fructigena*-ként hivatkoznak (CABI 2016). A *M. linhartiana* apotéciumai Moral és mtsai. (2011) adatai alapján Spanyolországban rendszeresen megjelennek. Véleményük szerint a nagy számban képződő apotéciumok (ültetvényekben: 5,3-28,7 db/m²) arra utalnak, hogy a kórokozónak feltétlenül szüksége van az ivaros fázisra életciklusa befejezéséhez.

A gyümölcsöket a konídiumok fertőzik meg. A termés cukortartalmának növekedésével általában növekszik az esélye a gyümölcsök megbetegedésének (Moore 1950), kivéve a *M. linhartiana* esetében, mely kizárólag a fiatal, kötődött terméseket képes megfertőzni (Moral és mtsai. 2011). A hazánkban őshonos fajok közül a *M. laxa* és *M. fructigena* sebszaporítók, vagyis az ép epidermiszen keresztül nem képesek megfertőzni a gyümölcsöt. Ezzel szemben a *M. fructicola* fajnak nincs szüksége sebzésre, sérülés nélkül is képes a gyümölcsbe hatolni (Michailides és Morgan 1997).

2.2.4. *Monilinia* fajok dominanciája csonthéjas ültetvényekben

Az egyes *Monilinia* fajok jelenléte az ültetvényben, valamint azok gyakorisága a kultúra növényvédelmét jelentősen befolyásoló, fontos tényező. Batra (1991) szerint a *M. fructigena* elsősorban almatermésűeken, míg a *M. laxa* és a *M. fructicola* inkább csonthéjasokon károsít. Európában a két őshonos faj közül a *M. laxa* volt az elterjedtebb (Papavasileiou és mtsai. 2015b), a *M. fructigena* a fertőzések 10–20%-át okozza csonthéjasokon (Larena és mtsai. 2005, Volkova és mtsai. 2013, Szódi 2015).

A *M. fructicola* és *M. polystroma* megjelenése után a fajok gyakoriságának aránya folyamatosan változik. A mediterrán országok gyümölcstermő régióiban végzett felmérések során a *M. fructicola* területi elterjedését és jelentőségének növekedését figyelték meg (2. táblázat). A mediterrán régióban a *M. fructicola* kiszorította a *M. fructigena* fajt - amely gyakorlatilag eltűnt az ültetvényekből - és jelenleg a *M. laxa* fajjal egyenlő arányban van jelen az gyümölcsösökben (Villarino és mtsai. 2013, Papavasileiou és mtsai. 2015a). De Cal és mtsai. (2014) megfigyelései szerint Spanyolországban a *M. fructicola* már a *M. laxa* fajt is háttérbe szorította.

2. táblázat: *Monilinia* fajok gyakorisága csonthéjas terméseken Európa egyes országaiban

Terület	Felmérés időpontja (év)	Minta-szám (db)	Fajok gyakorisága (%)				Hivatkozás
			LX	FG	FC	PS	
Franciaország, Olaszország, Spanyolország	2001–2002	nincs adat	85–90	10–15	0	0	Larena és mtsai. (2005)
Spanyolország	2006–2011	1223	50,0	0,7	49,3	0	Villarino és mtsai. (2013)
Lengyelország	2010–2011	610	34,8	61,8	0,8	2,6	Poniatowska és mtsai. (2013)
Olaszország	2012–2013	104	35	6	53	5	Martini és mtsai. (2014a)
Görögország	2012	950	45,2	0	54,8	0	Papavasileiou és mtsai. (2015b)

LX: *Monilinia laxa*, FG: *M. fructigena*, FC: *M. fructicola*, PS: *M. polystroma*

Elképzeltető, hogy idővel egyensúly áll be a *M. laxa* és *M. fructicola* gyakoriságában (Villarino és mtsai. 2013). Michigan (USA) területein például a két kórokozó továbbra is együttesen van jelen, az eltérő (korai és késői szezon) niche-nek köszönhetően (Boehm és mtsai. 2001). Ugyanakkor a legtöbb irodalom inkább azt valószínűsíti, hogy idővel a *M. laxa* kiszorul majd (Michailides és mtsai. 1987, Jänsch és mtsai. 2012, Villarino és mtsai. 2013, Papavasileiou és mtsai. 2015a), ahogy ez a kaliforniai őszibaracktermő vidéken is történt a 20. század második felében (Hewitt és Leach 1939, Zehr 1982, Ogawa és mtsai. 1984). Ezt a nagyobb reprodukciós

kapacitással, a nagyobb terjedési képességgel és fungicidekhez való jó adaptációs képességgel indokolják (Byrde és Willetts 1977, Free és mtsai. 1996, Holtz és mtsai. 1998). Ennek ellenére Villaino és mtsai. (2013) Spanyolországban végzett vizsgálatait során olyan ültetvényt is megfigyeltek, ahol a *M. fructicola* elterjedését követően a *M. laxa* ismét uralkodó fajjá tudott válni.

A *M. polystroma* elterjedtségéről kevés adat áll rendelkezésünkre. Olaszországi vizsgálatok alapján a *M. polystroma* a csonthéjas ültetvényekben a fertőzések 5%-áért felelős, míg almatermésűekben jelenleg ez a leggyakoribb faj (52%) (Martini és mtsai. 2014a). Poniatowska és mtsai. (2015) lengyelországi csonthéjas és almatermésű ültetvényekben 601 *Monilinia* izolátum közül 32 db-ot (0,5%) azonosítottak *M. polystroma* fajként.

Hazai felmérések az utóbbi években nem történtek, viszont a korábbi vizsgálatokban még az újonnan megjelent fajok nem szerepelnek. 2002 és 2006 között Szódi (2015) 60 mintát gyűjtött csonthéjas gazdanövényekről, a termésről származó izolátumok 61%-a *M. laxa*, 39%-a *M. fructigena* volt, hajtásokról kizárólag a *M. laxa* fajt azonosította. Fazekas (2014) munkájában (2009-2012 közötti mintagyűjtés) 91 izolátum származik csonthéjas termésekről, melyek 70%-át *M. laxa*-ként és 30%-át *M. fructigena*-ként határozta meg.

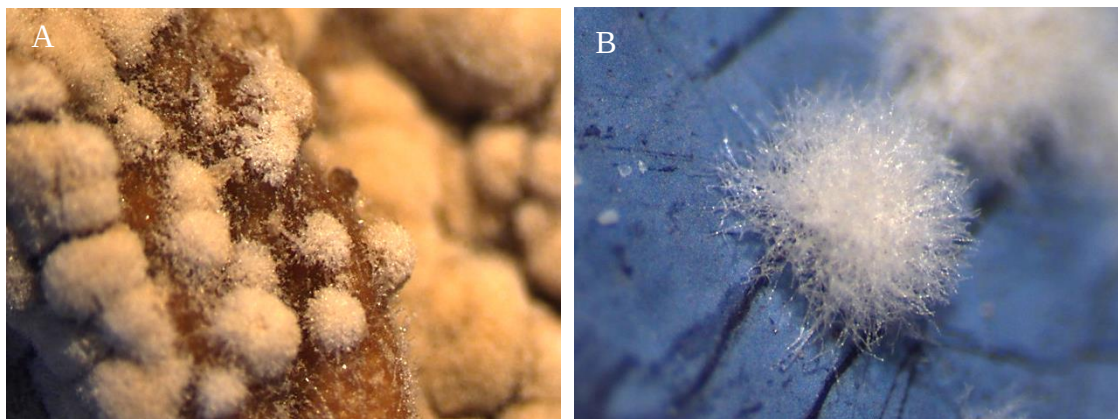
2.3. *Monilinia* fajok azonosítása

2.3.1. *Monilinia* fajok azonosítását segítő morfológiai és tenyészbélyegek

Wormald (1954) szerint a *Monilinia* fajok exogén sztrómáinak mérete és színe fajra jellemző bélyeg. A *M. laxa* és *M. fructicola* sztrómái aprók, magasságuk 1 mm körüli, átmérőjük 0,5–0,75 mm, a növényi szöveteken elszórtan jelennek meg (Mordue 1979a, 1979c, Holb 2003). A *M. fructigena* sztrómái 1–2 mm átmérőjűek, 2–3 mm magasak, gyakran koncentrikus körökben jelennek meg (Wormald 1930, Elliott 1974, Batra 1979, Mordue 1979b). A *M. polystroma* esetében ezek a szaporítóképletek 1–2 mm átmérőjűek (CABI 2016). Batra (1991) monográfiájában leírást közöl a *M. linhartiana* kórokozó exogén sztrómáiról, viszont más források nem említik ezt a képletet. A Wormald (1926), Csorba és Berend (1965), Glits (1978), Alexasrescu és Morea (1964), Moral és mtsai. (2008, 2011), valamint Nevado és mtsai. (2011) szerint a levelek felületén konídiumláncokból álló bevonat alakul ki.

Monilinia fajok kétféle konídiumot képeznek. A makrokonídiumok elágazó láncokban képződnek, holoblasztikus módon (Willetts és Calonge 1969), átlagosan 7 sejtmagot tartalmaznak (Batra 1991). A *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola* és *M. polystroma* fajoknál a sztrómákon képződnek a kórokozó konídiumláncai (4. ábra), melyekben a konídiumok közvetlenül kapcsolódnak egy máshoz. A *M. linhartiana* faj konídiumláncáiban kis módosult konídiumok, diszjunktórok (Woronin 1888) kötik össze a makrokonídiumokat. A makrokonídiumok

hosszúkásak, gömbölyded vagy citrom alakúak, nagy tömegben az adott fajra jellemző színűek (Byrde és Willetts 1977), csíratömlőjük hosszúsága szintén faji bélyeg (van Leeuwen és van Kesteren 1998). A mikrokonídiumoknak csírázásra képtelenek, így a kórokozó terjedésében nincs szerepük, inkább tápanyag raktározásra szolgálnak (Byrde és Willetts 1977).



4. ábra: *Monilinia fructigena* exogén sztrómái kajszi gyümölcsön (A) és *M. laxa* exogén sztrómáján képződő konídiumláncok szilva gyümölcsön (B) (fotók: Lantos 2014)

A burgonya-dextróz agar táptalaj alkalmas a *Monilinia* fajok tenyésztésére (Wormald 1954). A táptalajon fejlődő telepek morfológiája (növekedési erély, a telepek mintázottsága, színe, tagoltsága, légmicélium vagy sporuláció megjelenése) alapján általában elkülöníthetőek a fajok. Nem minden esetben lehetséges azonban meghatározni az izolátumot egyértelműen a tenyészbélyegek alapján (van Leeuwen és van Kesteren 1998, De Cal és Melgarejo 1999), ezért az azonosítást molekuláris vizsgálatokkal szükséges alátámasztani (OEPP/EPPO 2009).

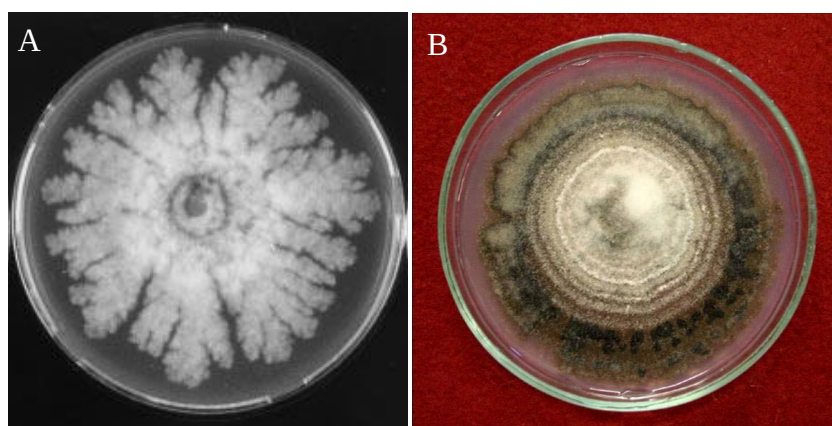
A *Monilinia laxa* koncentrikus zónákban növekszik a táptalajon, majd amikor eléri a 2–3 cm-es átmérőt elindul a legyezőszerű karéjok növekedése (Wormald 1954). A kórokozó tenyészetek világos, szürke, barna vagy mogyorószínű, széle sötétbarnán vagy feketén rozettált (Byrde és Willetts 1977). Batra (1991) leírása alapján szélük csipkés, szabálytalan alakú. Sporuláció csak ritkán jelenik meg (Byrde és Willetts 1977). A *M. laxa* tenyészetének növekedési sebessége 2–11 mm/nap (OEPP/EPPO 2009).

A *Monilinia fructigena* tenyészetek fehérek, krémsárga vagy sárgásbarna színűek, ép szélűek és ritkán sporulálnak (Byrde és Willetts 1977, Holb 2003). Légmicéliumok a fiatal tenyészeteken gyéren képződnek, majd később koncentrikus körökbe rendeződnek (Chalkley 2016). A kórokozó tenyészetének növekedése 1–12 mm/nap (OEPP/EPPO 2009).

A *Monilinia fructicola* tenyészetek Byrde és Willetts (1977) megfigyelése alapján körkörösén fejlődik, mogyoróbarna színű, széle ép. A tenyészetekben koncentrikus körökben és

nagy mennyiségben jelennek meg konídiumok (Batra 1991). A telepek átlagos növekedése 9–20 mm naponta (OEPP/EPPO 2009).

A Japánból származó *M. polystroma* tenyészetek sugaras szerkezetűek PDA táptalajon, világossárga színűek. Felületükön kismértékű sporulációt figyeltek meg. Az Újfehértón izolált *M. polystroma* izolátum tenyésze PDA táptalajon sárgás színű, viszonylag homogén, széle enyhén hullámos. A leoltási pont körül közepénél koncentrikus mintázottságot mutató, sűrű légmicélium bevonat képződött, majd a tenyészet széle felé haladva a légmicélium mennyisége csökkent. Mindkét esetben sztromatikus képletek jelentek meg 10–12 nappal a leoltást követően, amelyek koncentrikus ívekben helyezkedtek el (5. ábra) (van Leeuwen és mtsai. 2002, Petróczy és Palkovics 2009).



5. ábra: *Monilinia polystroma* tenészbélyegei: 1994-ben izolált japán (A) és 2006-ben izolált magyar tenyészet (B) (fotók: van Leeuwen és mtsai. 2002, Petróczy 2006)

A *M. linhartiana* tenysze PDA táptalajon fehér vagy szürkés alapszínű, a leoltási pont körül szürke (Moral és mtsai. 2011). A tenyészetek széle ép, felszínükön kevés légmicélium képződik. A telepekben mikrokonídiumok fejlődtek Berkhout (1923) és Moral és mtsai. (2011) megfigyelései során.

2.3.2. A molekuláris azonosítás módszerei

Számos módszert dolgoztak ki a *Monilinia* fajok azonosítására, legnagyobb részük polimeráz láncreakció (PCR, Polymerase Chain Reaction) alapú eljárás, de léteznek megbízható RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, véletlen amplifikált mikroszatellitek) módszerek is a meghatározásra (Pizzuolo és mtsai. 2006). A szekvenciaalapon történő azonosításra a leggyakrabban az ITS régiót használják az aszkuszos gombáknál (Capote és mtsai. 2012). Moral és mtsai. (2011) is ezt a régiót használták fel a *M. linhartiana* faj molekuláris azonosítására.

Ma és mtsai. (2003) és Luo és mtsai. (2007b) mikroszatellit primereket terveztek a *M. fructicola* fajra, majd azt felhasználva nested PCR és Real-Time PCR (valós idejű PCR) módszert dolgoztak ki a kórokozó diagnosztizálására. Gell és mtsai. (2007) SCAR-markerek (Sequence-Characterized Amplified Region, feltárt szekvenciájú amplifikált régió) alapján terveztek primereket és használtak fel PCR módszerrel történő azonosításra.

Ioos és Frey (2000) fajspecifikus primereket terveztek a *M. laxa*, *M. fructicola* és a *M. fructigena* kórokozókra. A primerek egy kb. 350 bázispár hosszúságú fragmentumot emelnek ki az ITS1, ITS2-régióból és a köztük található 5,8S riboszomális génből. Fulton és Brown (1997) a 18S riboszomális gén intronját használták fel a *M. fructicola* azonosítására, viszont további vizsgálatok során kiderült, hogy az intron nincs jelen a faj összes egyedében (Fulton és mtsai. 1999, Förster és Adaskaveg 2000, Côté és mtsai. 2004). Côté és mtsai. (2004) multiplex PCR módszer segítségével azonosítottak *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola* és *M. polystroma* fajokat, egy ismeretlen funkciójú genomi régió segítségével.

2.4. *Monilinia* fajok genetikai diverzitása

A gomba populációk genetikai vizsgálata fontos a kórokozók evolúciójának megértéséhez, valamint segít hatékonyabb védekezési stratégiák kidolgozásában (McDonald 1997, Förster és Adaskaveg 2000). *Monilinia* fajoknál a genetikai diverzitás vizsgálatok legelterjedtebb módja a szekvencia alapú analízis (Papavasileiou és mtsai. 2015b), de emellett számos molekuláris marker alapú vizsgálatot is végeztek:

- Szekvencia alapú analízist Kanadában, Norvégiában, Egyesült Királyság területén, Franciaországban, Hollandiában, Kínában, Litvániában, ill. Lengyelországban (Carbone és Kohn 1993, Holst-Jensen és mtsai. 1997, Fulton és mtsai. 1999, Ioos és Frey 2000, van Leeuwen és mtsai. 2002, Hu és mtsai. 2011, Volkova és mtsai. 2013, Poniowska és mtsai. 2015),
- MP-PCR-t (Microsatellite-primed PCR, PCR mikroszatellit primerrel) Magyarországon (Szódi és mtsai. 2012),
- RAPD analízist az USA-ban, Spanyolországban, Magyarországon és Lengyelországban (Förster és Adaskaveg 2000, Gell és mtsai. 2007, Villarino és mtsai. 2012, Fazekas 2014, Poniowska és mtsai. 2015),
- AFLP-t (Amplified Fragment Length Polymorphism, amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus) Szlovéniában (Gril és mtsai. 2008, 2010),

- ISSR módszert (Inter Simple-Sequence Repeat, egyszerű belső szekvencia ismétlődés) Kínában, Magyarországon, Lengyelországban és Görögországban (Fan és mtsai. 2010, Fazekas 2014, Papavasileiou és mtsai. 2015b, Poniatowska és mtsai. 2015),
- SSR módszert (Simple-Sequence Repeat, egyszerű szekvencia ismétlődés) Svájcban és Spanyolországban (Jänsch és mtsai. 2012, Villarino és mtsai. 2012).

Európában az őshonos *Monilinia laxa* populációk nagyobb genetikai változékonyságot mutatnak az újonnan bekerült *M. fructicola* és *M. polystroma* populációinál, mert a kórokozó számára több idő állt rendelkezésre fajon belüli különbségek kialakulására (McDonald és Linde 2002, Poniatowska és mtsai. 2015). Ezzel szemben az USA területén a *M. fructicola* izolátumok mutatnak nagyobb variabilitást, amelyet Förster és Adaskaveg (2000) a gomba ivaros szaporodásának jelenlétével magyaráz.

Spanyol termesztő körzetekben a *M. laxa* faj genetikai diverzitásának túlnyomó része (97%-a) különböző ültetvények populációi között alakul ki, az ültetvényen belüli populációk egységesek (Gell és mtsai. 2007). Hazánkban a *M. laxa* populációk ültetvények közötti genetikai diverzitása ennél nagyobb (99%), míg az egy ültetvényből származó egyedek közötti genetikai különbség mindösszesen 1% (Fazekas 2014). A genetikai diverzitást mindkét vizsgálat során a Nei index alapján számították (Nei 1987). Sződi és mtsai. (2012) eredményei alapján a magyarországi *M. fructigena* szubpopulációk változékonnyabbak, mint a *M. laxa* szubpopulációk.

Spanyolországban a *M. fructicola* kórokozó első leírását követő analízis során kismértékű variabilitást mutattak ki (Villarino és mtsai. 2012), amelyből arra következtetnek, hogy a kórokozó újonnan került az országba, majd néhány évvel később növekvő genetikai változékonyságot figyeltek meg a szubpopulációk között (De Cal és mtsai. 2014).

Papavasileiou és mtsai. (2015b) csonthéjas ültetvényekben végzett vizsgálatai alapján Görögországban a *M. fructicola* populációi változékonnyabbak a *M. laxa* populációknál, viszont a diverzitás mértéke egyik fajnál sem utal a szexuális rekombinációra. Jänsch és mtsai. (2012) svájci *M. fructicola* populációkban nagy változékonyságot mutattak ki. Vizsgálataik alapján Jänsch és mtsai. (2012) és Papavasileiou és mtsai. (2015b) is arra a következtetésre jutottak, hogy az általuk vizsgált régióban a *M. fructicola* faj jóval régebb óta lehet jelen, mint ahogy az első leírások megszülettek, így nyílt lehetőség diverz populációk kialakulására.

A legtöbb vizsgálat sem gazdanövény szerinti, sem földrajzi elterjedésbeli, sem évjáratbeli specializációt nem mutatott ki a *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola* és *M. polystroma* izolátumoknál (Förster és Adaskaveg 2000, Gell és mtsai. 2007, Sződi és mtsai. 2012, Fazekas 2014, Papavasileiou és mtsai. 2015b, Poniatowska és mtsai. 2015). Ugyanekkor Gril és mtsai.

(2008) almatermésekről izolált *M. laxa* egyedek gazdanövény specializációját mutatták ki, míg Papavasileiou és mtsai. (2015b) a *M. fructicola* esetében figyeltek meg hasonlót. Fulton és mtsai. (1999), valamint Villnario és mtsai. (2012) bizonyos fokú hasonlóságot találtak a földrajzi elterjedés alapján a különböző földrészekről származó izolátumok vizsgálatakor. A virágokról és gyümölcsökről származó populációk között nem volt kimutatható különbség a *M. laxa* és a *M. fructicola* szubpopulációk esetében sem (Papavasileiou és mtsai. 2015b).

Delmotte és mtsai. (1999) szerint a különböző gazdanövényeken megjelenő populációk közötti génáramlás okozta a *M. laxa* populációk homogenizálódását. Papavasileiou (2015b) a génáramlás hatékonyságát azzal magyarázza, hogy a különböző gazdanövényeket ugyanazon régióban szomszédos ültetvényekben termesztik, így az egyes törzsek könnyen átkerülnek más gazdanövényre. Jänsch és mtsai. (2012) Svájcban - a paraszexuális rekombináció, a véletlen mutációk továbböröklődése és a génáramlás mellett - a *M. fructicola* ivaros szaporodását is valószínűsítik a genetikai különbségek okaként. Egyes irodalmak a heterokariózist (két vagy több genetikailag eltérő sejtmag jelenlétét egyetlen sejtben) is megemlítik, mint a *Monilinia* fajok változékonyságát kialakító tényezőt (Hall 1963, Hoffman 1974).

2.4.1. Az ITS régió szekvenciája alapján

Az aszkuszos gombáknál leggyakrabban az ITS régiót használják filogenetikai és evolúciós kapcsolatok feltérképezésére (Christen 1994, Sogin 1994, Capote és mtsai. 2012). A régió három riboszomális génből (18S, 5,8S és 28S rDNS) és a köztük található két nem kódoló régióból (ITS1, ITS2) áll, habár gyakran csak az ITS1- 5,8S rDNS- ITS2 szakaszra hivatkoznak ITS régióként. Ez a fragmentum az élőlények genomjában több helyen is megtalálható, viszont ezek egy egyeden belül homológok vagy nagyon kis változékonyságot mutatnak (Belbahri és mtsai. 2008).

A *Sclerotinia* család ITS1 régiójának vizsgálatakor Carbone és Kohn (1993) kismértékű interspecifikus változékonyságot figyelt meg. Az általuk vizsgált 4 *Monilinia* faj nem alkot egy különálló klasztert a törzsfán, mert más nemzetségek (*Ciborinia*, *Botryotinia*) igen közeli rokonságban állnak a nemzetséggel. Az ITS régió genetikai diverzitása alapján a nemzetség polifiletikus, azaz nem vezethető vissza egy közös ősrre (Holst-Jensen és mtsai. 1997), viszont a *Juntoriae* és a *Disjuntoriae* csoport elkülöníthető egymástól (Carbone és Kohn 1993). A *Disjuntoriae* csoport további 4 alcsoportra osztható. Ezeket Holst-Jensen és mtsai. (2007) evolúciós vonalaknak nevezik, mert a fajok és gazdanövényeik rokonsági viszonyai között kospecifikáció figyelhető meg, azaz párhuzamosan alakultak ki: a *Rosaceae* család almatermésű fajait fertőző csoport, az *Ericaceae* család toktermésű fajait és az *Ericaceae* család bogyótermésű

fajait fertőző csoport. A galagonyáról származó *Monilinia johnsonii* (Ellis & Everh.) Honey külön alkotja a negyedik alcsoportot. Moral és mtsai. (2011) későbbi tanulmánya szerint azonban ez utóbbi izolátumot tévesen azonosították, így a csoport megszüntetését javasolták.

A fajon belüli változékonyság is igen alacsony mind a *Junctoriae* mind a *Disjunctoriae* csoport fajait figyelembe véve (Holst-Jensen és mtsai. 1997, Ioos és Frey 2000, Fulton és mtsai. 1999, Volkova és mtsai. 2013, Poniatowska és mtsai. 2015). Holst-Jensen és mtsai (1997) által elemzett 17 *Monilinia* faj ITS régiójának vizsgálata során az interspecifikus változékonyság nem érte el a 2%-ot. Más gomba fajokkal összehasonlítva ez igen alacsony. Bazídiumos gombák esetében 5–12%-os változékonyságot is megfigyeltek (Baura és mtsai. 1992, Zambino és Szabo 1993). Az utóbbi években számos *Monilinia* faj ITS1-5,8S-ITS2 régióját meghatározták (Holst-Jensen és mtsai. 1997, Fulton és mtsai. 1999, Ioos és Frey 2000), viszont a régió alapján a fajok egyértelmű azonosítása nem minden esetben lehetséges. A *Monilinia gaylussaciae* Batra és a *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Reade) Honey ITS régiója megegyezik (Holst-Jensen és mtsai. 1997). A *M. linhartiana* és a *Monilinia amelanchieris* (Reade) Honey ITS régiója csupán egyetlen bázisban különbözik (Moral és mtsai. 2011), valamint a *M. polystroma* és a *Monilia yunnanensis* Hu & Luo fajok is csak 5 (van Leeuwen és mtsai. 2002), ill. 11 bázisban (Hu és mtsai. 2011) térnek el a *M. fructigena* fajtól az ITS szekvenciája alapján.

A nem kódoló ITS1 és ITS2 régiók nagyobb változatossággal rendelkeznek, mint a szomszédos riboszomális RNS gének (Carbon és Kohn 1993, Windsor és mtsai. 2006). A *M. linhartiana* faj vizsgálatakor Moral és mtsai. (2011) az ITS1 régióban nagyobb intraspecifikus változékonyságot (2,05%) mutattak ki, mint az ITS2-ben (1,40%). A *M. fructicola* izolátumok 18S rDNS génje egy 418 bp hosszúságú intront tartalmaz, míg a *M. laxa* és *M. fructigena* izolátumokban ez nem található meg (Fulton és Brown 1997). Később több szerző is igazolta, hogy egyes *M. fructicola* izolátumokból is hiányzik ez az intron (Fulton és mtsai. 1999, Förster és Adaskaveg 2000, Côté és mtsai. 2004).

2.5. A monilíniás betegség elleni védekezés lehetőségei

2.5.1. Agrotechnikai és mechanikai védekezés

A betegség tavasszal először a mélyfekvésű, ködös területeken jelenik meg, így a telepítés során érdemes kerülni ezeket a helyeket, főleg a virágfertőzésre érzékeny fajok, fajták esetén. Az ültetvény kialakítása során fontos a szellős koronaforma kialakítása, valamint a fák optimális kondíciójának biztosítása (Tóth 2007). Szellős ültetvényekben a lombkorona könnyebben átpermetezhető, valamint a fertőzésnek kedvező nedvesség is hamarabb felszárad.

Már egy évszázaddal ezelőtt is felismerték, hogy a védekezés fontos eleme a fertőzési források megsemmisítése (Kern 1912). Az elhalt vesszőket, rákos ágrészeket, valamint a fákon maradt gyümölcsmúmiákat a metszés során el kell távolítani, az ültetvény talajába forgatni vagy megsemmisíteni (Rudolph 1936, Holb 2005).

A termésfertőződés ellen közvetett módon, a sebzések kialakulásának megelőzésével védekezhetünk (Fogle és Faust 1975, 1976): jégvédő hálók alkalmazásával, egyenletes vízutánpótlás biztosításával, kártevők ellen inszekticides kezelésekkel és gyors szürettel (Glits 2000). A szüretet követően érdemes a gyümölcsöket átválogatni, mert szállítás és tárolás során további fertőzések alakulhatnak ki (Brooks és mtsai. 1936, Holb 2005).

2.5.2. Kémiai növényvédelem

A télvégi lemosó permetezéssel, réz tartalmú készítményekkel csökkenthető a fás részeken jelen lévő fertőzési forrás mennyisége (Kern 1912) az összes csonthéjas faj esetén (Wicks 1981). A réz hatóanyagra érzékeny fajoknál (őszibarack, kajszli) feltétlenül rügypattanás előtt végezzük el a kezelést (Mező és Schweigert 2005). A kevésbé érzékeny fajok esetén rügypattanás után még egy rezes kezelés javasolt, de nem feltétlenül szükséges (Gólya 2002).

A meggy, kajszli és birs növényvédelmének fontos részei a tavaszi növényvédő szerek kezelése. Más fajoknál a fajtaérzékenységtől függ szükségességük (Mónus és mtsai. 1999, Glits 2000), például a 'Stanley' szilvafajta virágai kifejezetten érzékenyek a monilíniás virágelhalásra (Bubán és mtsai. 2004).

A csonthéjasok virágainak megóvása érdekében tavasszal többszöri fungicides kezelés szükséges időjárástól függően. Hideg csapadékos tavasszal, elhúzódó virágzás esetén akár három-négy alkalommal is indokolt permetezni, míg meleg, száraz időben, ha a virágzás gyorsan lezajlik egy-két kezelés is elegendő lehet (Glits 2000). Számos eltérő hatásmechanizmusú szer áll a termesztők rendelkezésére. Sholberg és Kappel (2008) összesen 12 eltérő hatásmechanizmusú csoportot sorol fel munkájában, melyek alkalmasak a monilíniás betegség elleni védekezésre. A hatáscsökkenés elkerülése érdekében egy vegetációs időben eltérő hatásmechanizmussal rendelkező szereket érdemes felhasználni az egyes kezelések során (Tóth 2007). Hazai tapasztalatok is alátámasztják, hogy a hatékonyság csökkenése összefüggésbe hozható az évenkénti kezelések számával (Kaptás 1994).

A *Monilinia linhartiana* kórokozó ellen is elengedhetetlen a tavaszi időszakban a kémiai védekezés. Nyéki (2004) három kezelést javasol: virágzás kezdetekor, a fővirágzásban és a virágzás végén. Glits (2000) négy kezelést tart szükségesnek a hajtásnövekedés megindulásától a gyümölcsnövekedés kezdetéig. Tafradzhiiski és Angelov (1977, 1979) a három kezelést a bimbók

színeződésekor, a virágzás kezdetén és fővirágzáskor javasolja. Campbell és Madden (1990) szerint a többi monociklikus fertőzésimódú kórokozóhoz hasonlóan az elsődleges fertőzést, azaz az aszkospórák behatolását kell megakadályozni kora tavasszal. Moral és mtsai. (2011) részletesen vizsgálták a kórfolyamatot és véleményük szerint sem a virágfertőzés elleni védekezés a legmegfelelőbb. A szerzők szerint a levelek aszkospórás fertőződését kell megakadályozni, ezzel elkerülhető a virágokat fertőző konídiumok képződése.

A gyümölcsök megóvásának alapja a gyümölcsöt károsító rovarok elleni védekezés (Kern 1912). Az időjárási tényezők hatására keletkezett sérüléseket (jégverés, esőzések utáni repedés) azonnal le kell zárni gombaölő szerek permetezésével, mert a rothadásnak indult termékek, már nem menthetők meg. A felszívódó, transzlokálódó szerek is csak a felső sejtsorokig jutnak (Tóth 2007). Amennyiben a *Monilinia fructicola* kórokozó jelen van az ültetvényben a sérülésektől függetlenül a gyümölcsök kémiai védelme is szükséges (Ogaw et al. 1995). Ilyenkor az érőfélben lévő termékek védelme érdekében csak rövid élelmezés-egészségügyi várakozási idejű szerek használhatóak, nagy lémenyiséggel kijuttatva, nedvesítőszer hozzáadásával a gyümölcsök teljes lefedése érdekében (Tóth 2007).

2.5.2.1. Fungicidek hatékonysága

Mándoki és Varga (2011) szerint az ellenálló populációk kialakulása megakadályozható a meglévő technológiák következetes alkalmazásával, valamint azok korszerűsítésével. Ezzel szemben Brent és Hollomon (2007a) rendszeres rezisztencia monitoringot tart szükségesnek. Josepovits (1991) szerint elengedhetetlen hazánkban is rendszeresen felülvizsgálni a fungicidek hatékonyságát a nemzetközi rezisztenciakutatások eredményeinek figyelembevételével. A populációban kimutatható rezisztens izolátumok száma segít meghatározni a fungicid hatékonyságának mértékét és várható időtartamát (Luo és mtsai. 2007a).

Az utóbbi években több alkalommal is végeztek fungicid hatékonysági vizsgálatokat hazánkban, melyek alapján kisebb mértékű érzékenységsökkenést mutattak ki egyes szubpopulációknál (Sződi és mtsai. 2008). Fazekas (2014) tiofanát-metil, kaptán, penkonazol, miklobutanil és mankoceb hatóanyagú készítményeket vizsgálva - a gyártó által javasolt dózis felével - fungicid hatást tapasztalt *M. laxa* izolátumok tekintetében. Viszont a ciprodinil, a boszkalid és piraklostrobin kombináció, az elemi kén, a fenhexamid és a prokloráz tartalmú készítmények vizsgálatakor az izolátumok eltérő érzékenységet mutattak, ami ezen készítmények gyakoribb használatával magyarázható (Holb 2004). Sződi és mtsai. (2008) által vizsgált *M. fructigena* populációk ellenállóbbak voltak a fungicidekkel szemben, mint a *M. laxa* populációi.

Mándoki és Varga (2011) hazánkban engedélyezett készítményeknek hatékonyságát vizsgálták a *M. fructicola* kórokozó ellen. Kiemelkedő hatékonyságot mutatott a tiofanát-metil, valamint a tebukonazol. Szintén kiváló hatást értek el iprodion, klórtalonil, kaptán és fenhexamid esetében. A vizsgált készítmények közül az azoxistrobin készítménynél tapasztalták a legkisebb mértékű gátló hatást, 1 ppm hígításnál a kontrollhoz képest a telep növekedése 40%-os volt (Mándoki és Varga 2011).

Bulgáriában Dimova és Titinov (2013) 2008 és 2012 között tartó kísérletei során a tiofanát-metil hatékonyan visszaszorította a *M. laxa* okozta hajtáselhalást. A fehérbimbós állapotban, fővirágzáskor majd a virágzás végén megismételt kezeléssel a betegség tünetei nem jelentek meg a meggyfákon. Görögországban a 2005–2006 során végzett vizsgálatokban (Thomidis és mtsai. 2009) hatékonynak találták a tebukonazol és iprodion hatóanyagokat, viszont kimutattak tiofanát-metil hatóanyagra rezisztens egyedeket is. Németországban Maring és Lienshöft (2011) több éven át tartó kísérletei során különböző növényvédő szereknek *Monilinia* fajokkal szembeni hatékonyságát vizsgálták. Leghatékonyabbnak a fludioxonil és ciprodinil kombináció bizonyult, amely hűvös és esős időben is megfelelő hatékonysággal rendelkezik. A szerzők a difenokonazol hatóanyagot is virágzáskori használatra ajánlják. A trifloxistrobin és a boszkalid és piraklostrobin kombináció közül, mint két strobilurin típusú hatóanyagot tartalmazó szer, összehasonlításában a trifloxistrobin bizonyult hatékonyabbnak. A miklobutanil használata hatásának rövid időtartama miatt a termésképződés időszakában ajánlott. A fenhexamid hatása virágzáskor korlátozott, azonban a gyümölcsök tárolása során ezt a készítményt javasolják.

A *M. linhartiana* kórokozó fungicid érzékenységevel kevés kutatás foglalkozik. Radman (1970) kórokozó érzékenységét vizsgálta 0,25%-os orthocid és 0,2%-os rézoxiklorid keverékkel szemben. Megfigyelései szerint a virágzás kezdetétől 8–10 naponként négyszeri kezelés nem bizonyult megfelelő hatékonyságúnak. Sokkal jobb eredményt értek el amennyiben, a vegyszeres védekezést rügypattanástól kezdték el. Tafradzhiiski és Angelov (1977, 1979) a fundazol hatóanyagot javasolják, akár három egymás utáni kezelésben is. Altinyay (1975) a thiram és a kaptán hatóanyagokat találta hatékonynak. Popescu (2011) kísérletei során a virágzás előtti 1%-os rezes kezelés, valamint a virágzás alatti 0,3%-os cineb és virágzás után 0,03%-os miklobutanil hatóanyaggal történő permetezés csökkentette a fertőzés gyakoriságát és mértékét.

2.6. A fungicid rezisztencia kialakulásának mechanizmusai

Számos készítménnyel szemben mutatták ki *Monilinia* fajok rezisztenciáját. A FRAC (Fungicide Resistance Action Committee, Fungicid Rezisztencia Bizottság) a csonthéjasokon és almatermésűeken károsító *Monilinia* fajokat a közepesen veszélyes kategóriába sorolja a rezisztencia kialakulásának szempontjából. Az ebben a kategóriában szereplő fajok esetében csak igen lassan alakul ki rezisztencia vagy a kialakult rezisztens populációk nem okoz gazdaságilag jelentős problémát (FRAC 2014).

Különböző folyamatokon keresztül alakulhat ki rezisztencia. A kvalitatív, azaz hatáshely-rezisztencia során a fungicidhatás kialakulásáért felelős hely változik meg genetikailag a kórokozó szervezetében (Ábrahám és mtsai. 2011). Leggyakrabban pontmutáció áll a genetikai változás hátterében (Ma és Michailides 2005). A hatáshely megváltozásától függően különböző mértékű rezisztencia alakulhat ki. Létrejöhethetnek alacsony szintű rezisztenciával (low level of resistance) rendelkező egyedek, melyek enzimjéhez bizonyos mértékben hozzá tud kapcsolódni a hatóanyag, valamint magas szintű rezisztenciával (high level of resistance) rendelkező egyedek, melyek fehérjéjéhez a változás következtében egyáltalán nem tud hozzákapcsolódni a hatóanyag (Brent és Hollomon 2007a, Dernoeden 2012).

Kvantitatív rezisztenciáról akkor beszélünk, ha a korábban hatékony hatóanyag-mennyiség hatástalanná válik. Ennek oka lehet a gomba csökkent vegyszerfelvétele, vagy a hatóanyagok gyorsabb lebontása, a hatóanyag átalakítása nem mérgező formává (Ábrahám és mtsai. 2011). A hatástalanítás egyik formája az, amikor gomba anyagcseréje megváltoztatásával a hatóanyag, mint prekursor molekula nem alakul át fungicid hatású komponensé. Ilyen hatóanyag például a tiofanát-metil, amely a karbendazim prekursora, vagyis lebomlása során fokozatosan karbendazimmá metabolizálódik. A célfehérje túltermelődése is okozhat hatékonyság csökkenést. Ebben az esetben a hatóanyag nem tud az összes hatáshelyre bekötődni, így nem gátolja teljes mértékben az anyagcsere utat (Brent és Hollomon 2007a, Dernoeden 2012).

A kvantitatív rezisztencia hosszú távon fent maradhat a populációban. Ezen készítmények ellen 2–10 éven belül kialakulnak ellenálló populációi a kórokozóknak (Brent és Hollomon 2007a). Kvalitatív rezisztenciát mutattak ki például a *Cercospora beticola* Sacc. kórokozó kapcsán Görögországban a benzimidazolok kapcsán (Dovas és mtsai. 1976). A másik esetben a fungicid több helyen is beavatkozik a kórokozó anyagcseréjébe. Ezen készítmények ellen nehezebben alakul ki rezisztencia, mert több gén (anyagcsere út) megváltozása szükséges a kvantitatív rezisztencia kialakulásához. A kontakt készítmények (mankocéb, thiram, maneb, klórtalonil) esetén kvantitatív rezisztencia alakul ki, valamint a triazolok elleni rezisztencia kapcsán is legalább

4 különböző folyamatot írtak le, amely során hatáscsökkenés alakulhat ki (De Waard és mtsai. 2006).

A hasonló hatásmechanizmusú szerek között gyakran alakul ki pozitív keresztrezisztencia, a 3. táblázatban található számos hatóanyagcsoporton belül megfigyelték a keresztrezisztencia jelenségét. Például a szterol-bioszintézis gátlók közé tartozó triazoloknál is létrejöhet keresztrezisztencia, viszont a szterol-bioszintézis gátlók csoportjának más tagjaival nem mutatnak keresztrezisztenciát (Brent és Hollomon 2007b). A benzimidazoloknál negatív keresztrezisztencia alakul ki a N-karbamátokkal. A dietofenkarb hatóanyag nem gátolja a benzimidazolokra érzékeny egyedeket, csak a benzimidazolokra rezisztenseket (Nyporko és Blume 2008, Malandrakis és mtsai. 2012).

2.6.1. *Monilinia* fajok benzimidazol rezisztenciája

Magyarországon jelenleg a tiofanát-metil az egyetlen engedélyezett hatóanyag a benzimidazolok közül, amely a karbendazim prekursora. A benomil helyettesítésére vezették be, mert bevezetését követően néhány éven belül rezisztencia alakult ki számos kulturában a benomil ellen (Katan és mtsai. 1983, Ogawa és mtsai. 1984, Orbach és mtsai. 1986, Michailides és mtsai. 1987). A benzimidazolok a mikrotubulusokhoz kötődve gátolják a mitózist, ill. a hifák növekedését, továbbá a csíratömlők deformált növekedéséért felelősek (Leroux és mtsai. 1999). A mikrotubulus két alegységből épül fel, a benzimidazol rezisztencia a β -alegység génjében bekövetkező változások során alakul ki (Nyporko és Blume 2008), leggyakrabban pontmutáció formájában (Koenraadt és mtsai. 1992). A rezisztens populációk kialakulásához 1–2 évre van szüksége a kórokozóknak. A kialakult rezisztencia hosszú távú, nehezen válik a populáció ismét érzékennyé a benzimidazolokra (Brent és Hollomon 2007a).

Amerika számos területén (Brazília, Kalifornia) mutattak ki benzimidazol rezisztenciát (Ma és mtsai. 2003, May-De Mio és mtsai. 2011,) Európában tiofanát-metil rezisztens *Monilinia fructicola* populációkat találtak Franciaország (Lichou és mtsai. 2002, Weger és mtsai. 2011), Spanyolország, Svájc és Olaszország területén (Weger és mtsai. 2011). A rezisztencia a *M. laxa* kórokozó esetében kevésbé gyakori. Kaliforniában alacsony szintű rezisztenciával (low resistance) rendelkező izolátumokat találtak (Ma és mtsai. 2005). Magas szintű rezisztenciával (high resistance) rendelkező izolátumokat kizárólag Görögországban azonosítottak (Thomidis és mtsai. 2009). Papavasileiou és mtsai. (2015b) eredményei alapján a görög *M. fructicola* populációk mindegyike rezisztens a benzimidazolokra, míg a *M. laxa* populációk ellenállóak vagy érzékenyek (Malandrakis és mtsai. 2012).

3. táblázat: A monilíniás betegség ellen hazánkban engedélyezett szisztémikus és mélyhatású hatóanyag csoportok hatásmechanizmusa (*Brendt és Hollomon 2007, **Fazekas 2014 nyomán)

Hatóanyag csoport	Anyagcsere út	Hatáshely (gén)	Rezisztencia kialakulásának veszélye*	Használatuk gyakorisága hazánkban **
Benzimidazolok	mitózis és sejtszaporodás gátlók	β -tubulin (<i>tub2</i>)	nagy	közepes (Topsin-M 70WP)
Pirimidinek	aminosav és fehérje szintézis gátlók	metionin bioszintézis (<i>cgs</i>)	közepes	magas (Chorus 75WG)
Hidroxi Anilidek	szterol bioszintézis gátlók	számos hatáshely, többek között: 3-keto reduktáz, C4-demetiláz (<i>erg27</i>), C14-demetiláz (<i>cyp51</i>) enzimek	közepes vagy alacsony	magas (Teldor 500SC)
Triazolok			közepes	közepes (Topas 100EC, Folicur Solo)
Imidazolok			közepes	magas (Mirage 45EC)
Fenilpirrolok	szignál transzdukció gátlók	MAP/Hisztidin-kináz (<i>os-2</i> , <i>HOG1</i>)	alacsony vagy közepes	nincs adat
Dikarboximidek		MAP/Hisztidin-kináz (<i>os-1</i> , <i>Daf1</i>)	közepes vagy magas	nincs adat
Strobilurinok	lélegzésgátlók	citokróm bc1 a Qo kötőhelyen (<i>cyt b</i>)	nagy	magas (Signum WG)

A *Monilinia* fajoknál a mutáció helyétől függően különböző erősségű ellenállóság vagy rezisztencia alakulhat ki (Ma és mtsai. 2003). A *M. fructicola* faj esetén leggyakrabban a β -tubulin gén 198-as aminosavát kódoló tripletben jön létre pontmutáció (4. táblázat), mert ehhez az aminosavhoz kötődik közvetlenül a tiofanát-metil (Nyporko és Blume 2008). Ennek következtében alakul ki a magas szintű rezisztencia. A 6-os, valamint a 240-es aminosav megváltozása esetén alacsony szintű rezisztencia alakul ki.

4. táblázat: *Monilinia* fajokban kialakuló benzimidazol rezisztencia molekuláris háttere

Kórokozó	Allél	Mutáció során kialakuló változás		Rezisztencia szintje	Hivatkozás
		Szekvencia szinten	Aminosav csere		
<i>M. laxa</i>	E198A	GAG→GCG	glutaminsav→alanin	magas	Malandrakis és mtsai. (2012)
<i>M. laxa</i>	L240F	CTC→TTC	leucin→fenil-alanin	alacsony	Ma és mtsai. (2005)
<i>M. fructicola</i>	H6Y	CAT→TAT	hisztidin→tirozin	alacsony	Ma és mtsai. (2003), Fan és mtsai. (2014)
<i>M. fructicola</i>	E198A	GAA→GCA	glutaminsav→alanin	magas	Ma és mtsai. (2003), Luo és mtsai. (2007a), Zhu és mtsai. (2010), Weger és mtsai. (2011), Fan és mtsai. (2014)
<i>M. fructicola</i>	E198K	GAA→AAA	glutaminsav→lizin	magas	Koenraadt és mtsai. (1992)

2.6.2. *Monilinia* fajok strobilurin rezisztenciája

A strobilurinok a mitokondriális légzést gátolják, a citokróm cb1 komplexben (komplex III) a Qo helyen, amely a mitokondriális DNS-ben kódolt. Itt kevésbé működnek a DNS javító mechanizmusok, mint a sejtmagi DNS-ben, így könnyebben alakul ki rezisztencia (Brent és Hollomon 2007b). A hatóanyagok piacra kerülése után 1–3 éven belül egyes kórokozóknál kialakulnak az ellenálló populációk (Kuck és Russell 2006). Egy 2012-es összegzés szerint világszerte összesen 38 kórokozó gombafajnál találtak rezisztens populációkat (List 2012), Magyarországon először 2004-ben mutatták ki szőlő kórokozók (*Erysiphe necator* var. *necator* Schwein. 1834, *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni) esetében (Dula 2007).

A strobilurinokkal szemben monogén rezisztencia alakul ki (Brent és Hollomon 2007a), három pontmutációt azonosítottak a citokróm cb1 komplexben (5. táblázat), amelyek különböző szintű rezisztenciát alakítanak ki (List 2012). Grasso és mtsai. (2006) alternatív respirációs utakon keresztül korlátozott mértékű ellenállóság kialakulásáról számolnak be. Fernández-Ortuño és mtsai. (2008) szerint ezen anyagcsere utaknak a rezisztencia kialakulásában korlátozott szerepük van. Csökkent érzékenységgel rendelkező *Monilinia* populációkat mutattak ki Braziliában (May De Mio és mtsai. 2011), Kínában (Chen és mtsai. 2014) és az USA-ban (Villani és Cox 2008, Amiri és mtsai. 2010, Halbrecht és mtsai. 2013), de az érzékenységsökkenést magyarázó mutációt nem találtak a *cyt b* génben.

5. táblázat: Kórokozókban kialakuló strobilurin rezisztencia molekuláris háttere

Allél	Kórokozó példák	Mutáció során kialakuló változás		Rezisztencia szintje	Hivatkozás
		Szekvencia szinten	Aminosav csere		
F129L	<i>Pyricularia grisea</i> Sacc., <i>Pyrenophora teres</i> Drechsler	TTC→CTC →TTG →TTA	Fenil-alanin→ Leucin	alacsony	Sierotzki és mtsai. (2007)
G137R	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (Died.) Drechsler	GGG→AGG	Glicin→Arginin	alacsony	Kim és mtsai. (2003), Sierotzki és mtsai. (2007)
G143A	<i>Pyricularia grisea</i> , <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (Berk. & Curtis) Rostovzev	GGT→GCT	Glicin→Alanin	magas	Ishii és mtsai. (2001), Kim és mtsai. (2003)

Miessner és Stammeler (2010) vizsgálatai alapján a *M. laxa* és *M. fructicola* fajoknál a 143-as aminosavat követően egy intron található. Ezért kicsi a valószínűsége a G143A mutáció kialakulásának, mert ez zavarná az intron kivágódását és funkcióképtelen fehérje jönne létre (Grasso és mtsai. 2006). Luo és mtsai. (2010) amerikai és kínai *M. fructicola* izolátumok mindegyikéből kimutatta az intront és valószínűsíti, hogy a faj egésze rendelkezik vele. A *M. fructigena* genomjában viszont a vizsgálatok szerint nincs jelen ez a bizonyos intron, ezért ennél a fajnál a mutáció kialakulhat. A szerzők egyik fajnál sem találtak intront a 129 vagy 137-es aminosavakat kódoló triplettek közelében.

2.6.3. *Monilinia* fajok triazol rezisztenciája

A triazolok az ergoszterol bioszintézist akadályozzák azáltal, hogy a citokróm P450 típusú α -demetiláz enzimeket megkötik, amelyek a lanoszterol ergoszterollá történő alakításáért felelősek. Az ergoszterol helyett más szterolok halmozódnak fel a sejtmembránban, jelentősen megváltoztatva annak fluiditását, permeabilitását és a membránhoz kötött enzimek aktivitását

(Odds és mtsai. 2003). Az egyes hatóanyagok különböző hatékonysággal kötik meg a citokróm 14 α -demetilázt (Guan és mtsai. 1992a, 1992b), de a hasonló hatásmechanizmus miatt gyakori a keresztrezisztencia kialakulása (Hsiang és mtsai. 1997, Ypema 1997). A tebukonazol két helyen gátolja az ergoszterol szintézisét, ami nagy hatásbiztonságot eredményez és csökkenti a szerrezisztencia kialakulásának valószínűségét (Ábrahám és mtsai. 2011).

Napjainkig két mechanizmus ismert, amely triazol rezisztenciát eredményez a *Monilinia* fajoknál (6. táblázat). Az Amerikai Egyesült Államok területén Luo és Schnabel (2008) a citokróm P450-szterol-14 α -demetiláz gén (*cyp51*) túltermelődése és a *Monilinia fructicola* izolátumok propikonazol rezisztenciája között találtak összefüggést. A túltermelődést egy ismétlődő szekvencia (ún. 'Mona' genetikai elem) okozza, amely a *cyp51* gén promóter régiójában helyezkedik el.

6. táblázat: *Monilinia* fajokban kialakuló triazol rezisztencia molekuláris háttere

Allél	Kórokozó	Mutáció során kialakuló változás		Rezisztencia szintje	Hivatkozás
		Szekvencia szinten	Következmények		
Mona	<i>M. fructicola</i>	65 bp inzerció	5-11-szeses expresszió	magas	Luo és Schnabel (2008), Luo és mtsai. (2008)
Y136F	<i>M. fructicola</i>	TAC→TTC →TTT	tirozin→ fenil-alanin	magas	Chen és mtsai. (2012)

Vizsgálataik során a *cyp51* gén szekvenciáját is vizsgálták, de nem találtak benne a rezisztenciához köthető pontmutációt (Luo és Schnabel 2008). Kínában Chen és mtsai. (2012) egy új DMI készítmény (SYP-Z048) vizsgálatakor laboratóriumi körülmények között olyan rezisztens *M. fructicola* tenyészeteket állítottak elő, melyekben a *cyp51* gén 136-os aminosavának szekvenciájában találtak pontmutációt (6. táblázat). A mutáció természetes kialakulását nem valószínűsítik, mert a tenyészetek fitnessze (növekedési ütem, sporuláció, rothadó folt növekedésének sebessége) lecsökkent. Bár ugyanez a mutáció a *Blumeria graminis* (DC.) Speer, *Erysiphe necator* var. *necator*, a *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous és a *Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton fajoknál természetes körülmények között kialakul (Délye és mtsai. 1997, 1998, Leroux és mtsai. 2007, Canas-Gutierrez és mtsai. 2009).

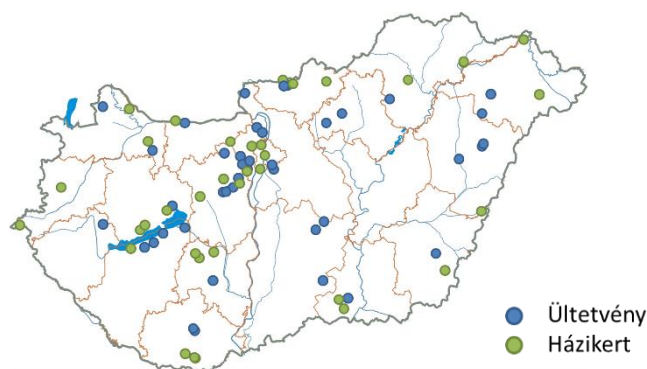
Az ABC transzporter gén (MfABC1) expresszióját is vizsgálták a DMI rezisztencia kapcsán, amely során összefüggést mutattak ki az MfABC1 gén termelődése és a rezisztencia kialakulása között, viszont pontmutációt a génben nem találtak (Schnabel és mtsai. 2003, Luo és Schnabel 2008).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgálatok anyaga

3.1.1. Izolátumok

Moniliniás betegség tipikus tüneteit mutató növényi részeket gyűjtöttünk be Magyarország különböző területeiről, ültetvényekből, házi kertekből, valamint közterületekről 2013–2015 között (6. ábra). A fertőzött hajtások és gyümölcsök elsősorban csonthéjas fajokról származtak. Néhány mintát gyűjtöttünk almatermésűekről is, elsősorban a *Monilinia linhartiana* kórokozó vizsgálatára. Vizsgálatainkba egy törökországi birsmintát (MLH5), valamint egy 2010-ben almáról izolált Lengyelországból származó izolátumot (2010/PS-78) is bevontunk. Az izolátumok jellemző adatai – az izolátum neve, a gazdanövény, a fertőzött növényi rész megnevezése, valamint a gyűjtés helye és ideje – a 2. mellékletben találhatóak.



6. ábra: *Monilinia* izolátumok származása

3.1.2. Táptalajok

A kórokozók izolálásához, fenntartásához, valamint a fungicidekkel végzett hatásvizsgálatok során PDA (potato dextrose agar, burgonya dextróz agar, BioLab Zrt. 39,0 g porított PDA /liter) táptalajt használtunk (Wormald 1954). A *Monilinia linhartiana* kórokozót MEA (malt extract agar, maláta kivonat agar, BioLab Zrt., 50,0 g porított maláta kivonat /liter) és LMA (Leonian malt agar, Leonian maláta agar, 1,0 g KH_2PO_4 , 1,0 g MgSO_4 , 10,0 g szacharóz, 5,0 g pepton, 15,0 g porított agar, 10,0 g maláta kivonat/liter, táptalajokon is tenyésztettük, a kórokozó számára optimális szubsztrátum megállapítása érdekében (Batra 1983, Malloch és Cain 1971).

3.1.3. Növényi részek

Az izolátumok patogenitásának igazolásához felhasznált növényi részek egy törökbálinti házikertből származtak. A csonthéjasokról származó izolátumok esetében *Prunus cerasus* 'Érdi bőtermő' gyümölcseit fertőztük meg, amelyeket technológiai érettségben szüreteltünk. A *Monilinia linhartiana* kórokozó izolátumainak megbetegítő képességét *Cydonia oblonga* fiatal (7-10 cm-es) hajtásain és fiatal (2-2,5 cm átmérőjű), valamint érett termésein ellenőriztük.

3.1.4. Eszközök

A laboratóriumban általánosan használt üveg- és fémeszközökön túl, a kórokozók morfológiai jellemzőinek megállapításához Leica MZ6 sztereomikroszkópot és Nikon Eclipse 50i citoplaszt mikroszkópot használtunk. A mikroszkopikus fotókat MicroPublisher 5.0 RTV (QImaging) típusú kamerával készítettük. Polimeráz láncreakció vizsgálatokhoz az Applied Biosystems 9700 típusú PCR-készülékét használtuk. A nukleinsav koncentrációt NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) készülékkel mértük meg.

3.1.5. Fungicidek

Az izolátumok növényvédő szer érzékenységeinek vizsgálatára és az esetlegesen kialakult rezisztencia kimutatására előzetes vizsgálatok alapján (Lantos és mtsai. 2013) hat, általánosan használt, kereskedelmi forgalomban kapható fungicidet választottunk ki (7. táblázat). A készítmények jelenleg is rendelkeznek engedélyokirattal csonthéjas kultúrákban (NÉBIH 2016). A Topsin-M 70 WDG mélyhatású, az agrár-környezetgazdálkodási programban (AKG) feltételesen engedélyezett készítmény. A Chorus 50 WG, Foilcur Solo, Signum WG, Teldor 500 SC és Topas 100 EC speciális hatáshelyű fungicidek, használatuk engedélyezett az AKG program keretén belül. A Signum WG esetében a piraklostrobin és boszkalid hatóanyagokat külön- külön vizsgáltuk, a tiszta hatóanyagokat a gyártótól (BASF) szeretünk be, mert nem létezik olyan, monilíniás betegséggel szemben engedélyezett formuláció, amely csak az egyik hatóanyagot tartalmazza.

A *Monilinia linhartiana* kórokozó vizsgálatát a fenti 6 peszticiden kívül további 15 készítménnyel is elvégeztük. Ezeket az almatermésűek és csonthéjasok monilíniás betegsége ellen engedélyezett készítmények közül választottuk ki (7. táblázat), melyek között kontakt (Antracol 70 WG, Captan 50 WP, Cuproxat FW, Dithane-M45, Funguran-OH 50 WP, Nordox 75 WG, Pluto 50 WP Rézoxiklorid, Roval Aquaflo) és speciális hatáshelyű készítmények (Flint Max, Mirage 45 EC, Quadris, Signum WG, Systhane Duplo, Zato 50 WG) is szerepelnek. A továbbiakban

kizárólag a hatóanyag megjelölésével hivatkozom a készítményekre, a hatóanyag egyértelműen azonosítja a formulációt.

7. táblázat: Csonthéjas és almatermésű kultúrákból izolált *Monilinia* fajok fungicid érzékenységének vizsgálata során felhasznált készítmények (NÉBIH 2016)

Növényvédő szer	Hatóanyag	Gyártó	Forgalmi kategória	Gyakorlati dózis
Chorus 50 WG	500 g/kg ciprodinil	Syngenta	III.	0,40 g/l
Folicur Solo	250 g/l tebukonazol	Bayer	II.	0,1 ml/l*
Signum WG	267 g/kg boszkalid + 67 g/kg piraklostrobin	BASF AG.	II.	2,5 mg/l* 2,5 mg/l*
Teldor 500 SC	500 g/l fenhexamid	Bayer	III.	1,00 ml/l
Topas 100 EC	100 g/l penkonazol	Syngenta	III.	0,5 ml/l
Topsin-M 70 WDG	700 g/kg tiofanát-metil	Tamico	I.	1 mg/l, 50 mg/l*
Antracol 70 WG	70% propineb	Bayer	II.	1,66 g/l
Captan 50 WP	50% kaptán	Arysta Mo. Kft.	I.	2,12 g/l
Cuproxat FW	350 g/l tribázikus rézszulfát	NuFarm	III.	5,00 ml/l
Dithane-M45	80 g/kg mankoceb	Indofil Ch.	II.	0,20 g/l
Flint Max	500 g/kg tebukonazol + 250 g/kg trifloxistrobin	Bayer	I.	0,20 g/l
Funguran-OH 50 WP	77% rézhidroxid	Spiess-Urania	III.	2,66 g/l
Mirage 45 EC	450 g/l prokloráz	Makhteshim	II.	5,00 ml/l
Nordox 75 WG	86% réz(I)oxid	Nordox	III.	1,73 g/l
Pluto 50 WP	86% rézoxiklorid	Agri-Estella	III.	2,00 g/l
Quadris	250 g/l azoxistrobin	Syngenta	III.	1,00 ml/l
Rovral Aquaflow	500 g/l iprodion	BASF	I.	0,83 ml/l
Signum WG	267 g/kg boszkalid + 67 g/kg piraklostrobin	BASF AG.	II.	1.00 g/l
Switch 62,5 WG	250 g/kg fludioxonil + 375 g/kg ciprodinil	Syngenta	III.	0.80 g/l
Systhane Duplo	450 g/l miklobutanil	Dow	II.	0,30 ml/l
Zato 50 WG	50% trifloxistrobin	Bayer	II.	0,15 g/l

* Ezen készítmények esetén nem a gyakorlatban alkalmazott dózis szerepel a táblázatban, hanem az érzékeny és rezisztens izolátumok elkülönítésére szolgáló elválasztó koncentráció (Ma és mtsai. 2003, 2005, Spiegel és Strammiller 2006, May-De Mio és mtsai. 2011, Chen és mtsai. 2013)

3.1.6. Primerek

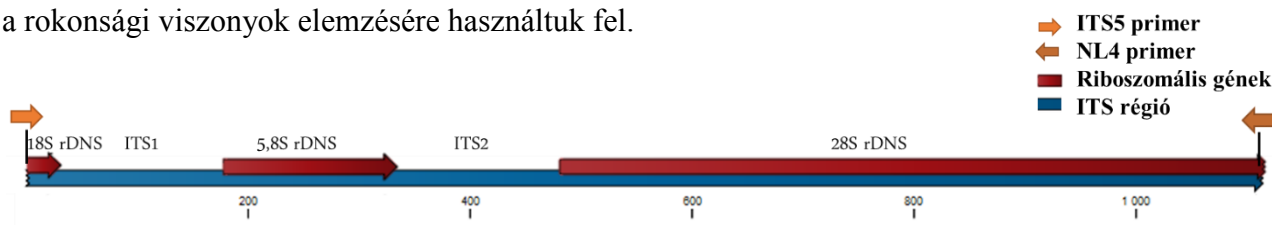
A molekuláris vizsgálatok során részben a szakirodalomban szereplő indítószekvenciákat használtunk, de egyes esetekben magunk terveztük a primereket. A β -tubulin és citokróm B génekből rendelkezésünkre álltak szekvencia adatok egyes *Monilinia* fajokból, de a korábbi

kutatásokban szereplő vizsgálati módszerek nem bizonyultak megfelelőnek, így saját tervezésű primereket készítettünk az OligoAnalyzer 3.1 online szoftver (Integrated DNA Technologies Inc.) segítségével (Owczarzy és mtsai. 2008). Az oligonukleotidokat a Fermentas cégtől rendeltük meg.

3.1.6.1. Korábbi kutatásokban szereplő primerek

ITS régió

Az ITS régió vizsgálatára White és mtsai. (1990) által tervezett ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'), valamint Kurtzman és Robnett (1997) által leírt NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') primereket használtuk fel. A primerpár a 18S riboszomális gén egy részét, az ITS1 régiót, az 5,8S riboszomális gént, az ITS2 régiót, valamint a 28S riboszomális gén egy részét emeli ki (7. ábra). Vizsgálataink során ITS régiót izolátumaink fajsztíntű azonosításra és a rokonsági viszonyok elemzésére használtuk fel.



7. ábra: *Monilinia* fajok ITS régiója és a primerek kötődési helyei

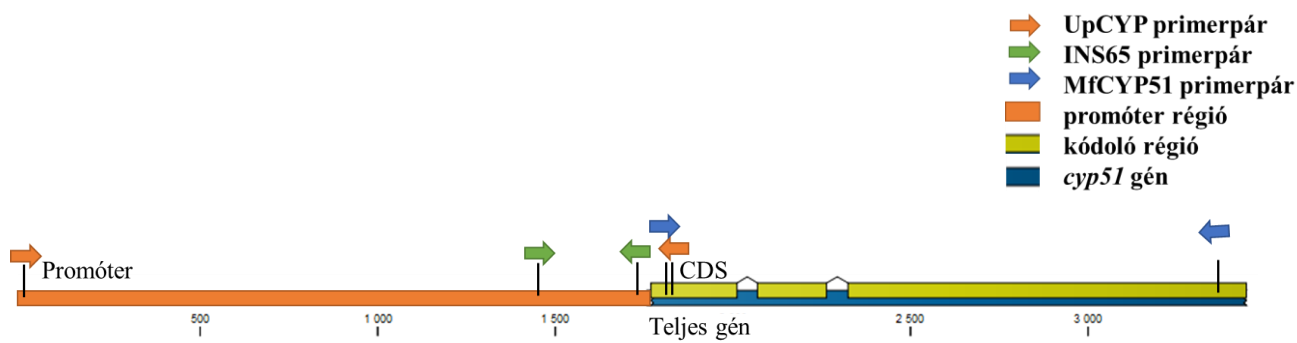
Polimorf régió

A molekuláris azonosításhoz Petróczy és Palkovics (Petróczy és mtsai. 2012) által tervezett UniMon primerpárt (UniMon-F: 5'-ATC GGC TTG GGA GCG G-3' és UniMon-R: 5'-GAG CAA GGT GTC AAA ACT TCC AT-3') használtunk, amelyet a *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. polystroma* és *M. fructicola* fajok fajsztíntű azonosítására optimalizáltak. Az indítószekvenciák egy ismeretlen funkciójú genomi régióból fajoként eltérő hosszúságú szakaszt emelnek ki, így a fajok meghatározása a képződött termék hossza alapján lehetséges. A régiót kizárólag az izolátumok fajsztíntű azonosítás miatt alkalmaztuk.

14 α -demetiláz enzim génje (*cyp51*)

A 14 α -demetiláz enzim génjének vizsgálata során három primerpárt használtunk, melyek Luo és Schnabel (2008) tanulmányában szerepelnek. A komplett gént a MfCYP51-F (5'-GTT TCG CCA TGG GTG TTC T-3') és MfCYP51-R (5'-TCG TCT CTC CCA TGC CAC AA-3'), primerpár segítségével emeltük ki. Az UpCYP-1F (5'-AGA GCT ACC ACC CAC GAG GAA -3') és UpCYP-1R (5'-GAC CGC TGC GAA ATC TCT TGA-3') primerpár a gén promóter régiójának vizsgálatára alkalmas, míg az INS65-F (5'-TCG ATG TTG CGT GGT CTG TCA-3') és INS65-R (5'-CGG AGA GCG TCGATG TAG GTG-3') primerpár a promóter régió belül egy rövid

szakaszt emel ki (8. ábra). A gént a rokonsági viszonyok, valamint a triazolok ellen kialakuló rezisztencia kapcsán vizsgáltuk.

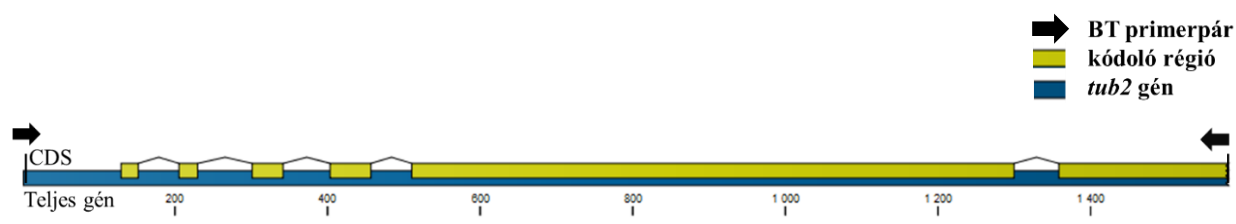


8. ábra: *Monilinia* fajok *cyp51* génje és a primerek kötődési helyei

3.1.6.2. Saját tervezésű primerek

β -tubulin (*tub2*) gén

A nemzetközi adatbázisban (NCBI, National Center for Biotechnology Information) szereplő *Monilinia* fajok β -tubulin szekvenciáit a TubA és TubR1 primerpárokkal amplifikálták. A primerpárt McKay és mtsai. (1998) tervezték a *Hypomyces rosellus* (Alb. & Schwein. : Fr.) Tul. faj vizsgálatára. Számításaink alapján azonban a két primer olvadási hőmérséklete olyan nagymértékben különbözik egymástól, hogy ez megnehezíthette volna a polimeráz láncreakció specifikus működését. Ezért az adatbázisban megtalálható szekvenciák alapján olyan primereket terveztünk (BT-for: 5'-ATG CGT GAG ATT GTA CGT AT-3' és BT-rev: 5'-GTA CCA ATG CAA GAA AGC CT-3'), amelyek a *Monilinia* fajok szekvenciájára megfelelően illeszkednek és olvadáspontjuk is hasonló (9. ábra). A gént rokonsági viszonyok feltárása során, valamint a benzimidazol rezisztencia kapcsán vizsgáltuk.



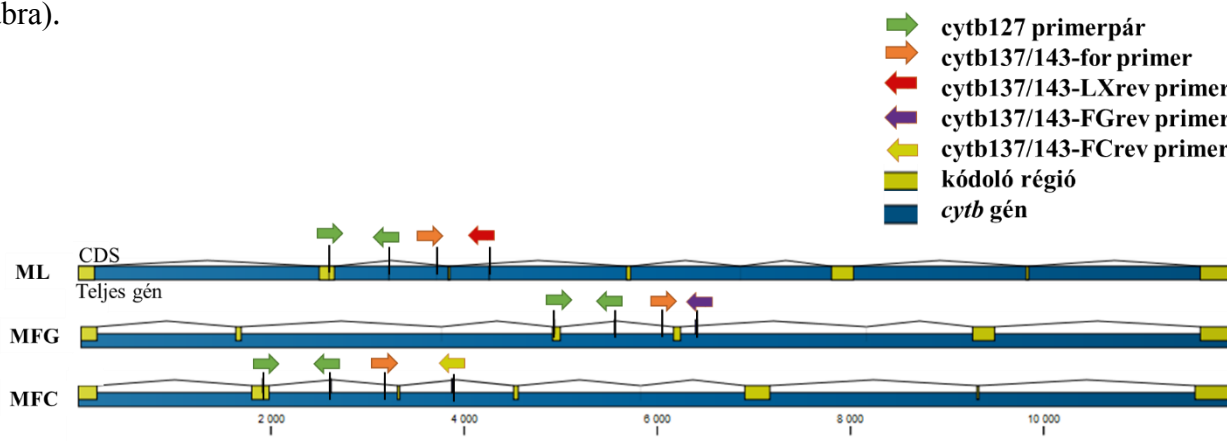
9. ábra: A β -tubulin gén szekvencia részletére tervezett primerpár

Citokróom B (*cytb*) gén

Az irodalmakban (Villani és Cox 2009, Luo és mtsai. 2010, Hily és mtsai. 2011, Hu és mtsai. 2011) megtalálható a *Monilinia* és *Monilia* fajok citokróom B génjének teljes szekvenciája, viszont a strobilurin rezisztencia kimutatására irányuló vizsgálati módszerek cDNS (complementary DNA, komplementer DNS) alapúak. A kódoló szakaszokat tagoló nagyméretű intronok miatt ezen PCR technikák használata nem alkalmas genomi DNS-ből kiinduló

vizsgálatok elvégzésére, így a nemzetközi adatbázisban található szekvenciák alapján primereket terveztünk a strobilurin rezisztencia kapcsán kialakuló pontmutációk feltérképezésére.

A 127-es aminosav vizsgálatára tervezett primerek (cytb127-for: 5'-GGA TCA TAC AGA GCA CCT AGA AC-3', cytb127-rev: 5'-CAA TAG CTA GTC TAC GCT CTT CAC-3') a *M. laxa*, *M. fructigena* és *M. fructicola* fajokból egyaránt eredményeznek célszekvenciát. A 137-es és 143-as kodon a következő exonon helyezkedik el, így ezekre egy másik primerkonstrukciót készítettünk. A 143-as kodont követően a három fő *Monilinia* faj szekvenciája eltérő. A *M. fructigena* kódoló régiója folytatódik, míg a *M. laxa* és *M. fructicola* fajokban a 143-as kodont követően közvetlenül egy-egy intron kezdődik, melyeknek szekvenciája fajonként eltérő. Így a három fajra egy forward primert (cytb137/143-for: 5'-GGG TCA CTG ACG GGT GTC-3') és 3 fajspecifikus reverse primert (cytb137/143-LXrev: 5'-GCA GGT ATA CCT ACA AAT TCG GGC TC-3', cytb137/143-FGrev: 5'-CTG GTT ATT TGA ATA TAA CCA TCT CCA TCC ACC-3', cytb137/143-FCrev: 5'-CAT ATC CTA CTC GAC CAC CAT CAT CC-3') terveztünk (10. ábra).



10. ábra: *Monilinia laxa* (ML) *M. fructigena* (MFG) és *M. fructicola* (MFC) fajok cytb gén szekvenciájára tervezett indítószekvenciák

3.2. A vizsgálatok módszere

3.2.1. Szabadföldi felmérések

3.2.1.1. A mintavételezés módszere, *Monilinia* fajok gyakoriságának felmérése

A *Monilinia* fajok dominanciájának felméréséhez Magyarország teljes területét lefedő régiókból gyűjtöttünk fertőzött növényi részeket. A minták üzemi növényvédelem alatt álló területekről (ültetvényben szedett vagy kereskedelmi forgalomba hozott, árusítóhelyről származó gyümölcs) vagy szakszerű növényvédelemben nem részesülő területekről (házikert, közterület) származtak.

Egy helyszínről lehetőség szerint 1–5 hajtást vagy termést vizsgáltunk. A kórokozókat izoláltuk, majd tiszta tenyészetet készítettünk és izolátum kóddal láttuk el azokat. A tenyészeteket

morfológiai bélyegek alapján azonosítottuk, valamint a meghatározást a későbbiekben molekuláris módszerekkel is alátámasztottuk.

A csonthéjasokról izolált *Monilinia* fajok dominanciájának vizsgálatakor a 3 év adatait évekre lebontva és együttesen is elemeztük, figyelembe véve, hogy az izolátum milyen növényi részről származik, valamint vizsgáltuk az egyes termesztő körzetek között megfigyelhető különbségeket is. Eltéréseket kerestünk az üzemi növényvédelem alatt álló valamint növényvédelmi kezelésben nem részesülő területek *Monilinia* populációi között. A birsról származó minták esetében - azok korlátozott száma miatt - nem végeztünk ilyen széles körű elemzéseket, kizárólag a különböző növényi részekben fertőző *Monilinia* fajok megjelenését vizsgáltuk.

3.2.1.2. A *Monilinia fructicola* virágfertőzésének felderítése

Magyarországon a *M. fructicola* kórokozóhoz köthető virág-, ill hajtáselhalást még nem figyelték meg. 2015-ben végeztünk felméréseket, melyhez három olyan területet választottunk, melyeken 2014-ben közepes vagy nagymértékű *M. fructicola* fertőzést detektáltunk: Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Gyümölcstermesztési Kutatóintézet Érdi Kutató Állomás ültetvényei (Érd-Elvira major), Sóskút Fruct Kft. ültetvényei (Sóskút) és a Budapesti Corvinus Egyetem (jogutódja: Szent István Egyetem) Kísérleti Üzem és Tangazdaság ültetvényei (Soroksár). 2014 nyarán őszibarack ('Babygold 6', 'Cresthaven', 'Michellini', 'Redcal') és szilva ('President', 'Stanley') gyümölcssein jelentkezett nagyobb mértékű termésrothadás, de ezeknek a fajoknak a hajtásait ritkán fertőzik a *Monilinia* fajok. Így a közvetlen szomszédságban található meggyültetvényekben is elvégeztük vizsgálatunkat, feltételezve a kórokozó szaporítóképleteinek a jelenlétét - a közeli inokulumforrás következtében - ezekben az ültetvényekben. Érd-Elvira majorban 'Érdi bőtermő' fajtán és a fajtagyűjteményben, Sóskúton 'Érdi bőtermő' és 'Újfehértói fürtös' fajtákon, míg Soroksáron a meggy fajtagyűjteményben.

Ültetvényenként 30-30 tipikus monilíniás tüneteket mutató vesszőt vizsgáltunk. Vesszőnként két-két egymástól távol eső virágról izoláltuk a kórokozót. A konídiumokat PDA táptalajra helyeztük majd tenyészbélyegek alapján határoztuk meg a kórokozót.

3.2.2. Laboratóriumi *in vitro* vizsgálatok

3.2.2.1. Kórokozók izolálása és tenyészetek fenntartása

Laboratóriumi vizsgálatainkat a Budapesti Corvinus Egyetem (Jogutódja 2016. január 1-től: Szent István Egyetem) Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük 2013–2015 között.

A begyűjtött növényi részeket sztereomikroszkóppal vizsgáltuk szaporító képleteket keresve a fertőzött részeken. Az exogén sztrómákról steril lándzsátű segítségével konídiumokat emeltünk le és PDA táptalajra helyeztük őket lamináris fülkében. Amennyiben nem találtunk szaporító képleteket, a gombát a növény belső szöveteiből izoláltuk a beteg és egészséges növényi rész határáról. A termés vagy vastagabb ágrész felületét 70%-os alkohollal fertőtlenítettük, majd steril szike segítségével a belső szövetekből kis darabokat metszettünk ki és ezeket helyeztük a táptalajra (Sutton és Clayton 1972).

A Petri-csészéket termosztátba helyeztük megvilágítás nélkül (24 °C), majd 3 nap elteltével tiszta tenyészeteket hoztunk létre belőlük. Egy-egy tenyészetből steril dugófűrő segítségével micéliumkorongokat metszettünk ki, ezeket helyeztük új táptalajra. A tenyészeteket parafilmmel lezártuk, majd termosztátba helyeztük mindaddig, amíg benőtték a táptalaj felszínét. Ezt követően az izolátumokat hűtőszekrényben, 4 °C-on tároltuk és kéthavonta végzett átoltással a vizsgálatok végéig fenntartottuk azokat.

3.2.2.2. Morfológiai és tenyészbélyegek megállapítása

A morfológiai bélyegek vizsgálatakor feljegyeztük a fertőzött növényirészeken képződő sztrómák színét, méretét és képződésük helyét. Citoplaszt mikroszkóp alatt vizsgáltuk a konídiumláncok szerkezetét, a konídiumok morfológiáját. A *M. linhartiana* esetében a szaporító képleteket részletesen vizsgáltuk, mert a kórokozóval kapcsolatban nem történtek hazai vizsgálatok. Feljegyeztük a konídiumláncok szerkezetét. Mintánként 20-20 diszjunktör méretét és alakját, valamint mintánként 100-100 konídium szélességét és hosszúságát μm pontossággal megmértük.

A tenyészbélyegek vizsgálatakor megállapítottuk a tenyészet alapszínét, szerkezetét, alakját, mintázottságát, növekedési ütemét (mm/nap) és a felületén képződő légmicélium és konídiumtömeg mennyiségét PDA táptalajon. A *M. linhartiana* izolátumok esetén PDA táptalaj mellett LMA és MEA táptalajokon is megfigyeltük a kórokozó tenyészeinek morfológiáját. A tenyészetek tulajdonságait a leoltást követő egy hét elteltével figyeltük meg, minden esetben teljes sötétséget biztosítottunk a tenyészetek fejlődése során a termosztátban (24°C). Izolátumonként 3 ismétlést végeztünk.

3.2.2.3. Patogenitás igazolása

A megbetegítő képesség bizonyítására inokuláció előtt a növényi részeket 70%-os etanolban 1 percen keresztül fertőtlenítettük, majd steril vízben lemostuk és lamináris fülkében szárítottuk. A mesterséges fertőzést a kórokozók tiszta tenyészetének növekvő széléből származó 5 mm átmérőjű micéliumkorongokkal végeztük.

A csonthéjasokról származó izolátumok esetében érett meggytermések epidermisze alá helyeztük a micéliumkorongot (Penrose és mtsai. 1985, van Leeuwen és mtsai. 2002, Hu és mtsai. 2011). A *M. linhartiana* kórokozó esetében a fiatal hajtáson található levélgyekek és főerek epidermisze, valamint a fiatal és érett termések héja alá helyeztük a micéliummal átszőtt táptalajkorongot (Moral és mtsai. 2011). A kontroll esetében steril táptalaj korongot helyeztünk a megsebzett szövetek alá. Az inokulált növényi részeket steril csíráztató edényekbe, vízben álló steril üveggyöngyökre helyeztük és szobahőmérsékleten (24 ± 3 °C), természetes megvilágítás mellett inkubáltuk. A patogenitási tesztet izolátumonként 3 ismétlésben végeztük. A kórokozók terjedését a csonthéjasokról származó izolátumok esetében 1 hét, a *M. linhartiana* kórokozóval fertőzött növényi részek esetén 3 hét elteltével értékeltük, figyelembe véve a növényi szövetek kolonizációját, valamint a fertőzött szöveteken megjelenő szaporítóképleteket.

3.2.2.4. Mérgezett agarlemez módszer

Az izolátumok fungicid érzékenységének vizsgálatát klasszikus, mérgezett agarlemezen végzett kísérletek során vizsgáltuk, melyet az összes 2013–2014-ben gyűjtött izolátummal, valamint egy 2010-ből származó lengyel izolátummal (2. melléklet) is elvégeztünk. A csonthéjas kultúrákból izolált *Monilinia* fajok érzékenységét 7 (boszkalid, ciprodinil, fenhexamid, penkonazol, piraklostrobin, tiofanát-metil és tebukonazol) hatóanyag jelenlétében vizsgáltuk, míg a *M. linhartiana* kórokozó izolátumaira további 15 (azoxistrobin, boszkalid+piraklostrobin, fludioxonil+ciprodinil, iprodion, kaptán, mankoceb, miklobutanil, prokloráz, propineb, réz(I)oxid, rézhidroxid, rézoxiklorid, tebukonazol, tebukonazol+trifloxistrobin, tribázikus rézszulfát, trifloxistrobin) hatóanyag vagy hatóanyag kombináció hatékonyságát teszteltük, mert a birs monilíniás betegségének kórokozójával ezirányú hazai vizsgálatokat nem végeztek.

Kézmeleg, steril PDA táptalajhoz kevertük a hatóanyag megfelelő dózisát, majd 85 mm-es Petri-csészékbe kitöltve elkészítettük a mérgezett agarlemezeket (Penrose és mtsai. 1985). A kontroll Petri-csészék hatóanyag mentes PDA táptalajt tartalmaztak. A Petri-csésze közepére a kórokozó micéliumával átszőtt, 5 mm átmérőjű táptalajkorongot helyeztünk, majd termosztátban 24 °C-on, sötétben inkubáltuk azokat. Izolátumonként 3 ismétlést végeztünk. Az eredményeket akkor értékeltük, amikor a kontroll tenyészetek benőtték a Petri-csészét. Két, egymásra merőleges

irányban mm pontossággal mértük meg a tenyészet átmérőjét, majd a kontroll tenyészetekkel összevetve gátlási százalékot számítottunk az alábbi képlet alapján (May-De Mio és mtsai. 2011).

$$\text{gátlási \%} = \frac{\text{kontroll tenyészet növekedése} - \text{tenyészet növekedési mérgezett agarlemezen}}{\text{kontroll tenyészet növekedése}} * 100$$

A 7. táblázatban szereplő hatóanyagokat két koncentrációban adtuk a táptalajhoz: a termelők által az ültetvényekben alkalmazott dózisban (gyakorlati dózis), valamint a gyakorlati dózis tízszeres hígításában (Petróczy 2009, Fazekas 2014). A csonthéjas kultúrákból izolált *Monilinia* fajok érzékenységeinek vizsgálatakor ezeket a koncentrációkat alkalmaztuk a ciprodinil, fenhexamid és penkonazol készítményeknél, a *M. linhartiana* kórokozó érzékenységeinek vizsgálata során a további 15 hatóanyag vagy hatóanyag kombináció esetén. A boszkalid (Spiegel és Strammiller 2006), piraklostrobin (Chen és mtsai. 2013), tiofanát-metil (Ma és mtsai. 2003, 2005) és tebukonazol (May-De Mio és mtsai. 2011) készítmények esetében az irodalmi adatok alapján rendelkezésünkre állt az ún. elválasztó koncentráció (discriminatory dose). Az elválasztó koncentráció a gyakorlati dózissnál jóval kisebb, alkalmas az érzékeny és rezisztens izolátumok elválasztására (7. táblázat). A piraklostrobin esetében az alternatív oxidációs utak gátlására 100 µg/ml szalicilhidroxamint (SHAM, salicylhydroxamic acid 99%, Sigma-Aldrich) adtunk a táptalajhoz (Luo és mtsai. 2007a). A pontos koncentráció beállítását segítette, hogy előre elkészítettük a tebukonazol 100 ml/l-es és a tiofanát-metil, a boszkalid és piraklostrobin 100 mg/l-es, a SHAM 10000 mg/ml-es törzsoldatát, majd ezeket használtuk fel a pontos koncentráció beállítására. A törzsoldatokat a vizsgálat során hűtőszekrényben, 4 °C-on tároltuk a vizsgálatok befejeztéig.

3.2.3. Molekuláris biológiai módszerek

3.2.3.1. Genomi DNS izolálása

A molekuláris vizsgálatokhoz az izolátumok örökítőanyagát CTAB (cetiltrimetil-ammónium-bromid) módszer segítségével vontuk ki (Maniatis és mtsai. 1989), majd kloroform és izoamil alkohol 24:1 arányú elegyének felhasználásával tisztítottuk (Gell és mtsai. 2007), a módszer pontos leírása a 3. mellékletben található. Fontosnak tartottuk, hogy a DNS-t az első tiszta tenyészetből kivonjuk, mert szakirodalmi adatok szerint a rezisztens izolátumok néhány átoltást követően veszíthetnek ellenállóságukból (Karaoglaniédis és Thanassouloupoulos 2002, Cox és mtsai. 2007, Li és mtsai. 2015).

3.2.3.2. Polimeráz láncreakció

A molekuláris vizsgálatokhoz PCR módszert alkalmaztunk, a 8. táblázatban megtalálható primerpárok felhasználásával. Minden PCR elegy tartalmazott: 100 ng-ot a gomba DNS-éből, 1mM-t mindkét primerből és Dream Taq Green PCR Master Mix 2x-et (Thermo Scientific, Lithuania) 50 µl végtérfogatra összemérve.

A polimeráz láncreakció során az elsődleges denaturációt (94 °C, 5 perc) 35 ciklus követte. Egy ciklus 3 lépésből áll: denaturáció, primer kötődés és lánchosszabbítás, a részletes protokollok a 8. táblázatban találhatóak. A reakció a befejező lánchosszabbítással (72 °C, 10 perc) zárult.

A PCR reakció eredményességét gélelektroforézis során ellenőriztük, amely során 1%-os agaróz gélben futtattuk a PCR termékeket. Az agaróz gél elkészítésekor GelRedet (Biotium, Csertex Kft., Hungary) adagoltunk 5µl/100ml koncentrációban.

A polimorf régió és a *cyp51* génhez kapcsolódó Mona genetikai elem jelenlétének vizsgálata során a keletkezett termék hosszúságát DNS létra (GeneRuler 100 bp Plus Ladder, Thermo Scientific) mellett olvastuk le. A *cyp51* gén promóter régiójának rövid szakaszát 12 *Monilinia laxa*, 8 *M. fructigena* és 12 *M. fructicola* izolátumnál vizsgáltuk. A polimorf régió vizsgálatát az összes izolátum esetében elvégeztük és a PCR termék mérete alapján azonosítottuk a fajokat. Irodalmi referenciák alapján (Petróczy és mtsai. 2012) viszont a *M. fructigena* (415 bp) és *M. polystroma* (431 bp) fajokból kiemelt fragmentumok hossza között csak 16 bázis a különbség, ez 1%-os agaróz gélen nehezen választható el. Így ezen fajok elkülönítéséhez kiválogattuk a 400 bázispár körüli termékeket és jobb elválasztást lehetővé tévő, 2,5%-os agaróz gélben ismételt megfuttattuk őket.

3.2.3.3. Szekvencia meghatározás

Az agaróz gélben ellenőrzött PCR terméket a PCR High Purification Kittel (Roche, Németország) tisztítottuk ki a gyártó utasításait követve. Végző koncentrációját spektrofotométerrel ellenőriztük. A fragmentumokat a BaseClear B.V. (Leiden, Hollandia) céghez küldtük el direkt szekvencia meghatározásra.

8. táblázat: A polimeráz láncreakciók paraméterei

Vizsgált szakasz	Primerek	PCR ciklus			Célszekvencia hosszúsága	A bázissorrend meghatározások száma (és a meghatározott izolátumok kódja) a különböző <i>Monilinia</i> fajok esetén
		Denaturáció	Primer kötődés	Lánc-hosszabbítás		
ITS régió	ITS5 NL4	94 °C, 30 s	47 °C, 30 s	72 °C, 60 s	~1200 bp	5 <i>M. laxa</i> , 9 <i>M. fructigena</i> , 5 <i>M. fructicola</i> , 4 <i>M. polystroma</i> , 5 <i>M. linhartiana</i> *
β -tubulin gén	BT-for BT-rev	94 °C, 30 s	47 °C, 30 s	72 °C, 120 s	~1600 bp	9 <i>M. laxa</i> , 3 <i>M. fructigena</i> , 15 <i>M. fructicola</i> , 3 <i>M. polystroma</i> , 5 <i>M. linhartiana</i> *
Polimorf régió	UniMon-F UniMon-R	94 °C, 30 s	51 °C, 30 s	72 °C, 45 s	~350-650 bp	4 <i>M. linhartiana</i> (MLH1, MLH2, MLH3, MLH4)
<i>cyp51</i> gén promóter régió	UpCYP-1F UpCYP-1R	94 °C, 30 s	58 °C, 30 s	72 °C, 120s	~1800 bp	1 <i>M. laxa</i> , 3 <i>M. fructicola</i> (2014/ML5, 2014/FC51, 2014/FC54, 2014/FC62)
Teljes <i>cyp51</i> gén	MfCYP51-F MfCYP51-R	94 °C, 30 s	53 °C, 30 s	72 °C, 120s	~1700 bp	4 <i>M. laxa</i> , 2 <i>M. fructigena</i> , 2 <i>M. fructicola</i> , 2 <i>M. polystroma</i> , 2 <i>M. linhartiana</i> *
<i>cyp51</i> gén Mona elem	INS65-F INS65-R	94 °C, 30 s	58 °C, 30 s	72 °C, 120s	~300, 1800 bp	-
<i>cytb</i> gén	cytb127-for cytb127-rev	94 °C, 30 s	58 °C, 30 s	72 °C, 60s	~700 bp	6 <i>M. laxa</i> , 2 <i>M. fructigena</i> , 2 <i>M. fructicola</i> *
<i>cytb</i> gén	cytb137/143-for cytb137/143-LXrev	94 °C, 30 s	67 °C, 30 s	72 °C, 60s	~700 bp	6 <i>M. laxa</i> *
<i>cytb</i> gén	cytb137/143-for cytb137/143-FGrev	94 °C, 30 s	67 °C, 30 s	72 °C, 45s	~500 bp	2 <i>M. fructigena</i> *
<i>cytb</i> gén	cytb137/143-for cytb137/143-FCrev	94 °C, 30 s	67 °C, 30 s	72 °C, 60s	~700 bp	2 <i>M. fructicola</i> *

* Az izolátumok pontos megjelölése a 2. mellékletben található.

3.2.3.4. Szekvenciák elemzése, filogenetikai törzsfák készítése és a genetikai diverzitás számítása

A szekvenciákat az NCBI adatbázis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programcsomagjával ellenőriztük (Altschul és mtsai. 1990), a nukleotid szekvenciákat a Megablast, míg a fehérje szekvenciákat a blastp (protein-protein BLAST) algoritmus alkalmazásával futtattuk le.

A szekvenciákat a CLC Main Workbench 7.6.4 (CLC Bio) program segítségével szerkesztettük, szükség esetén javítottuk, majd az adatbázisban található szekvenciák alapján megállapítottuk a kódoló és nem kódoló régiókat. A szekvenciák sokszoros illesztését (multiple alignment) a MAFFT 7 program segítségével végeztük L-INS-i módszerrel (Kato és mtsai. 2002, 2005).

A filogenetikai elemzéseket a BEAST v2.3.2 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) programcsomag segítségével végeztük (Drummond és mtsai. 2012), amely a bayesi parszimónia módszeren alapszik. Az elemzések során a HKY85 (Hasegawa, Kishino és Yano) DNS szubsztitúciós modellt alkalmaztunk (Halpern és Bruno 1998), a MCMC (Markov chain Monte Carlo, Markov-lánc Monte Carlo) lánc 10 millió generációból állt, amelyből minden 10 ezrediket tároltuk. 40%-os burn in aránnyal és 70%-os támogatottsággal készítettük a filogenetikai ábrákat (Gelfand és Smith 1990).

Az interspecifikus és intraspecifikus diverzitást a CLUSTAL O (1.2.1) többszörös szekvencia illesztésének alkalmazásával számítottuk, ahol a programcsomag az illesztést követően automatikusan választja ki a páronkénti összehasonlításhoz legmegfelelőbb mátrixot (Sievers és mtsai. 2011).

3.2.3.5. A rezisztencia molekuláris hátterének elemzése

A fungicidekkel szemben mutatott rezisztencia molekuláris hátterének vizsgálata során a *tub2*, *cyp51* és *cyt* gének szekvencia sorrendjét vizsgáltuk, mert az ezekről a génekről átíródó fehérjékhez képes kötődni a fungicid hatóanyaga. A génekben olyan mutációkat kerestünk, amelyek felelősek lehetnek a hatóanyag kötődési helyének megváltozásához, ezáltal érzékenységsökkenést vagy rezisztenciát alakít ki.

A vizsgálatokhoz az izolátumokat agarlemezen mutatott érzékenységük alapján választottuk ki. Minden fungicid vizsgálatához az adott készítményre érzékeny és rezisztens izolátumok DNS szekvenciáit hasonlítottuk össze, külön figyelmet fordítva az irodalmakban szereplő rezisztenciát kialakító változások jelenlétének vizsgálatára.

A benzimidazol rezisztencia kapcsán a β -tubulin gén E198A, H6Y és L240F allélját, valamint a génszakaszban bekövetkező egyéb változásokat vizsgáltuk. A citokróm b génjének a G137R, az F129L és a G143A allélját, valamint a kódoló régió egyéb helyein kialakuló mutációkat vizsgáltuk a strobilurin rezisztenciához kapcsolódóan. A 14 α -demetiláz enzim génjében a Y136F allél mutációját, valamint a teljes kódoló régió szekvenciáját vizsgáltuk a triazol rezisztencia kialakulása kapcsán, valamint a gén promóterében található Mona genetikai elem jelenlétét.

3.2.4. Statisztikai módszerek

Az eredmények statisztikai kiértékelésére az IBM-SPSS 22 programcsomagot használtuk (9. táblázat). Összehasonlító vizsgálataink során a hagyományos, paraméteres módszereket (egytényezős varianciaanalízis, Analysis of Variance, ANOVA) alkalmaztunk. Néhány esetben az adatok normalitása, valamint a szóráshomogenitás sérült, ezért a nekik megfelelő nemparaméteres módszer (Kruskal-Wallis Teszt) használata is indokolt volt, melyhez a *Monilinia* fajokat abc-sorrendben kódokkal láttuk el: *M. fructicola* (1), *M. fructigena* (2), *M. linhartiana* (3), *M. laxa* (4), *M. polystroma* (5). Az összehasonlításokat 95%-os szignifikancia szinten végeztük.

9. táblázat: A statisztikai analízisek során felhasznált módszerek

Vizsgált paraméter	Statisztikai próba	Post Hoc teszt
Fajok megjelenésének gyakorisága a különböző években	Kruskal-Wallis Teszt	Tukey
<i>M. linhartiana</i> izolátumok konídiumainak hosszúsága	1 mintás ANOVA	Tukey
<i>M. linhartiana</i> izolátumok konídiumainak szélessége	1 mintás ANOVA	Tukey
<i>M. linhartiana</i> izolátumok diszjunktórainak hosszúsága	1 mintás ANOVA	Games-Howell
Fungicidek hatása közötti különbség	Kruskal-Wallis Teszt	Games-Howell
Fungicidek hatása közötti különbség a MLH izolátumok vizsgálata során	Kruskal-Wallis Teszt	Games-Howell
A tiofanát-metil hatékonysága a <i>Monilinia</i> fajokra	Kruskal-Wallis Teszt	Games-Howell
A tebukonazol hatékonysága a <i>Monilinia</i> fajokra	1 mintás ANOVA	Games-Howell
A ciprodinil hatékonysága a <i>Monilinia</i> fajokra	Kruskal-Wallis Teszt	Games-Howell
A ciprodinil 10x hatékonysága a <i>Monilinia</i> fajokra	1 mintás ANOVA	Games-Howell
A piraklostrobin hatékonysága a <i>Monilinia</i> fajokra	Kruskal-Wallis Teszt	Tukey
A boszkalid hatékonysága a <i>Monilinia</i> fajokra	1 mintás ANOVA	Tukey

A kórokozók izolálásának gyakoriságát év (év: 2013, 2014, 2015) faktorra végeztük. A *M. linhartiana* izolátumok konídiumláncainak elemzése során a konídiumok hosszúságát, átmérőjét és a diszjunktorkok hosszát izolátum (izolátum: MLH1, MLH2, MLH3, MLH4, MLH5) faktorra, a fungicidek hatékonyságának elemzése során faj faktorra (faj: *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. linhartiana*, *M. laxa*, *M. polystroma*) elemeztük.

Az adatok hibatagjainak normális eloszlását, abban ez esetben fogadtuk el, amennyiben a ferdeség és csúcsosság értékek 1 és -1 közé estek (Tabachnick és Fidell 2007). A konídium átmérő hibatagjai nem mutattak normális eloszlást így az adatokat transzformáltuk a Box és Cox féle módszer alapján, $\lambda = -0,8$ kitevővel módosítottam az adatokat (Box és Cox 1964). A normalitást a transzformált értékek hibatagjainak ferdeség és csúcsosság értékei alapján fogadtuk el. A csoporton belüli varianciák egyezőségét a Levene-teszttel ellenőriztük, vagy a faktor csoportjain belüli szórásnégyzetek hányadosa alapján vizsgáltuk (Tabachnick és Fidell 2007).

A varianciaanalízist kiegészítő középérték összehasonlító tesztek közül a Tukey-féle szignifikáns differencia post hoc analízist végeztük, létrehozva az izolátumok (évek, izolátumok, fajok) homogén csoportjait a konídium méretük (faj gyakoriság, konídium méret, növényvédő szerekre való érzékenységek) alapján (Tukey 1962). Szükség esetén a szórások azonosságát nem feltételező Games-Howell próbát alkalmaztuk (Ruxton és Beauchamp 2008).

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szabadföldi felmérések

4.1.1. *Monilinia* fajok dominanciája csonthéjasokon

Három év alatt összesen 556 alkalommal izoláltunk *Monilinia* fajt csonthéjas gazdanövényekről (2. melléklet). Az izolátumok elhalt virágok, hajtások és vesszők felületéről, hajtások belső szövetéből, zsendülő és érett gyümölcsökről, valamint az előző évben a termővesszőkre száradt gyümölcsmúmiák felületéről származtak. Összesen 165 alkalommal történt mintavétel. A 10. táblázatban található évekre lebontva a begyűjtött minták száma. Arra törekedtünk, hogy a minták nagyobb részét ültetvényekből gyűjtsük, így a mintavételi helyek közel 70%-át növényvédelem alatt álló gyümölcsösök adták.

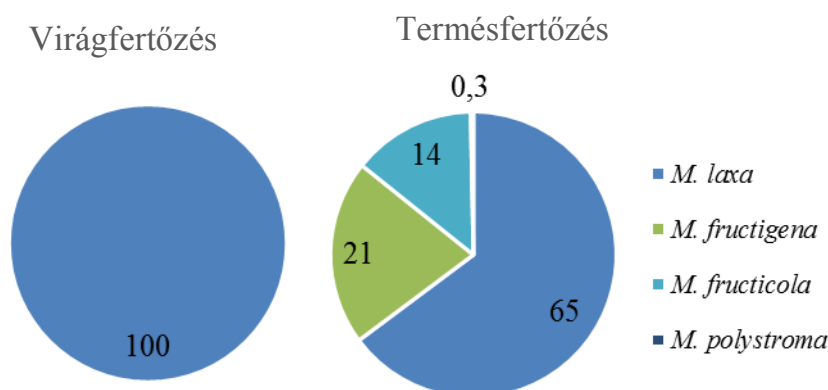
10. táblázat: A mintagyűjtések száma a három évben

Év	Hajtásminták száma (db)	Gyümölcsminták száma (db)
2013	85	147
2014	35	106
2015	83	100
Összesen	203	353

Megoszlás a fertőzés ideje szerint

A tavaszi időszakban az elhalt virágokról, hajtásokról és vesszőkről kizárólag a *M. laxa* kórokozót izoláltuk (11. ábra). A nyár folyamán a *M. fructicola* fajt is izoláltuk fásodó hajtásokról, vesszőkről. Ezekben az esetekben egyértelműen a gyümölcsökről terjed tovább a kórokozó hajtásokba, így azokat a nyáron a termésen károsító esetek közé soroltuk.

A gyümölcsökön leggyakrabban szintén a *M. laxa* fajt volt jelen, a fertőzések közel 2/3-át (65%) okozta. Valamennyi izolálást figyelembe véve, a mintavételezés alapján, hazánkban a *M. fructigena* (21%) gyakoribb, mint a *M. fructicola* (14%). A *M. polystroma* faj hazánkban igen ritka, mindössze egyetlen alkalommal izoláltuk csonthéjas gazdanövényről, amely az összes termésfertőzés kevesebb, mint 0,5%-át teszi ki (11. ábra).

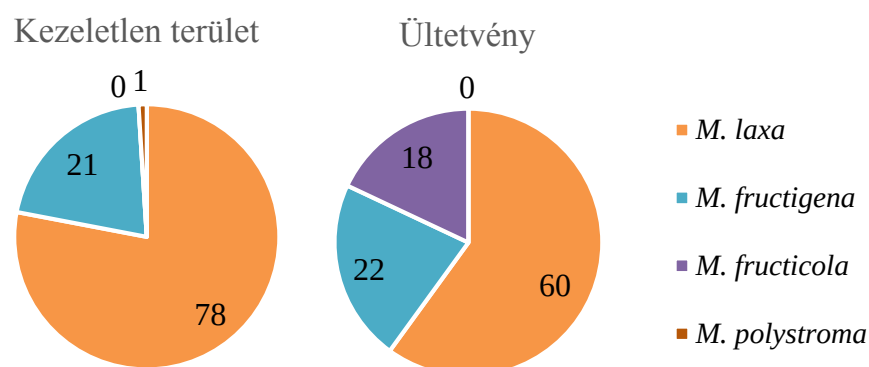


11. ábra: *Monilinia* fajok fertőzésének megoszlása (%-ban kifejezve) csonthéjasokon a virágzás és a gyümölcsérés időszakában

Megoszlás a származási hely szerint

A gyümölcsökön eltérő gyakorisággal jelennek meg a *Monilinia* fajok, attól függően, hogy ültetvényekből vagy kezeletlen területekről származnak a minták. Kezeletlen területeken a legjelentősebb kórokozó a *M. laxa*, a fertőzések több, mint háromnegyedéért felelős (12. ábra). A *M. laxa* mellett a *M. fructigena* van jelen, ez a gomba okozza a megbetegedések egyötödét. A két őshonos faj mellett a *M. polystroma* kórokozót is izoláltuk egy házikerti gyümölcsfa terméséről.

Az ültetvényekben szintén a *M. laxa* a leggyakoribb faj, a növényvédelem alatt álló területeken az esetek 60%-ában ez a gomba okozta a gyümölcsrothadást (12. ábra). A *M. fructigena* az ültetvényekben hasonló gyakorisággal (22%) van jelen, mint kezeletlen területeken (21%). Ültetvényekben a *M. fructicola* kórokozó gyakorisága hasonló a *M. fructigena* fajéhoz. Vizsgálataink során a *M. fructicola* fajt kizárólag üzemi növényvédelem alatt álló területekről azonosítottuk.



12. ábra: *Monilinia* fajok dominanciája (%-ban kifejezve) ültetvényekből és kezeletlen gazdanövényekről származó minták esetén

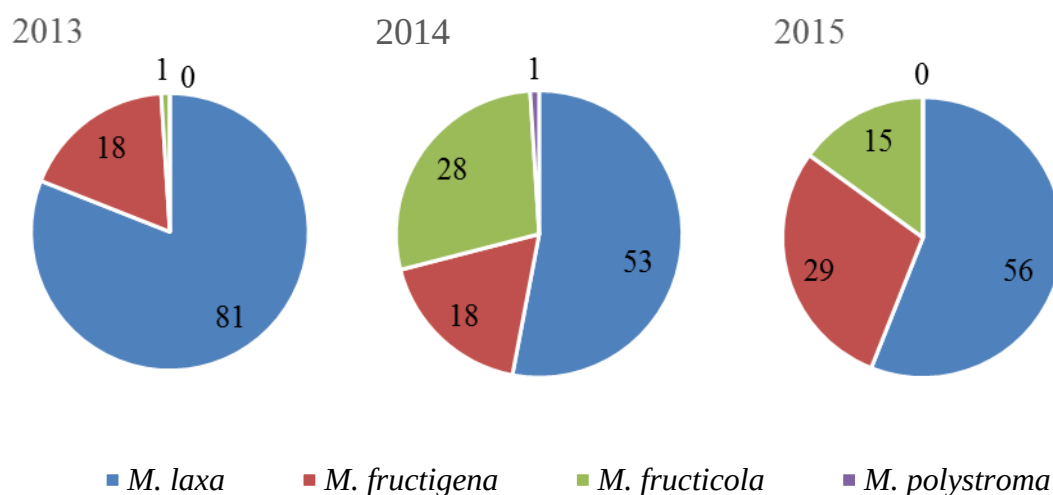
Megoszlás a gazdanövény szerint

A *M. laxa* kórokozó leggyakrabban a kajszí és meggy virágait, hajtásait és vesszőit betegítette meg, de izoláltuk szilva, valamint díszfa (*Prunus subhirtella* 'Autumnale', *Prunus* 'Acclade') és díszcserje fajok (*Prunus triloba* 'Multiplex', *Prunus tenella*) növényi részeiről is. A kórokozó számos csonthéjas faj gyümölcsén volt jelen (2. melléklet). A *M. fructigena* kórokozót kiemelkedő gyakorisággal izoláltuk szilvatermésekről. A *M. fructicola* okozta megbetegedést leggyakrabban őszibarack és szilva esetében figyeltünk meg, de több alkalommal izoláltuk meggyről és nektarinról is a kórokozót. A *M. polystroma* fajt szilváról izoláltuk.

Megoszlás az évek szerint

Az évek során szignifikánsan eltérő gyakorisággal izoláltuk a *Monilinia* fajokat ($K(2)=33,6$; $p<0001$). 2014 (a) és 2015 (a) között nem mutatható ki szignifikáns különbség, viszont 2013-as évből származó izolátumok fajösszetétele (b) szignifikánsan különbözik a másik két év eredményeitől (13. ábra). A fertőzések legnagyobb hányadát mindhárom évben a *M. laxa* okozza. A *M. fructigena* a megbetegedések egyötödéért- egynegyedéért felelős. A fajok megoszlásában megfigyelhető különbséget leginkább a *M. fructicola* megjelenésének gyakorisága befolyásolta.

A *M. fructicola* kórokozót az évek során változó gyakorisággal izoláltuk: 2013-ban 2 ültetvényből, 2014-ben 18 ültetvényből, míg 2015-ben 6 ültetvényből azonosítottuk a kórokozót. Ezek az ültetvények elsősorban Pest megyében találhatók, valamint a minták kereskedelmi forgalomba hozott gyümölcsökről származnak, melyeket budapesti vásárcsarnokokban és üzletekben vásároltuk, viszont pontos származásukat nem minden esetben tudtuk meg.



13. ábra: *Monilinia* fajok dominanciájának megoszlása 2013-2015 évek során

4.1.2. A *Monilinia fructicola* virágfertőzésének

A mindhárom termesztőterületen; Érd-Elvira majorban, Sós-kúton és Soroksáron is negatív eredménnyel zárultak a *Monilinia fructicola* kórokozó virágfertőzésének bizonyítására irányuló megfigyelések. Az őszibarack és szilva ültetvényekben nem figyeltünk meg a monilíniás betegség következtében elhaló hajtásokat 2015 tavaszán, kizárólag a kora tavaszi fagyok károsították néhány esetben a hajtásokat. A szomszédos meggy ültetvényekben feltételezhetően jelen voltak a *M. fructicola* szaporítóképletei, mert az előző nyáron súlyos károsítását figyeltük meg a közvetlen szomszédságban található őszibarack ültetvényekben. A meggy ültetvényekben számos hajtás és vessző mutatta a monilíniás betegség tüneteit, viszont a fertőzések 100%-át a *M. laxa* kórokozó okozta.

4.1.3. *Monilinia* fajok gyakorisága birsen

Birs gazdanövényről három *Monilinia* fajt azonosítottunk. Az érett termésekről és gyümölcsmúmiákról leggyakrabban a *M. fructigena* fajt izoláltuk, összesen 6 termőhelyről. Kizárólag egy alkalommal azonosítottuk a *M. laxa* kórokozót, törökbálinti gyümölcsmúmiákról izoláltuk a fajt. Tavasszal a levelekről a *M. linhartiana* fajt 4 termőhelyről izoláltuk hazánkban, valamint egy törökországi hajtásmintáról is ezt a kórokozót azonosítottuk.

4.2. *Monilinia* fajok okozta tünetek

4.2.1. Csonthéjasokon megjelenő tünetek

Leggyakrabban a *Monilinia* fajokra jellemző tüneteket figyeltünk meg: virág- és hajtáselhalást, valamint gyümölcsrothadást. A virágzás időszakában a kajszi és meggyvirágok elszáradtak, majd a betegség továbbterjedt a hajtásba, vesszőkbe és azok elhalását okozta. Néhány esetben már a meggy és kajszi bimbók is fertőződtek, elhaltak, majd felületükön megjelentek a kórokozó szaporítóképletei. A 14. ábra/A ábrán a 2013/LX-1 kóddal jelölt *M. laxa* izolátum berencsei 'Ceglédi Óriás' kajszi bimbóján okozott tünetei láthatóak. Megfigyeltük a fiatal kötődött meggytermések egyedi fertőződését is, amely során a 0,5-1 cm-es zöld termés elbarnult, felületén megjelentek a kórokozó exogén sztrómái, majd a fertőzés a kocsányon keresztül terjed tovább a fás fészkek felé (14. ábra/B, 2015/ML-1 izolátum). Az érett termések megbetegedésekor a rothadó folt legtöbbször egy pontból indult ki, de megfigyeltünk olyan terméseket is ahol, több pontból indult a fertőzés és ezt két különböző *Monilinia* faj okozta.

Egyes estekben azonban kevésbé szokványos tünetek figyeltünk meg, a továbbiakban ezeket mutatom be.

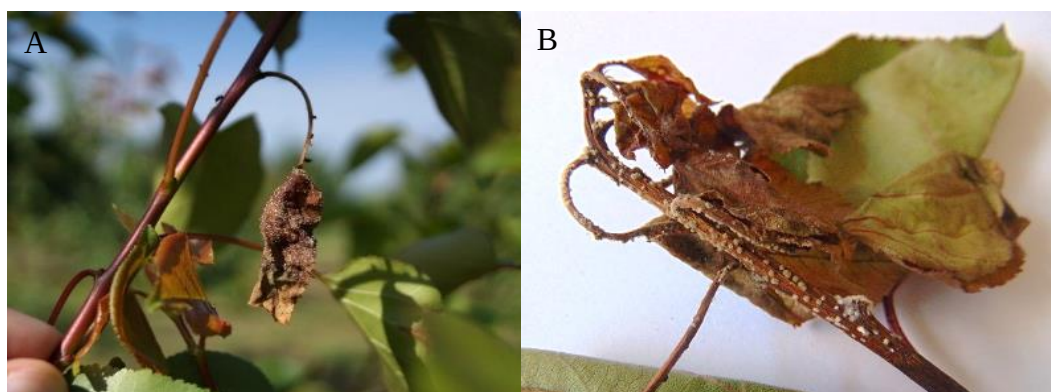


14. ábra: Monilíniás betegség következtében elhalt kajszi bimbó Berencsen (A) és zsendülő meggytermések egyedi fertőződése Soroksáron (B) (fotó: Lantos 2013, 2015)

4.2.1.1. *Monilinia laxa* okozta őszi hajtásfertőzés

A *M. laxa* tavaszi virágfertőzése nyomán bekövetkező virág- és hajtáselhalás közismert. Néhány esetben azonban a hajtásnövekedés lezárulta után, nyár végén vagy ősszel is megfigyeltünk újonnan kialakuló hajtáselhalást. A fásodó hajtások a hajtáscsúcstól kezdődően 15-30 cm hosszúságban elhaltak, majd a leveleken és a hajtáson megjelentek a kórokozó exogén sztrómái (15. ábra).

2014-ben Gyulán kajszi ültetvényben figyeltük meg a tünetet augusztus közepén, 10-12 éves fákön (2014/ML-19 izolátum). 2015-ben Pomáz melletti ültetvényben egyéves 'Ceglédi Piroska' és 'Roboda' oltványokon jelentek meg a tünetek (2015/ML57, 2015/ML58 izolátum), a szomszédos 'Ceglédi bíbor', 'Bergerouge', 'Harcot' és 'Gönci magyarkajszi' fajták nem károsodtak. A 'Ceglédi Piroska' fajtán csak elvétve alakultak ki a tünetek, míg a 'Roboda' fákön súlyos hajtáselhalást figyeltünk meg.



15. ábra: *Monilinia laxa* fertőzése következtében elhaló fásodó kajszi hajtások Gyulán (A) és Pomázon (B) (fotók: Ágoston 2014, Lantos 2015)

4.2.1.2. *Monilinia fructicola* okozta hajtás és vesszőtünetek a termésérés időszakában

A *M. fructicola* 2014-ben járványos megbetegedést okozott az őszibarack ültetvényekben. A szüret előtti néhány hétben több Pest megyei ültetvényben is súlyos gyümölcsrothadást figyeltünk meg. Előrehaladott tüneteket figyeltünk meg a sóskúti ültetvényben 'Redcal', 'Michelini' és 'Babygold 6' fajtákon (16. ábra/A), Érd-Elvira majorban 'Redhaven', 'Suncrest' és 'Cresthaven' fajtákon, valamint Soroksáron a fajtagyűjteményben (16. kép/B).

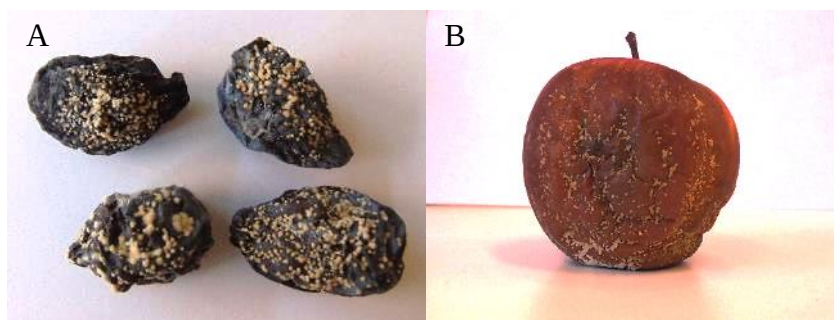
A fertőzött termésekben a kórokozó gyorsan terjedt, a termés néhány nap alatt teljesen elrothadt. Exogén sztrómák a termések felületén igen nagy mennyiségben képződtek, a legtöbb esetben mogorósbarna színű összefüggő bevonatot alkotva termés egészén. A fertőzött gyümölcsök közelében elszáradó leveleket figyeltünk meg, a betegség könnyedén áterjed a szomszédos gyümölcsökre. A kórokozó gyakran tovább terjedt a vesszőbe, aminek a következtében a vesszők 30-40 cm-es hosszúságban elszáradtak, elhaltak. Gyakran az elhalt vesszőkön is intenzív sporulációt jelentkezett (16. ábra/C).



16. ábra: A *Monilinia fructicola* kártételének tünetei őszibarack ültetvényekben Sós-kúton (A) és Soroksáron (B), a sporuláció a fertőzött vesszőkön is megjelent (C)
(fotók: Nagy 2014, Lantos 2015)

4.2.1.3. A *Monilinia polystroma* okozta gyümölcsrothadás

A *M. polystroma* terméseken okozott tünete igen hasonló a *M. fructigena* faj által okozottakhoz. A termések felületén sárgásbarna színű sztrómák jelennek meg, alattuk a szövetek barna színűre színeződnek, rothadnak (17. ábra). Hazánkban elsőként izoláltuk a kórokozót szilva gazdanövényről (2014/PS-36 izolátum), valamint érett almatermésekről (2015/PS-32 izolátum).



17. ábra: *Monilinia polystroma* tünetei mesterségesen fertőzött gyümölcsökön
(fotók: Lantos 2015)

4.2.2. Birsen megjelenő tünetek

4.2.2.1. *Monilinia linhartiana* okozta hajtáselhalás

A birsleveleken április végén, május elején jelentek meg a jellegzetes tünetek. A fiatal levelek gyakran még nem érték el a kifejtett méretet, amikor a levél alapjától induló elhalás jelent meg rajtuk. A nekrosis háromszög alakban terjedt a csúcs felé, a levéllemez vörösbarnára vagy barnásszürkére színeződött. A színi oldalon, az elhalt szövetek felületén szürkésfehér bevonat jelent meg, melyet a kórokozó szaporító képletei alkottak. A konídiumláncok a levélnyélhez közel jelentek meg először, majd a főér és a nagyobb erek mentén alakultak ki. A fertőzés tovább terjedt a hajtásokba, a hajtás, vessző és a rajtuk található további levelek elhalását okozva, viszont ezeken a növényi részeken nem jelent meg a főtünet. A virágokon elváltozást nem figyeltünk meg (18. ábra).



18. ábra: A *M. linhartiana* tünetei birslevélen (A), valamint a fertőzés nyomán kialakuló hajtáselhalás (B) (fotók: Oláh 2013, Lantos 2014)

4.2.2.2. Termésrothadás

Az érett terméseken leggyakrabban a *M. fructigena* károsított. A fertőzött birseken barna rothadó folt jelent meg, amely idővel az egész termésre kiterjedt. A gyümölcsök felületén megjelentek a kórokozó sárga színű exogén sztrómái, amelyek jellegzetesen koncentrikus körökbe rendeződtek. A *M. laxa* kórokozót gyümölcsmúmiáról azonosítottuk. Az előző évben a hajtásra száradt gyümölcs felületén a *M. laxa* szürke exogén sztrómái mellett más kórokozók szaporítóképletei is megjelentek.

4.3. *Monilinia* fajok azonosítása

4.3.1. *Monilinia* fajok morfológiai- és tenyészbélyegei

Az exogén sztrómák és konídiumok jellemzői

A csonthéjasokon kialakuló virág- és hajtáselhalás esetén, leggyakrabban az elszáradt virágok csészelevelein és bibéjén jelentek meg az exogén sztrómák. Néhány esetben a fiatal hajtásvégeken és a fejlődő leveleken is megfigyeltük képződésüket (19. ábra). Birshajtásokon az elsődlegesen fertőződött leveleken figyeltük meg a konídiumlánc bevonat megjelenését. A hajtásokon, valamint a hajtáselhalás következtében elszáradó leveleken nem alakultak ki.

Az érető és érett gyümölcsök felszínén szinte minden esetben kialakultak az exogén sztrómák, felületükön a konídiumláncok bevonatával. A sztrómák 0,5-1 mm nagyságúak, barnás, sárgás vagy szürkés színűek voltak, de a fajokat nem tudtuk ez alapján egyértelműen meghatározni.

A *Monilinia laxa* és *M. fructicola* sztrómái kisebbek, mint a *M. fructigena* és *M. polystroma* sztrómái (19. ábra). A *M. laxa* exogén sztrómái szürke színűek, általában nem képződnek olyan nagy mennyiségben, mint a *M. fructicola* esetében. A *M. fructicola* faj által fertőzött termések felületét a barnásszürke exogén sztrómák, szinte egybefüggő bevonatot alkotva, borítják be. A *M. fructigena* sztrómái nagyobbak, okkersárga színűek. Az általunk izolált *M. polystroma* exogén sztrómái is hasonló megjelenésűek, színük és méretük alapján nem különíthetők el a *M. fructigena* fajtól.

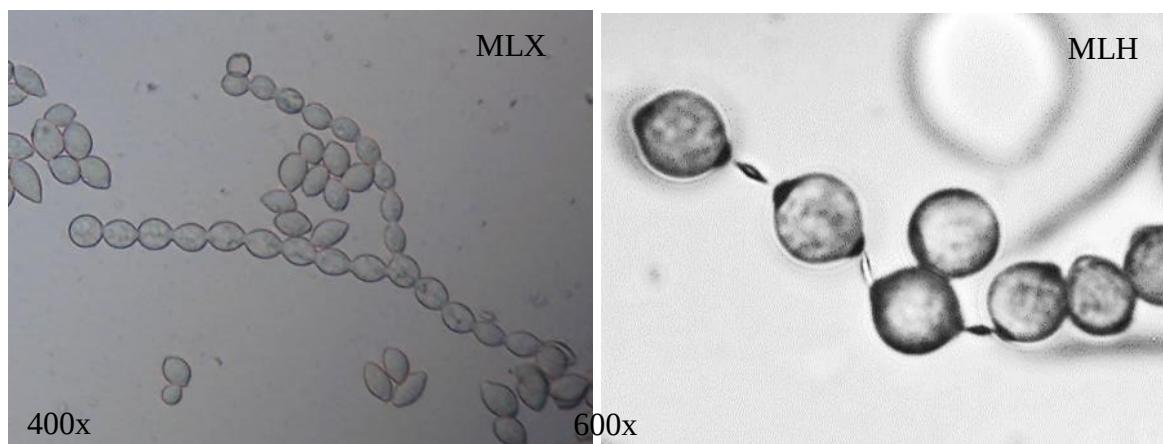


19. ábra: *Monilinia* fajok sztrómái a fertőzött növényi részekén: *M. linhartiana* (MLH), *M. laxa* (MLX), *M. fructigena* (MFG), *M. fructicola* (MFC) és *M. polystroma* (MPS)
(fotók: Lantos 2014-2015)

A *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola* és *M. polystroma* fajok konídiumláncában a konídiumok közvetlenül érintik egymást, közöttük diszjunktork nem képződtek (20. ábra). A konídiumok egyséjtűek, hialinok, citrom alakúak voltak, hosszúságuk 5-20 μm között változott.

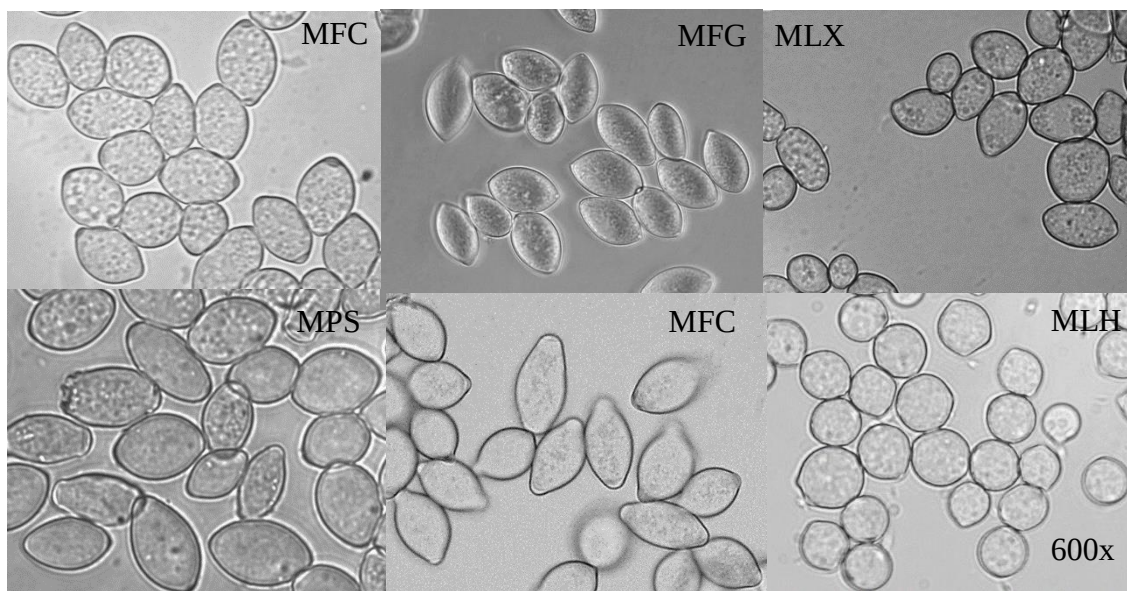
A *M. linhartiana* konídiumláncában a konídiumok között módosult konídiumokat, diszjunktorkat figyeltünk meg (20. ábra). Egy diszjunktork két konídiumot köt össze, alakja orsószerű, a közepén kiszélesedő. A konídiumok közel gömb alakúak, két végük kidudorodik, a *Junctionariae* csoport hosszúkas konídiumaitól jól elkülöníthetők (21. ábra). A *M. linhartiana* izolátumok konídiumainak átlagos méretei a 11. táblázatban találhatók. A MLH1 izolátum konídiumai szignifikánsan nagyobbak a többi izolátuménál (hosszúsága: $F(4,433)=34,40$;

$p < 0,001$, átmérője: $(F(4,431)=37,14; p < 0,001)$. MLH5-ös török izolátum diszjunktora szignifikánsan hosszabbak a magyar izolátumokénál $(F(4,89)=342,9, p < 0,001)$, melyek hossza egyes esetekben elérte a $4,9 \mu\text{m}$ -t.



20. ábra: *Monilinia* fajok konídiumláncai. A fajok egy részénél a konídiumok közvetlenül érintik egymást (pl. *Monilinia laxa*: MLX), míg a diszjunktoros fajok esetén kis módosult konídiumok találhatóak a makrokonídiumok között (pl. *Monilinia linhartiana*: MLH)

(Fotók: Lantos 2014-2015)



21. ábra: *Monilinia* fajok konídiumai: *M. linhartiana* (MLH), *M. laxa* (MLX), *M. fructigena* (MFG) és *M. fructicola* (MFC) (Fotók: Lantos 2013-2015)

11. táblázat: A *M. linhartiana* izolátumok konídiumainak átlagos mérete és a tenyészetek átlagos növekedése PDA táptalajon

Izolátum	Konídium átl. hosszúsága (μm)*	Konídium átl. átmérője (μm)*	Diszjunktor átl. hosszúsága (μm)**	Tenyészet átl. növekedése (mm/nap)
MLH1	14,2 (d)	13,8 (b)	2.5 (a)	5,6
MLH2	10,4 (a)	10,5 (a)	2.3 (a)	5,0
MLH3	11,4 (ab)	10,1 (a)	3.5 (b)	3,2
MLH4	11,9 (bc)	10,3 (a)	3.7 (b)	2,9
MLH5	12,8 (c)	9,8 (a)	4.6 (c)	2,1

A statisztikai elemzést 1 mintás ANOVA próbával végeztük. Szignifikáns különbség az eltérő betűvel jelölt értékek között mutatható ki a Tukey* és Games-Howell** post hoc tesztek alapján

Tenyészbélyegek

Jellegzetes tenyészbélyegeket figyeltünk meg a különböző fajok esetén PDA táptalajon, melyek alapján az izolátumok a legtöbb esetben azonosíthatóak voltak (22. ábra).

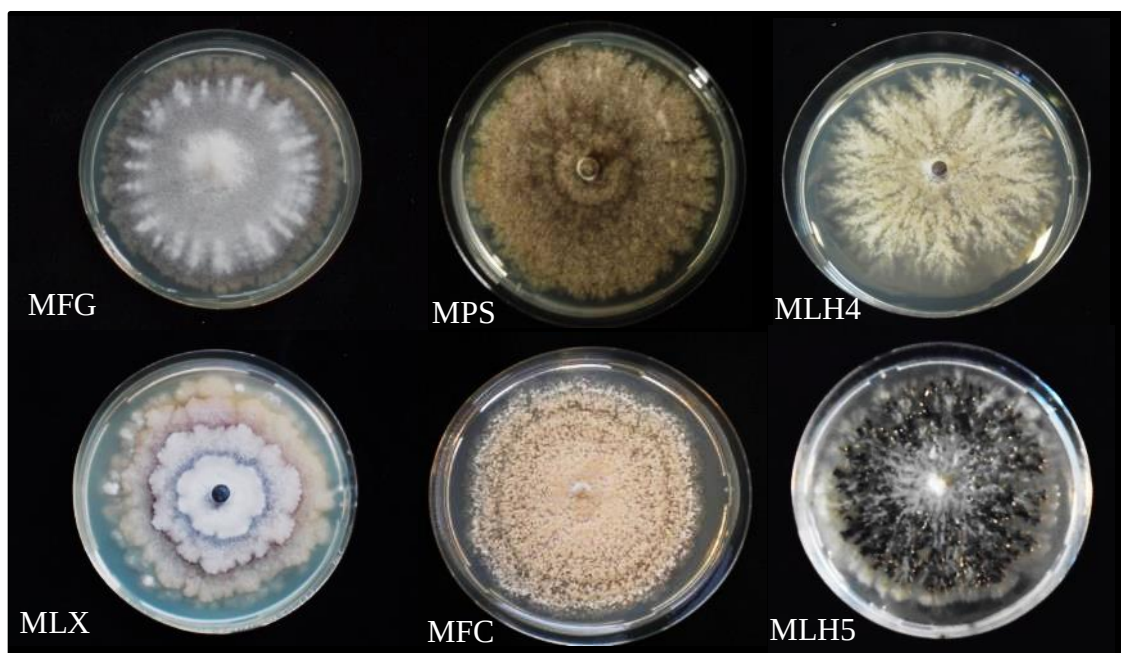
A *Monilinia laxa* tenyészei a leoltási pont körül rozettáltan növekedtek, színük kezdetben világossárga volt, majd néhány hét elteltével barnásra színeződtek. Az izolátumok színe a világosbarnától a szürkésbarnán át a sötétbarnaig változott. Felületükön gyér légmicélium bevonat alakult ki. Konídiumok nem képződtek a tenyészetekben, csak néhány esetben, az idős tenyészetekben (~3 hónapos) figyeltünk meg konídium képződést. A kolóniák átlagosan 3,4 mm-t növekedtek naponta.

A *M. fructigena* tenyszei sugárirányban növekedtek, színük kezdetben fehéressárga volt, majd világosbarnára színeződtek. Felületükön gyenge légmicélium képződést figyeltünk meg. Néhány esetben már a fiatal tenyészetekben képződtek konídiumok közvetlenül a leoltási pont körül. A tenyészetekben néhány hét elteltével sötétbarna, fekete foltok alakultak ki, ezek a sztromatikus képletek gyakran koncentrikus körökbe rendeződtek. A kórokozó tenyszei a *M. laxa* kórokozónál lassabban fejlődtek (átlagosan 3,1 mm/nap).

A *M. fructicola* tenyszei körkörösén növekedtek a leoltási pont körül. Színük kezdetben szürkésárga volt, majd gyorsan sötétedtek, egyes tenyészetek feketés színűre színeződtek. Légmicélium nem képződött felületükön, viszont a leoltás utáni 5 napon belül koncentrikus körökben intenzív sporulációt figyeltünk meg. A *M. fructicola* tenyszei fejlődnek a leggyorsabban (átlagosan 4,2 mm/nap).

A *M. polystroma* tenyszeinek szerkezete hasonlított a *M. fructigena* fajéra, viszont a tenyészetben igen nagy mennyiségű sztromatikus képlet alakult ki, már a leoltást követő 5-7 napon belül. A *M. fructigena* izolátumok esetében kevesebb sztromatikus képlet képződött és az is

kizárólag az idős (legalább 3 hetes) izolátumokban jelent meg. A telepek szerkezete sugaras volt, konídiumok nem képződtek a felszínén, átlagos növekedési üteme 4,5 mm/nap volt.



22. ábra: A *M. laxa* (MLX), *M. fructigena* (MFG), *M. fructicola* (MFC), *M. polystroma* (MPS) és *M. linhartiana* (MLH) fajok jellegzetes tenyészbélyegei PDA táptalajon (fotók: Lantos 2013-2015)

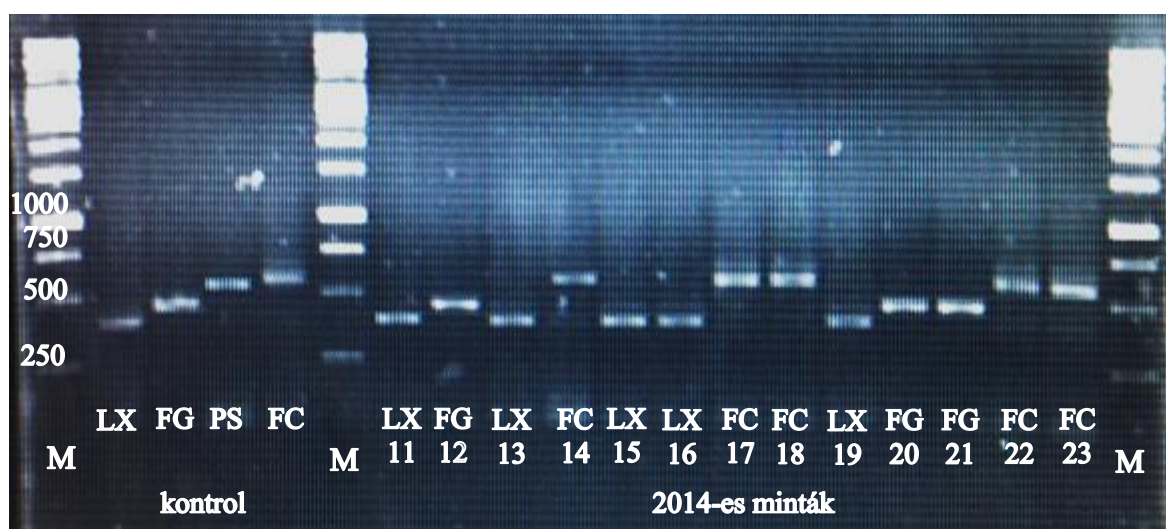
A *M. linhartiana* izolátumai PDA táptalajon sugarasan növekedtek, színük világossárga, fehér, felületükön gyér micélium bevonat képződött. A tenyészetek alapszíne hetek elteltével is világossárga maradt, viszont apró sztromatikus képlet kezdemények jelentek meg benne. Ezek jellemzően az idősebb részekben, elszórtan alakultak ki, nem körkörös, mint a *M. fructigena* tenyészetek esetében. A magyar izolátumok sztromatikus képletei világos vagy sötétbarna, míg a török (MLH5) izolátumnál fekete színűek. A kórokozó növekedési üteme PDA táptalajon átlagosan 3,8 mm/nap volt (11. táblázat). LMA és MEA táptalajon jellegtelen tenyészetek fejlődtek. LMA táptalajon a tenyészetek krémszínűek, a leoltási pont körül sötétebb barna színezettel. A tenyészeteknél mintázottság, ill. jellegzetes struktúra nem alakult ki, színükön fehér nemezes légmicélium képződött. A tenyészetek növekedési üteme 3,5-3,7 mm/nap között változott. MEA táptalajon a tenyészet színe élénk narancssárga volt, a leoltási pont körül sötétbarna gyűrűvel. A tenyészetben gyér légmicélium képződést figyeltünk meg. A tenyészetek növekedési üteme ezen a táptalajon 3-3,4 mm/nap között változott.

4.3.2. *Monilinia* fajok szekvenciaalapú azonosítása és rokonsági viszonyai

4.3.2.1. Izolátumok azonosítása a polimorf régió alapján

A molekuláris azonosítása során az izolátumokat egy ismeretlen funkciójú, nem kódoló genomi régió hossza alapján azonosítottuk, ezzel megerősítve a tenyészbélyegek alapján történő azonosítás eredményét. A primerpár specifikusan működött, különböző hosszúságú fragmentumokat kiemelve az egyes fajokból (23. ábra). A módszerrel arról is megbizonyosodtunk, hogy tenyészeink tiszták, nincs közöttük kevert tenyészet.

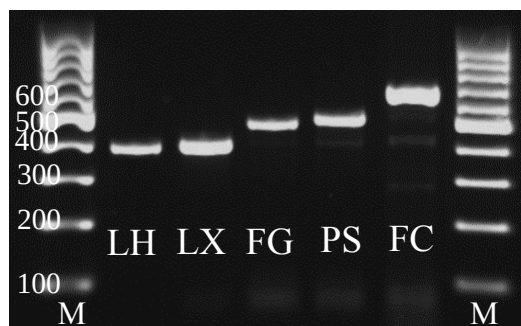
A *Monilinia linhartiana* kórokozó esetében a régióból nem állt rendelkezésre szekvencia adat a nemzetközi adatbázisban, amihez hasonlíthattuk volna a PCR termékünk bázissorrendjét, így mind a 4 magyar izolátum esetében meghatároztattuk a szekvenciát, amely minden esetben 341 bp-t tartalmazott. Három *M. linhartiana* izolátum szekvenciája egymással 100%-os egyezést mutatott, míg az MLH2-es izolátum 3 bázisban különbözött, a 10, 49, 98-as pozícióban található nukleotidokban. A bázissorrendet összehasonlítottuk az NCBI adatbázisában szereplő más fajok szekvenciáival: *M. laxa* (FM994902), *M. fructicola* (FM994904), *M. fructigena* (AM937119), *M. polystroma* (AM937120). A hasonlóságok alapján bebizonyosodott, hogy a polimeráz láncreakció a *M. linhartiana* fajból is ugyanazt a polimorf szakaszt sokszorozta meg. A kórokozó bázissorrendje a *M. laxa* faj szekvenciájával mutatta a legnagyobb hasonlóságot. A *M. laxa* polimorf régiója 1 bázissal hosszabb, mint a *M. linhartiana* fajú (24. ábra), és azzal 98%-os egyezőséget mutatott.



23. ábra: A 2014-ben gyűjtött izolátumok azonosítása PCR segítségével, a polimorf régió hosszúsága alapján 250 bp léptékű molekulásúly marker mellett, 1%-os agaróz gélben megfuttatva

A polimorf szakasz hosszúsága az egyes fajok esetében (primerek nélkül):

- *M. linhartiana*: 341 bp
- *M. laxa*: 342 bp
- *M. fructigena*: 360 bp
- *M. polystroma*: 376 bp
- *M. fructicola*: 537 bp



24. ábra: *Monilinia* fajok elválasztása polimorf régió alapján 100 bp léptékű molekulásúly marker mellett, 2,5%-os agaróz gélben megfuttatva. LH: *M. linhartiana*, LX: *M. laxa*, FG: *M. fructigena*, PS: *M. polystroma*, FC: *M. fructicola*

4.3.2.2. Azonosítás az ITS régió és 28S rDNA gén alapján

A primerpár az ITS régióból 1114-1116 bázis hosszúságú szakaszt sokszorozott meg. A szakasz a primerek között a 18S riboszomális gén utolsó 31 bázisát, a 147-149 bp hosszúságú ITS1 régiót, a 158 bp hosszúságú 5,8S riboszomális gént, a 143 bp hosszúságú ITS2 régiót és 28S riboszomális gén 637 bázisát emelte ki. A *M. polystroma* és *M. linhartiana* fajok esetében indokoltnak tartottuk az izolátumok szekvencia alapú azonosítását és jellemzését is, amely során a nemzetközi adatbázisban található referencia izolátumokhoz hasonlítottuk saját szekvenciáinkat, amelyhez az ITS1-5,8S rDNS-ITS2 régiót és a 28S rDNA gén egy szakaszát használtuk fel.

Az ITS1-5,8S rDNS-ITS2 régió szekvenciája alapján a *M. polystroma* izolátumok az adatbázisban található többi *M. polystroma* izolátummal 100%-os azonosságot mutattak. A *M. fructigena* izolátumoktól 5 bázisban különböztek, melyek közül 4 bázis szubsztitúció az ITS1 régióban, míg egy az ITS2 régióban található (25. ábra).

A magyar *M. linhartiana* izolátumok a más almatermésűeken károsító fajokkal mutatták a legnagyobb rokonságot az ITS1-5,8S rDNS-ITS2 szakaszon, de a filogenetikai analízis alapján csak a magyar izolátumok egy része mutatta a legnagyobb hasonlóságot az adatbázisban szereplő két külföldi *M. linhartiana* izolátummal. A MLH3 és MLH4 ITS régiójának nukleinsav sorrendje megegyezik a spanyol izolátumokkal (HM581953, HM581954), míg az MLH5-ös 99,8%-os hasonlóságot mutatott. Az MLH3 és az MLH4 izolátumok, a *M. linhartiana* és a *M. aucupariae* izolátumokkal (Z73771, Z7377) is 99,1%-os hasonlóságot mutattak, viszont a filogenetikai analízis alapján a *M. aucupariae* fajjal közelebbi rokonságban állnak. A fajok egyértelmű molekuláris alapú meghatározását nehezíti, hogy ez a régiójuk igen hasonló: a 446-447 bp hosszúságú szakaszon mindösszesen 2-2 bázispár alapján választható el a *M. linhartiana* faj a *M. aucupariae* és *M. mali* fajoktól (25. ábra).

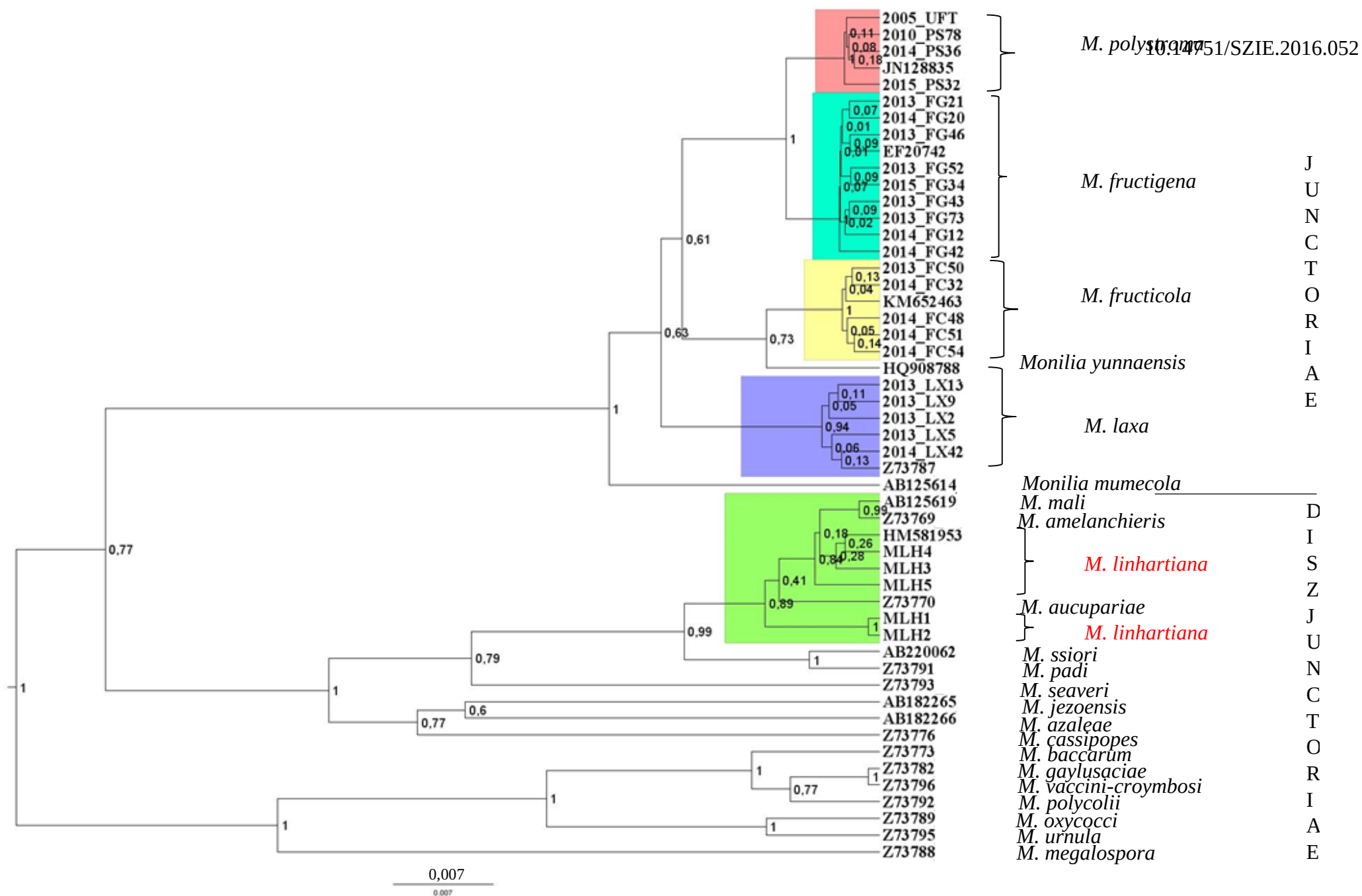
A 28S rDNS régióból 267 bp hosszúságú szakasz szerepel a legtöbb fajból a nemzetközi adatbázisban, viszont a *M. linhartiana* fajból nem állt rendelkezésre előzetes szekvencia adat, a *M. polystroma* fajból is csak a génkezdő 14 bázis szerepel, így a fajokat a közeli rokonságban álló fajok szekvencia sorrendjéhez hasonlítottuk (26. ábra).

A *Junctionariae* alcsoport fajainak szekvenciája ezen a szakaszon teljes egyezést mutatott. Az általunk meghatározott *M. polystroma* faj 28S rDNS génjének részlete szintén megegyezett a *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola* fajok génrészletének szekvenciájával. A *M. linhartiana* faj ez alapján a gén alapján egyértelműen elkülöníthető a *M. aucupariae* fajtól, igaz a két faj között csak 1 bázispárnyi különbség van.

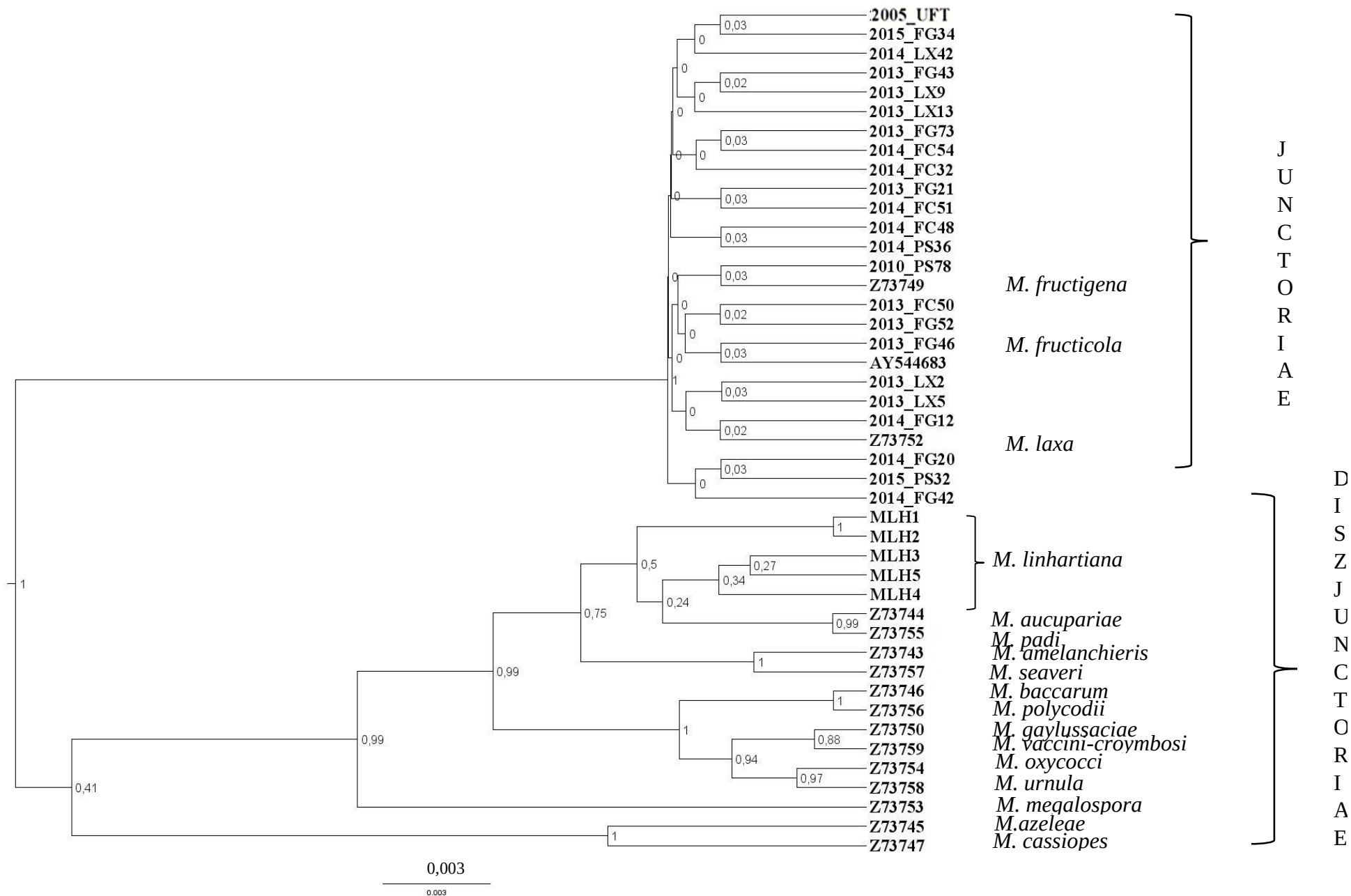
4.3.2.3. Az ITS régió és a 28 rDNA gén változékonysága

A riboszomális gének kisebb változékonyságot mutattak, mint a köztük található nem kódoló régiók. Az általunk meghatározott *Monilinia* izolátumok 18S és 5,8S rRNS génjei azonosak voltak, a 28S rRNS génben 22 bázis szubsztitúció volt jelen, melyek mindegyike az adott fajra jellemző. A *M. fructigena* izolátumok 1 bázisban különböztek a *Junctionariae* alcsoport többi tagjától, a 28S rRNS gén 137-es pozíciójában. A további 21 bázis szubsztitúció a *M. linhartiana* faj izolátumai és a *Junctionariae* alcsoport tagjai között figyelhető meg. Az öt *Monilinia* faj szekvenciájában ITS1 régióban összesen 23 szubsztitúció és 2 inzerció, az ITS2-ben összesen 18 szubsztitúció található.

A vizsgált izolátumok ITS régiójának szekvenciája fajon belül csak kis változékonyságot mutatott (12. táblázat). A *M. polystroma* izolátumok ITS régiójának szekvenciasorrendje azonos. Az öt *M. laxa* izolátum ITS régiója megegyezett, mindösszesen a 2013/LX13-as izolátum tartalmazott egy adenin deléciót az ITS1 régió 19-es pozíciójában. A 9 *M. fructigena* izolátum is azonosnak bizonyult, kizárólag a 2014/FG42-es izolátum tartalmazott 1 bázis szubsztitúciót az ITS1 régió 145-ös pozíciójában. A négy *M. fructicola* izolátum közül a 2014/FC48 tartalmazott egy bázis szubsztitúciót az ITS régió 73-as pozíciója után. A legnagyobb változékonyságot a *M. linhartiana* izolátumok mutatták: 3 bázis szubsztitúciót az ITS1 régióban, 2 bázis szubsztitúciót az ITS2 régióban és egyet a 28S rDNS génben, valamint a MLH4 izolátum tartalmazott egy timin inzerciót az ITS1 régió 115-ös pozíciója után.



25. ábra: *Monilinia* és *Monilia* fajok filogenetikai törzsfája az ITS régió 456 bp-ja alapján, az ábrán a saját izolátumok mellett fajonként 1-1 referencia izolátumot tüntettünk fel. Az ábra Bayesian elemzéssel, MCMC módszerrel készült, HKY85 szubsztitúciós modell alkalmazásával. Az elágazások melletti számok a parsimonia értékeket jelölik.



26. ábra: *Monilinia* és *Monilia* fajok filogenetikai törzsfája az 28S rDNA gén 267 bp-ja alapján, az ábrán a saját izolátumok mellett fajonként 1-1 referencia izolátumot tüntettünk fel. Az ábra Bayesian elemzéssel, MCMC módszerrel készült, HKY85 szubsztitúciós modell alkalmazásával. Az elágazások melletti számok a parsimonia értékeket jelölik.

4.3.2.4. A β -tubulin gén változékonysága

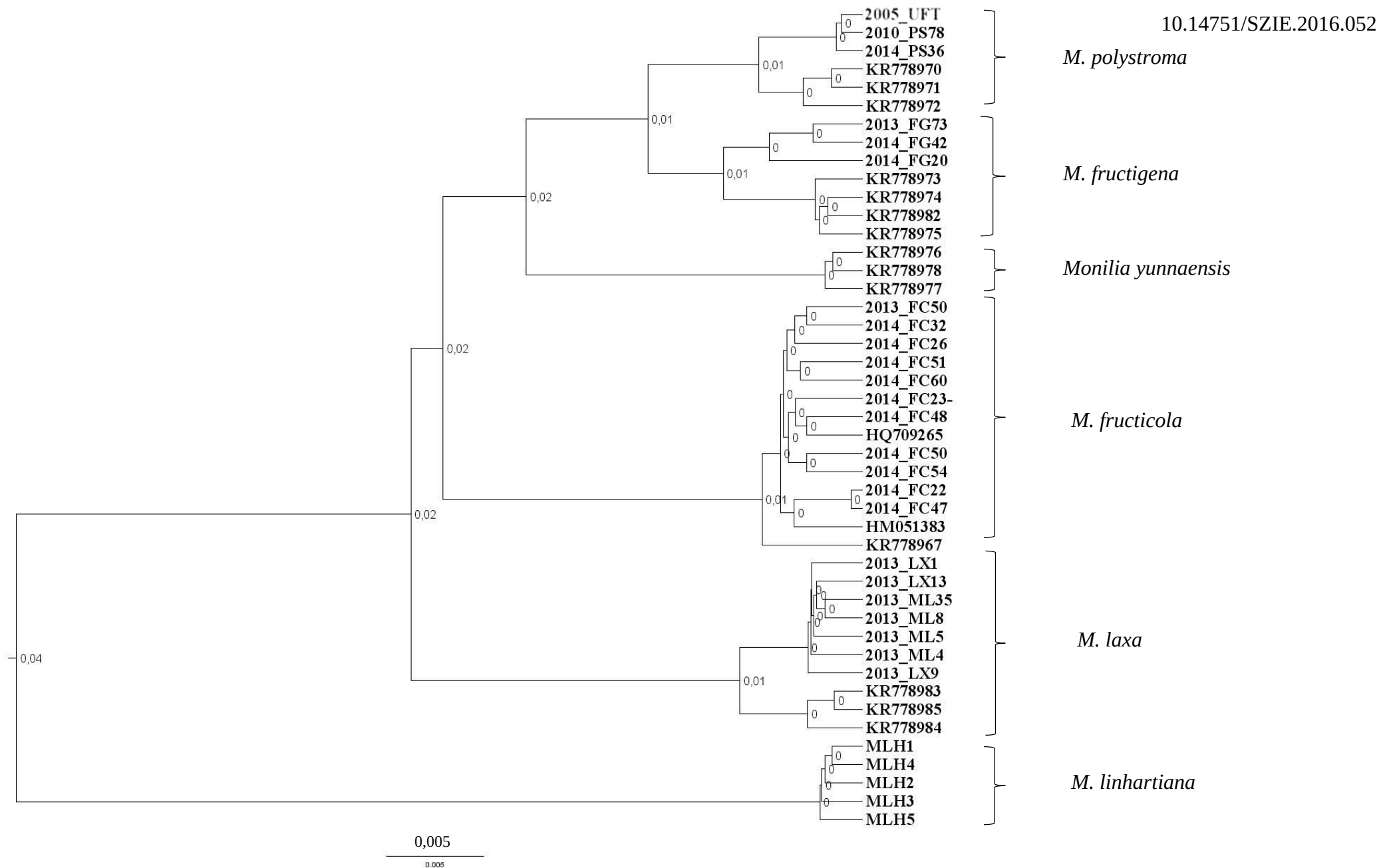
Vizsgálataink szerint a *Monilinia* fajok β -tubulin génje a két primer között eltérő hosszúságú: *M. laxa* 1588-1590 bp, *M. fructigena* 1597 bp, *M. fructicola* 1589-1590 bp, *M. polystroma* 1598-1599, *M. linhartiana* 1581 bp. Az NCBI adatbázisban található *M. laxa* (AY349149) és *M. fructicola* (HQ908770) szekvenciákkal összehasonlítva meghatároztuk a β -tubulin gén kódoló és nem kódoló szakaszait. A forward primer a start kodonhoz és az azt követő bázisokhoz kapcsolódik. A génrészlet összesen 7 exont és 6 intront tartalmaz, az adatbázisban szereplő szekvenciákhoz hasonlóan. A magyar izolátumok 99,0-99,9%-os fajon belüli hasonlóságot mutatnak a nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal (12. táblázat, 27. ábra).

A kódoló régió 394 aminosavat kódol, a saját *Monilinia* izolátumaink aminosav sorrendje 96,8-100%-os egyezést mutat. A 2014/LX35-ös izolátum proteinjének Blast elemzése megerősítette, hogy a fehérje a tubulin szupercsaládon belül a β -tubulin családba tartozik. Négy konzervált domén található rajta: nukleotid kötőhely, α - β tubulin kapcsolódási hely, β - α tubulin kapcsolódási hely, citoszkeleton domén és taxol kötőhely.

12. táblázat: Izolátumok hasonlósága (%) négy genomi régió alapján öt *Monilinia* faj esetén

Vizsgált régió	ITS1-5,8S rDNS-ITS2		28S rDNS		CYP51		TUB2	
Izolátumok	saját	összes	saját	összes	saját	összes	saját	összes
Szakasz hossza (bp)	447	447	637	318	1649	1563	1599	1541
MLX	100	98,0- 100	100	100	100	*	99,6- 99,9	99,7- 99,8
MFG	100	95,5- 98,7	100	100	99,9	*	98,9- 99,5	99,1- 99,7
MFC	99,8- 100	93,3- 96,9	100	100	100	99,1- 99,9	95,6- 100	99,0- 99,9
MPS	100	100	100	**	99,7	*	99,7- 99,9	98,8- 99,3
MLH	98,9- 100	99,1- 99,8	99,8	*	99,5	*	99,8- 100	*

Magyarázat: A saját elnevezésű oszlopokban a munkánk során gyűjtött és meghatározott összes izolátum szekvenciája (2. melléklet) közötti hasonlóságok láthatók (%), míg az összes oszlopokban a saját szekvenciáink és a nemzetközi adatbázisban található szekvenciák (4. melléklet) közötti hasonlóság (%) szerepel. Bizonyos esetekben nem tudtuk elvégezni az összehasonlítást, mert az NCBI adatbázisban nem található szekvencia adat a fajtól (*), vagy 15 bp-nál rövidebb szakasz szerepel (**).

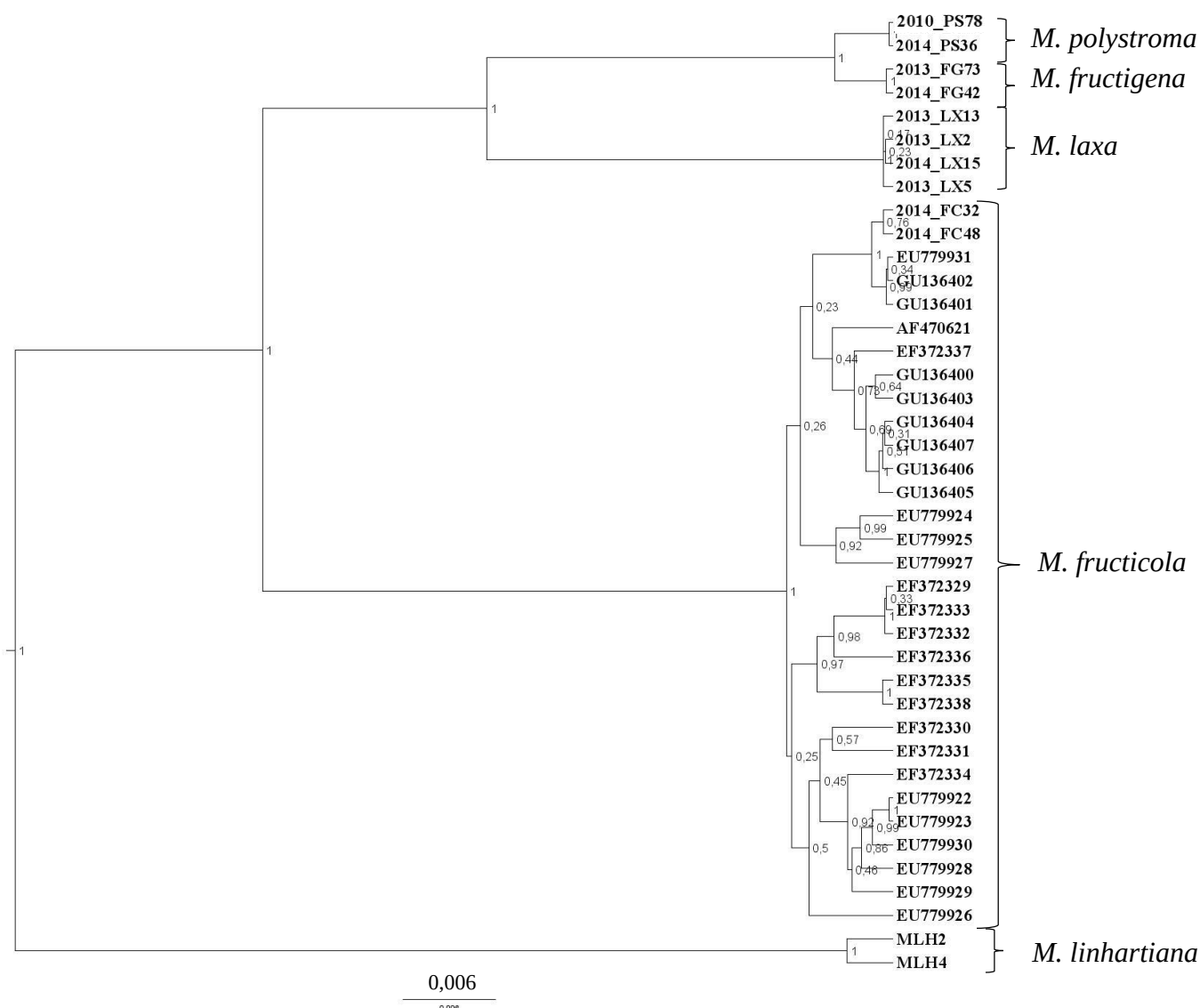


27. ábra: *Monilinia* és *Monilia* fajok filogenetikai törzsfája a β -tubulin gén 402 bp-ja alapján, az ábrán a saját izolátumok mellett fajokként 3-3 referencia izolátumot tüntettünk fel. Az ábra Bayesian elemzéssel, MCMC módszerrel készült, HKY85 szubsztitúciós modell alkalmazásával. Az elágazások melletti számok a parsimonia értékeket jelölik.

4.3.2.5. CYP51 gén változékonysága

A CYP51 gén 1645-1646 bázispár hosszúságú fragmentumát vizsgáltunk, amely közel a teljes gén szekvenciáját tartalmazta. A forward primer a start kodonhoz kapcsolódik, a reverz primer a gén utolsó bázisaihoz kötődik. A direkt szekvencia meghatározás sajátosságai miatt nem minden esetben tudtuk a gén teljes hosszát meghatározni. A GU136400-os azonosítóval rendelkező *M. fructicola* izolátummal illesztve megállapítottuk, hogy a gén két intront és három exont tartalmaz. A magyar *M. fructicola* izolátumok 99,1-99,9%-os hasonlóságot mutatnak a nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal (12. táblázat, 28. ábra).

Az általunk meghatározott kódoló régió összesen 459 aminosavat kódol, melyek fajon belül 99,4–100%-os hasonlóságot mutattak. A *Monilinia* fajok aminosav sorrendje 96,8-99,8%-ban egyezett meg. A 2014/LX13-as izolátum protein analízise alapján a fehérje a P450-es szupercsalád, CypX családjának tagja.



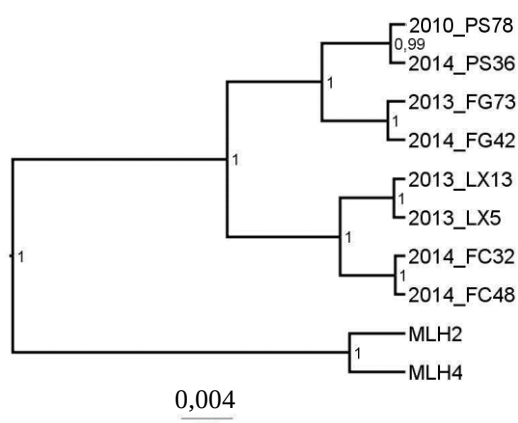
28. ábra: *Monilinia* és *Monilia* fajok filogenetikai törzsfája a *cyp51* gén 1563 bp-ja alapján, az ábrán a saját izolátumok az összes referencia izolátumot feltüntettünk. Az ábra Bayesian elemzéssel, MCMC módszerrel készült, HKY85 szubsztitúciós modell alkalmazásával. Az elágazások melletti számok a parsimonia értékeket jelölik.

4.3.2.6. *Monilinia* fajok filogenetikai rokonsága a 4 régió alapján

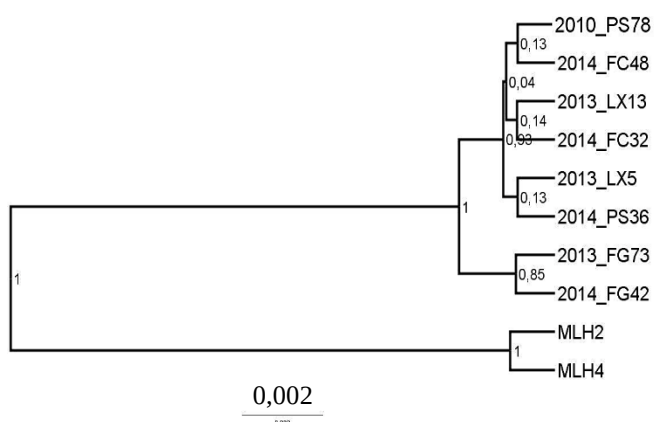
A filogenetikai viszonyokat tíz izolátum segítségével mutatom be. Összesen 4 törzsfát készítettük: az ITS1- 5,8S riboszomális gén- ITS2 régióból, a 28S riboszomális gén, a *cyp51* gén és a *tub2* gén szekvencia részletéből (29. ábra).

A fajok monofiletikus leszármazásúak, azaz egy közös ősrre vezethetőek vissza. A *Monilinia* fajok két alcsoportja elkülönül mind a négy törzsfán, a *M. linhartiana* a *Junctionariae* alcsoport fajaitól. A rokonsági viszonyok az ITS1- 5,8 rDNS- ITS2 régió, a *cyp51* és *tub2* gének alapján igen hasonlóak. A 28S rDNS gén nem alkalmas ezen fajok további filogenetikai elemzésére a *Junctionariae* alcsoportba tartozó fajok nagyfokú hasonlósága miatt.

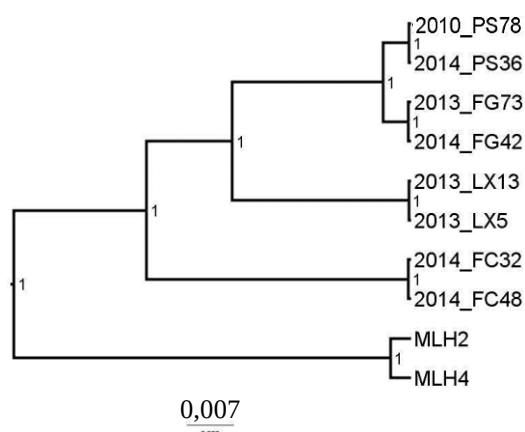
ITS1- 5,8S rDNS- ITS2 régió



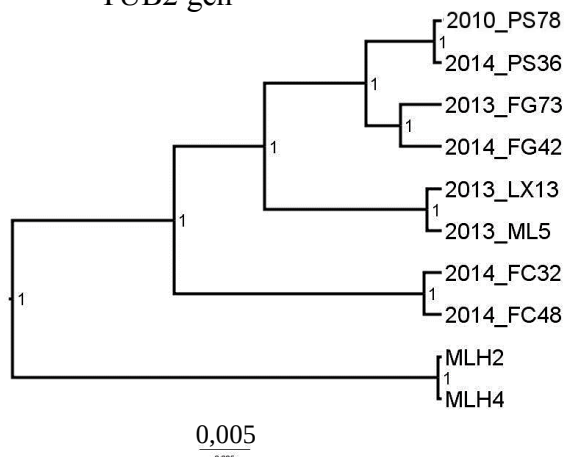
28S rDNS gén



CYP51 gén



TUB2 gén



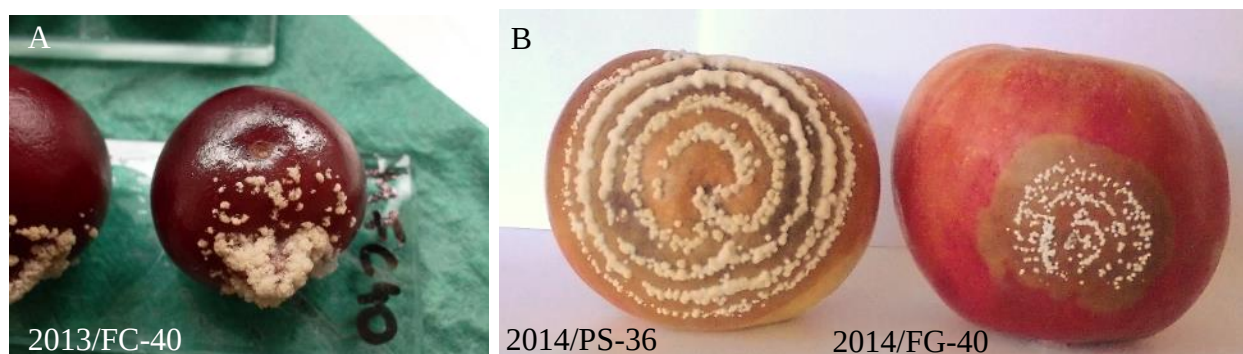
29. ábra: *Monilinia* fajok filogenetikai törzsfája négy régió szekvencia részlete alapján
Magyarázat: A törzsfá Bayesian elemzéssel, MCMC módszerrel készült, HKY85 szubsztitúciós modell alkalmazásával. Az elágazások melletti számok a parsimonia értékeket jelölik. Két- két izolátumot tartalmaz a magyar *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. polystroma* és *M. linhartiana* fajok izolátumai közül.

A *Junctoriae* alcsoport tagjai között a rokonsági viszonyok szorossága a vizsgált régiótól függ. A *M. fructicola* a *M. laxa* fajjal mutatja a legközelebbi rokonságot, amely az ITS1- 5,8S rDNS- ITS2 régió alapján jóval szorosabb, mint a *cyp51* és a *tub2* gének szekvenciárészletei alapján. Az azonban egyértelműen kiderül, hogy a *M. fructigena* és *M. polystroma* fajok izolátumai igen szoros rokonságban állnak egymással.

A meghatározott génrészletek minden esetben feltöltésre kerültek a nemzetközi génbankba. Közülük a *M. linhartiana* kórokozó ITS régiójának, *tub2* génjének és polimorf régiójának azonosítói kódjai nyilvánosak (5. melléklet), a többi izolátumé a közeljövőben válik elérhetővé. A kérdéses szekvenciák (további 80 db) 2016. július 25-28 között kerültek feltöltésre az European Nucleotide Archive adatbázisába, viszont a dolgozat leadásának időpontjáig (2016. szeptember 10) nem érkeztek meg azonosítóik.

4.4. Patogenitás igazolása

Az inokulált meggyterméseken minden esetben kialakultak a monilíniás betegségre jellemző tünetek. Kezdetben barna rothadó foltok jelentek meg az inokulációs pont körül, majd 1-4 nap elteltével sztrómák is megjelentek a felületükön. A rothadás leggyorsabban a *Monilinia fructicola* kórokozóval fertőzött terméseken terjedt, a mesterséges fertőzést követő 24 órán belül megjelentek az exogén sztrómák a fertőzött gyümölcsök felszínén (30. ábra/A).



30. ábra: *Monilinia* izolátumokkal mesterségesen inokulált meggy- (A) és almatermések (B). A *M. fructicola* (2013/FC-40), *M. polystroma* (2014/PS-36), *M. fructigena* (2014/FG-40) izolátumok tenyészetéből származó micélium korongot a megsebzett epidermisz alá helyeztük, majd nedves kamrában egy hétig inkubáluk. (fotók: Lantos 2014-2015)

A *M. polystroma* kórokozóval végzett inokuláció következtében a rothadó gyümölcsökön fekete „párducfoltosság” jelent meg (30. ábra/B). Ez leginkább az almaterméseken volt megfigyelhető, a szilvatermések sötét héja elfedte ezt a jellegzetes tünetet. A faj a *M. fructigena*

kórokozótól ez alapján a jellegzetes kísérő tünet alapján is elkülöníthető, bár a természetes úton fertőzött termések esetében ezt a tünetet nem minden esetben jelenik meg.

A *M. linhartiana* fertőzését a Koch posztulátumokat követve birs növényen végeztük el. A levélnyelek és főerek inokulálásakor hasonló tünetek alakultak ki. Először a levélnyél, ill. a főér indult elhalásnak. A fertőzés a vastagabb erek mentén terjedt tovább, az ér elbarnulását követően az ér melletti sávban is nekrotizálódtak a szövetek (31. ábra), majd az egész levélszövet elbarnult (de nem vörösen, mint a szabadföldi tünet esetén). Az elhalt szöveteken megjelent a kórokozó micéliuma, viszont konídiumok nem fejlődtek rajta. A steril PDA koronggal inokulált kontroll levelek az értékelés napjáig zöldek, egészségesek maradtak. A fiatal birsterméseket is fertőzte a kórokozó. A gyümölcsöket félbevágva a mezokarpium szövetei és a magok feketésbarnára színeződtek és elhaltak (31. ábra). Az érett gyümölcsöket a *M. linhartiana* nem fertőzte meg, valamint a kontroll terméseken sem tapasztaltunk semmiféle változást.

A fertőzött növényi részek felületén képződött szaporítóképletekről vagy a belső szövetekből minden esetben sikeresen izoláltuk a kórokozót PDA táptalajon. A patogenitási teszt elvégzésével bizonyítottuk az izolátumok megbetegítő képességét.



31. ábra: *M. linhartiana* izolátum (MLH1) okozta tünet mesterséges fertőzést követően birsleveleken (A, B) és fiatal terméseken (C). A fekete nyilak az inokulációs pontot jelölik, a kórokozó tenyészetéből származó micélium korongot a megsebzett főér, levélnyél vagy fiatal termés epidermisze alá helyeztük. A fotók a levelek esetén 10 nappal, a termés esetén 20 nappal a fertőzést követően készültek. (fotók: Lantos 2014)

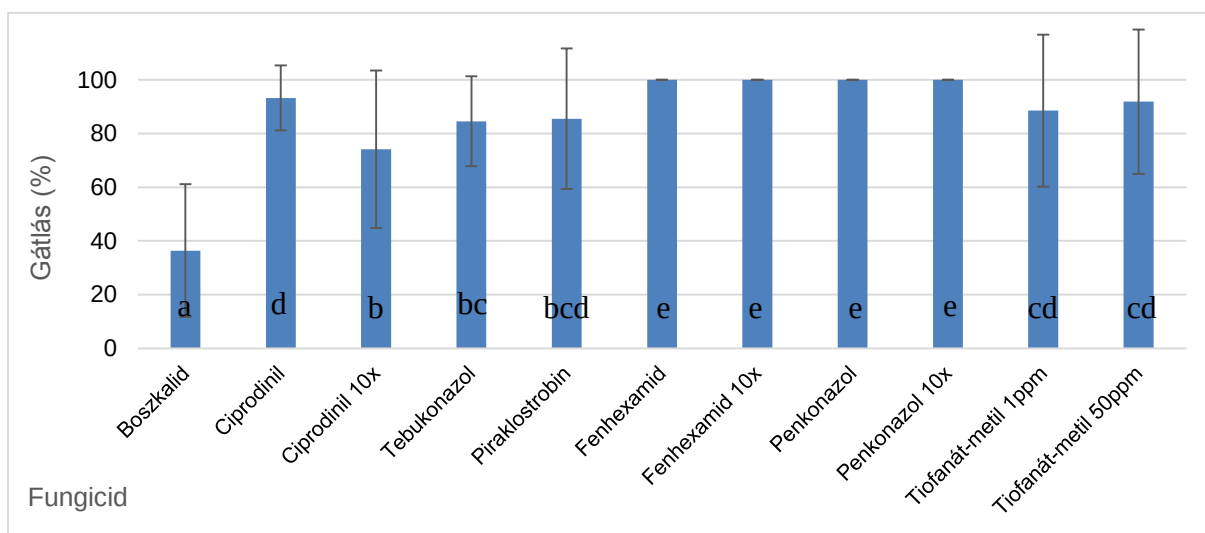
4.5. Fungicidek hatékonysága

4.5.1. Az izolátumok fungicid érzékenysége mérgezett agarlemezen

A felhasznált készítmények hatékonysága között jelentős, szignifikáns különbséget mutattunk ki az összes izolátum együttes elemzése során ($K(10)=652,9$; $p<0,001$). A 32. ábrán az általunk vizsgált hatóanyagok gátló hatása látható. A fenhexamid és penkonazol hatóanyagok, valamint

tízszeres hígításuk fungicid hatásának bizonyult valamennyi izolátumra. A ciprodinil, tebukonazol, piraklostrobin és tiofanát-metil alkalmazásakor az izolátumok egy része fejlődésnek indult, viszont ezek fejlődését megfelelően gátolta a hatóanyag. A boszkalid esetén igen gyenge gátló hatást tapasztaltunk.

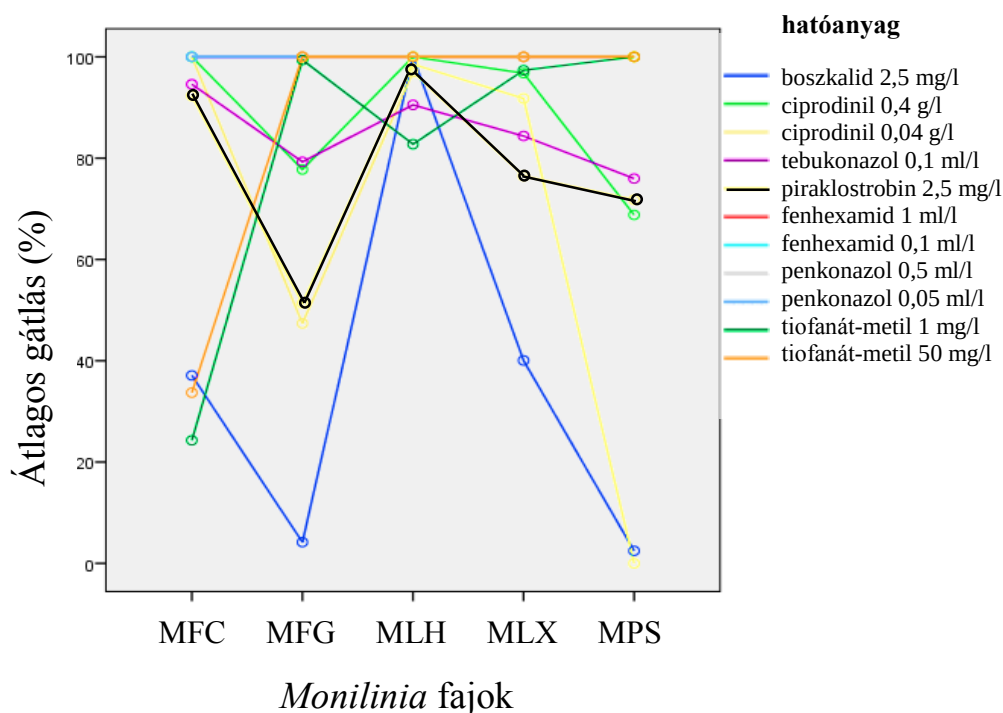
Fontos megemlíteni, hogy a boszkalid és piraklostrobin esetén a vizsgálatot csak a 2013-as izolátumokkal végeztük el (ezt a vizsgálatot abban az időszakban végeztem, amikor ERASMUS program keretében a Bolognai Egyetemen folytattam kutatómunkámat). Ebben az évben az izolátumok több mint 80%-a *Monilinia laxa* fajoz tartozott. A többi készítménynél két év (2013-2014) izolátumaival végeztük el a kísérletet, így ezen adatok teljesebb képet adnak a magyarországi *Monilinia* populációk érzékenységről. Vizsgálatunk során az egyes készítmények hazai populációra gyakorolt hatásának felülvizsgálata mellett, csökkent érzékenységgel rendelkező egyedek kiemelése is célunk volt. Ezen egyedeket a továbbiakban molekuláris módszerekkel vizsgáltuk annak kimutatására, hogy rezisztenciájuk hátterében milyen mutációk állhatnak.



32. ábra: A vizsgálatok során alkalmazott készítmények gátló hatása *Monilinia* fajok tenyészteteire. A boszkalid és piraklostrobin esetén 77, a többi hatóanyag esetén 133 *Monilinia* izolátum gátlását elemeztük Kruskal- Wallis teszt és Games- Howel post hoc teszt alkalmazásával. Az oszlopokon látható eltérő betűk a szignifikáns különbséget jelennek a készítmények hatékonyságában.

A fungicidek az egyes *Monilinia* fajokra kifejtett hatékonyságában is szignifikáns különbségeket mutattunk ki (13. táblázat). Legegységesebb hatással a tebukonazol rendelkezett, míg a ciprodinil és tiofanát-metil igen eltérő mértékben gátolta az egyes *Monilinia* fajok fejlődését

(33. ábra). A 13. táblázatban feltüntettem, hogy a vizsgált izolátumok közül hány növekedett az adott koncentráció jelenlétében, ezek mindannyian csökkent érzékenységgel rendelkeznek.



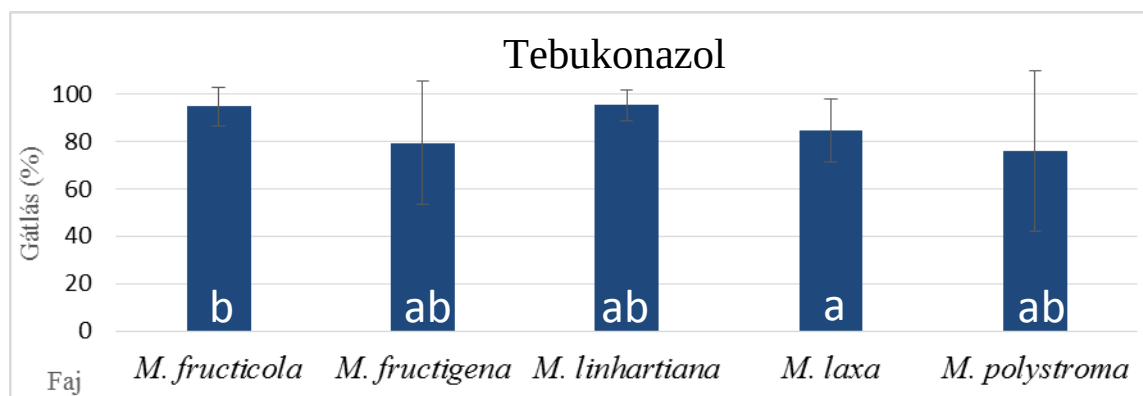
33. ábra: *Monilia* fajok érzékenysége a különböző növényvédő szerekre

13. táblázat: Az egyes fungicidek különböző *Monilia* fajokra kifejtett hatékonyságának statisztikai elemzése

Növényvédő szer	Növekedésnek indult izolátumok száma	próba	szignifikan- cia szint
Boszkalid*	62 MLX, 10 MFG, 2 MFC	F(2,71)=15,0	p=0,001
Ciprodinil	21 MLX, 23 MFG, 2 MPS	K(4)=59,6	p<0,001
Ciprodinil 10x	56 MLX, 25 MFG, 2 MPS, 1 MLH	F(4,127)=11,6	p<0,001
Folicus Solo	55 MLX, 12 MFG, 6 MFC, 1 MPS, 2 MLH	F(4,128)=2,8	p=0,03
Piraklostrobin*	27 MLX, 10 MFG, 1 MFC	K(2)=13,7	p=0,001
Fenhexamid, Fenhexamid 10x	-	-	-
Penkonazol, Penkonazol 10x	-	-	-
Tiofanát-metil	18 MLX, 1 MFG, 4 MFC, 1 MPS, 2 MLH	K(4)=38,8	p<0,001
Tiofanát-metil 50 ppm	11 MFC	K(4)=86,9	p<0,001

A vizsgálat során 85 MLX, 26 MFG, 16 FC, 4 MLH, 2 MPS vagy * 65 MLX, 10 MFG, 2 MFC izolátumot vizsgálatunk 1 mintás ANOVA és Kruskal-Wallis teszt alkalmazásával. (MFC: *M. fructicola*, MFG: *M. fructigena*, MLH: *M. linhartiana*, MLX: *M. laxa*, MPS: *M. polystroma*)

A tebukonazol alkalmazásakor a *M. fructicola* izolátumok mutatták a legnagyobb érzékenységet, bár ettől csak a *M. laxa* izolátumok érzékenysége különbözött szignifikánsan. A *M. fructicola* és *M. linhartiana* izolátumoknál az átlagos gátlás 70% fölött volt minden esetben, míg a *M. laxa*, *M. fructigena* és *M. polystroma* izolátumok között voltak olyanok, amelyek átlagos gátlási %-a nem érte el a 60-at (34. ábra).

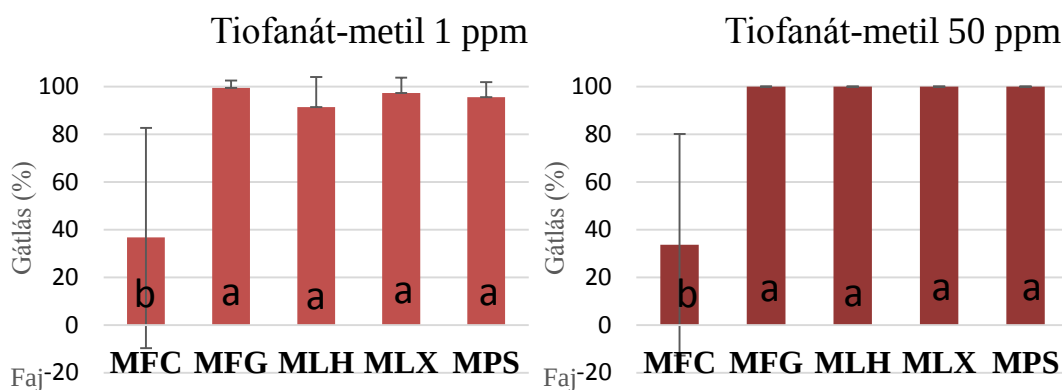


34. ábra: A tebukonazol 0,1 ml/l koncentrációban kifejtett hatékonysága a különböző *Monilinia* fajokra. A statisztikai elemzés során 1 mintás ANOVA és Games-Howell post hoc tesztet végeztünk, az oszlopokon látható eltérő betűk a szignifikáns különbséget jeleznek fajokra kifejtett hatékonyságban.

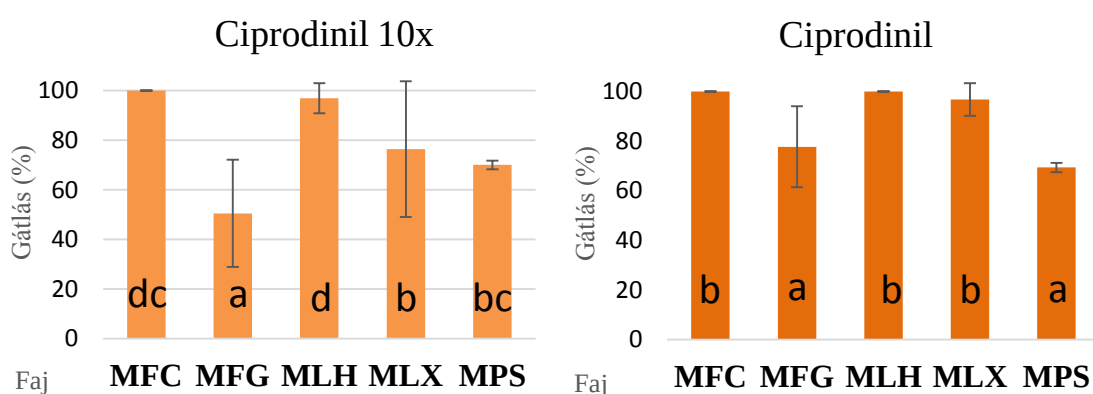
A tiofanát-metil 1 ppm-es koncentrációban legalább 70%-os hatékonysággal gátolta a *M. laxa*, *M. linhartiana*, *M. fructigena* és *M. polystroma* fajok izolátumait. Míg a *M. fructicola* izolátumait gyengén gátolta, átlagosan 33%-kal. A 16 *M. fructicola* izolátum közül 6-ot egyáltalán nem gátolt sem az 1 ppm-es, sem az 50 ppm-es koncentráció. Az 50 ppm-es koncentráció valamennyi *M. laxa*, *M. linhartiana*, *M. fructigena* és *M. polystroma* izolátumra fungicid hatásának bizonyult (35. ábra).

A ciprodinil a *M. fructicola* és *M. linhartiana* izolátumait megfelelően gátolta mindkét hígításban. A ciprodinil gyakorlati dózisában a *M. laxa*, *M. fructigena* és *M. polystroma* izolátumok között is voltak olyanok, amelyeknek gátlási %-a 70 alatt maradt. A tízszeres hígítás esetén a hatékonyság tovább csökkent, a 2013/FG-43, 2013/ML-55, 2013/ML-56, 2013/FG-68 izolátumok esetén a gátlási % nem érte el a 20%-ot (36. ábra).

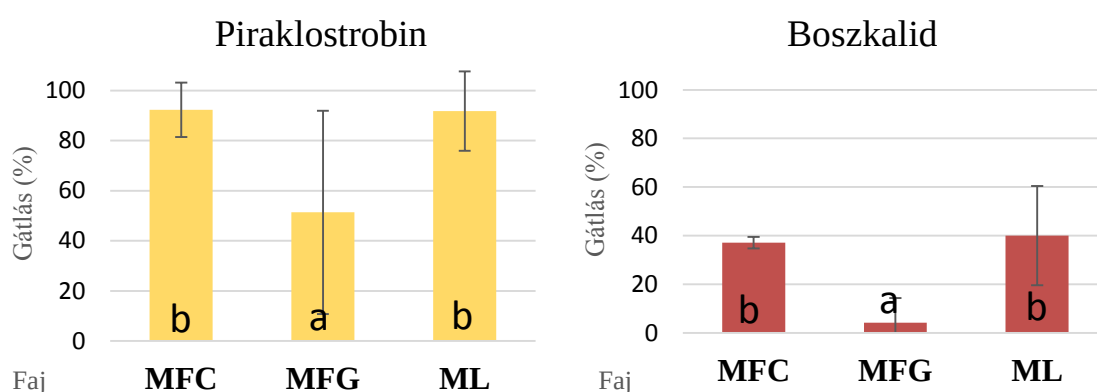
A piraklostrobin leggyengébben a *M. fructigena* tenyészetek fejlődését gátolta, a *M. fructicola* és *M. laxa* tenyészetek gátlása minden esetben elérte a 70%-ot. A boszkalid hatóanyag jelentétében az összes izolátum fejlődésnek indult, mindhárom faj átlagos gátlása 40% alatti. A *M. fructigena* tenyészeteket esetén gátló hatást alig tapasztaltunk (37. ábra).



35. ábra: A tiofanát-metil-M 70 WDG hatékonysága 1 mg/l és 50 mg/l koncentrációban alkalmazva az egyes *Monilinia* fajok ellen



36. ábra: A ciprodinil 50 WG hatékonysága *Monilinia* fajok ellen 0,04 g/l és 0,40 g/l koncentrációban alkalmazva

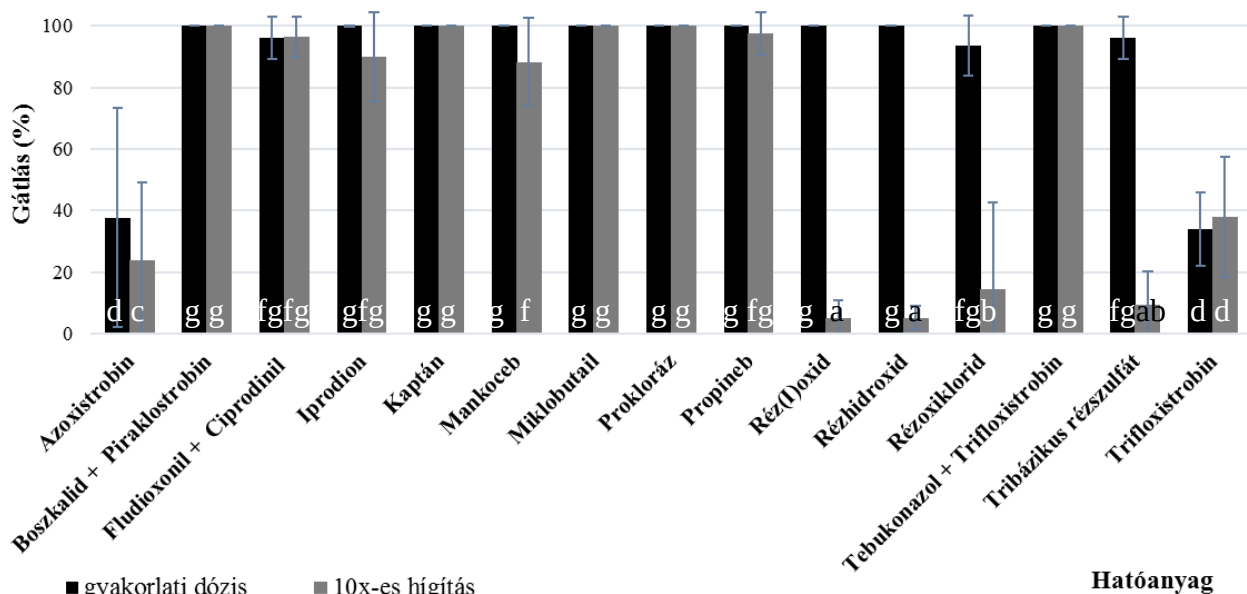


37. ábra: A piraklostrobin és a boszkalid hatékonysága *Monilinia* fajok ellen 2,5-2,5 g/l koncentrációban alkalmazva

Magyarázat a 35-37. ábrákhoz: A statisztikai elemzés során Kruskal-Wallis tesztet, 1 mintás ANOVA-t és Games-Howell post hoc tesztet alkalmaztunk, az oszlopokon látható eltérő betűk a szignifikáns különbséget jeleznek a különböző *Monilinia* fajokra kifejtett hatékonyságban. (MFC: *M. fructicola*, MFG: *M. fructigena*, MLH: *M. linhartiana*, MLX: *M. laxa*, MPS: *M. polystroma*)

A *M. linhartiana* kórokozó izolátumaira szignifikánsan eltérő módon hatottak a készítmények ($K(41)=582.6$; $P<0.001$). Öt növényvédő szer fungicid hatást mutatott mindkét vizsgált hígításban: boszkalid+piraklostrobin, kaptán, miklobutanil, prokloráz, tebukonazol+trifloxistrobin (38. ábra).

Az iprodion, mankoceb és propineb készítmények gyakorlati dózisa szintén fungicid hatásának bizonyult. Tízszeres hígításban gátló hatásuk lecsökkent, bár nem igazolható statisztikailag. Az propineb, iprodion és mankoceb átlagos gátlása 97%, 91% és 88%-os volt. A fludioxonil + ciprodinil esetében a tenyészetek mindkét koncentrációban fejlődésnek indultak. A fludioxonil + ciprodinil 91%-os gátlása gyakorlati dózisban és 90%-os gátlása tízszeres hígításban.



38. ábra: Fungicidek átlagos gátló hatása a magyar *M. linhartiana* izolátumokra. Az adatokat Kruskal-Wallis teszt és a Games-Howell poszt hoc teszt alapján elemeztük. Az oszlopokon látható eltérő betűk a szignifikáns különbséget jeleznek a hatóanyagok gátló hatásában.

A réz-hatóanyagok (réz(I)oxid, rézoxiklorid, rézhidroxid, tribázikus rézsulfát) gyakorlati dózisban megfelelően gátolták a kórokozó fejlődését. Hatékonyságuk tízszeres hígításban jelentősen lecsökkent, átlagosan nem érte el a 20%-ot (38. ábra).

A tisztán strobilurin tartalmú készítmények (azoxistrobin, trifloxistrobin) önmagukban nem gátolták megfelelően a micélium növekedését. Az azoxistrobin MLH3-as izolátumra kifejtett gátlóhatása nem érte el a 15%-ot gyakorlati dózisban. Az összes izolátum fejlődött a strobilurin hatóanyagok jelenlétében, az azoxistrobin átlagosan 39%-kal gátolta a tenyészetek növekedését, a trifloxistrobin 63%-kal, de ezek között nem volt szignifikáns különbség.

ellenállósággal rendelkező izolátumok szekvenciáit hasonlítottuk össze, de a vizsgált szakaszon nem találtunk olyan nukleotid változást, amely egyértelműen indokolná az érzékenységsökkenést.

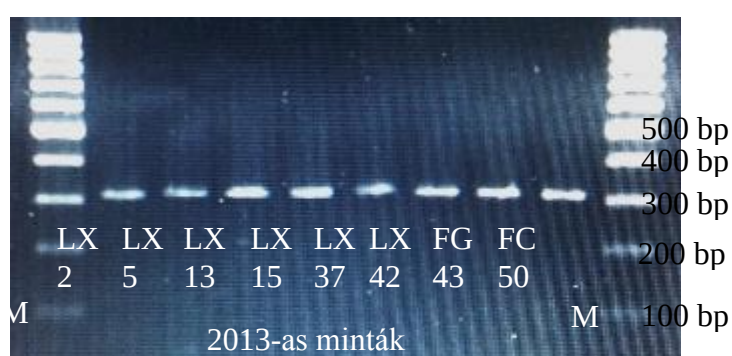
198

2013_FC50	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	A	A	C	T	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A	
2014_FC14	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC17	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC22	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC23	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC25	A	G	A	A	A	C	T	C	G	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC26	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC27	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC32	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC47	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	A	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC48	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC50	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC51	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC54	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A
2014_FC60	A	G	A	A	A	C	T	C	T	G	A	T	G	C	A	A	C	C	T	T	C	T	G	T	A	T	C	G	A

40. ábra: A rezisztenciáért felelős E198A mutáció *M. fructicola* izolátumok többségénél jelen van. Az ábrán a *M. fructicola* faj összes általunk meghatározott izolátumának *tub2* génrészlete látható

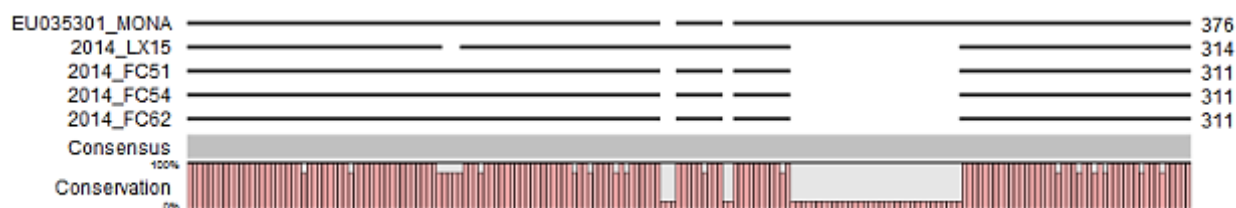
4.5.2.2. A 14 α -demetiláz gén elemzése

A CYP 51 gén promóter régiójában jelen levő Mona genetikai elem kimutatásához a PCR termékeket 2%-os agaróz gélen tettük láthatóvá. Az összes vizsgált izolátumból egy kb. 310 bp hosszúságú terméket emelt ki a PCR, azaz egyik izolátum sem tartalmazta az irodalmi adatokból ismert, hatékonyság csökkenésért felelős Mona genetikai elemet (41. ábra).



41. ábra: Az INS65 primerpár által amplifikált, ~300 bp hosszúságú PCR termék. Az ábrán a 2013-as *M. laxa*, *M. fructigena* és *M. fructicola* minták egy része látható, 100 bp léptékű DNS létra (M) mellett

Egy *Monilinia laxa* és három *M. fructicola* izolátumot választottunk ki, hogy a promóter régió szekvencia sorrendjét is vizsgáljuk. A primerpár a *M. fructicola* izolátumokból 311 bázispár hosszúságú szakaszt, a *M. laxa* izolátum esetén 314 bázispár hosszúságú szakaszt emelt ki, azaz valóban nem tartalmazták az izolátumok a rezisztenciát kialakító Mona genetikai elemet. A 42. ábrán a magyar izolátumok mellett, az EU035301 kóddal jelölt *M. fructicola* izolátum az adatbázisból letöltött Mona genetikai elemet tartalmazó szekvenciája látható.



42. ábra: A CYP51 gén promóter régiójának részlete. Az EU035301 kóddal jelölt, nemzetközi adatbázisból származó izolátum tartalmazza kizárólag a 65 bp hosszúságú Mona genetikai elemet, a magyar izolátumok nem.

A CYP51 gén szekvenciájának elemzése során a 136-os aminosav mutációját kerestük, amely a triazolokkal szembeni rezisztencia kialakulásáért felelős. A triplet a második exon régióban található. A *M. laxa*, *M. fructigena* és *M. polystroma* izolátumok TAT tripletet, a *M. fructicola* és *M. linhartiana* izolátumok TAC tripletet tartalmaznak, viszont mindkét bázishármas a tirozont kódolja, amely a vad genotípusra jellemző.

Ebben az esetben is vizsgáltuk, hogy jelen lehet-e olyan egyéb szubsztitúció, amely az izolátumok érzékenység csökkenéséért felelős lehet. A 2014/FC-32 és a 2014/FC-48 *M. fructicola* izolátumok szekvenciái teljes egyezést mutattak egymással, valamint az adatbázisban szereplő érzékeny genotípusokkal (GU136400, GU136401, GU136402, GU136403). A *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. polystroma* és *M. linhartiana* szekvenciáinkban megfigyelhető több bázispár eltérés az érzékeny *M. fructicola* izolátumokhoz képest. Viszont ezekből a fajokból ezek az első szekvencia adatok, így nem állt rendelkezésünkre elegendő információ annak megállapítására, hogy a báziscserék a fajra jellemző változékonyságból vagy rezisztenciáért felelős pontmutáció kialakulásából adódnak.

4.5.2.3. A citokróm B gén elemzése

A *Monilinia* fajok citokróm B génje számos nagyméretű intront tartalmaz, amelyek kódoló régiók között, fajoként különböző helyeken helyezkednek el. A strobilurinok elleni rezisztencia a 129-es, 137-es és 143-as tripletokban jelenhet meg. Ez a három triplet a *M. laxa* és *M. fructicola* fajnál 3 különböző exonon helyezkedik el, kivéve a *M. fructigena* fajnál, ahol a 137-es és 143-as ugyanabban a kódoló régióban található.

A 129-es kodon TTC, a 137-es kodon mindhárom fajnál GGT és nem található közvetlenül előttük vagy utánuk intron. A 143-as kodon mindhárom fajnál a vad genotípusra jellemző GGT tripletet kódolta. A *M. laxa* és *M. fructicola* fajokban a triplet után egy intron kezdődik - az adatbázisban található izolátumokhoz hasonlóan - míg a *M. fructigena* izolátumban nincs jelen intron.

4.6. Új tudományos eredmények

- Átfogó felmérést végeztünk a hazai *Monilinia* fajok dominancia viszonyairól. Korábbi adatokhoz viszonyítva a *Monilinia* fajok dominanciájának változását, a *Monilinia fructicola* faj jelentőségének növekedését figyeltük meg.
- A *Monilinia laxa* új tünetét figyeltük meg kajszi gazdanövényen, a hajtásnövekedés lezárulta után a vesszők fertőződését és elhalását.
- Hazánkban elsőként azonosítottuk a *Monilinia polystroma* fajt csonthéjas gazdanövényről és érett alma gyümölcsökről. Hazánkban elsőként izoláltuk a *Monilinia fructicola* fajt meggy gazdanövényről.
- Újabb adatokat közöltünk a birs monilíniás betegségének kórokozójáról: hazánkban elsőként jellemeztük a *Monilinia linhartiana* kórokozó morfológiai és tenyészbélyegeit, valamint elsőként végeztünk fungicid érzékenységi vizsgálatokat a gomba izolátumaival.
- Elsőként mutattuk ki hazánkban *Monilinia* izolátumok növényvédő szer rezisztenciáját, valamint bizonyítottuk annak molekuláris hátterét. A *Monilinia fructicola* faj egyes szubpopulációi rezisztensek a benzimidazolokra, amely a β -tubulin E198A pontmutációjának következtében alakul ki.
- A világon elsőként közöltünk szekvencia adatot a *Monilinia linhartiana* β -tubulin és 28S rDNS génjéből, a *Monilinia polystroma* β -tubulin és 28S rDNS génjének bizonyos szakaszaiból, a *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia polystroma* és *Monilinia linhartiana* fajok *cyp51* génjéből, valamint a *Monilinia linhartiana* egy polimorf régiójából. Hazánkban elsőként közöltünk szekvencia adatot a *Monilinia linhartiana* ITS régiójából.

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

***Monilinia* fajok gyakorisága csonthéjasokon és almatermésűeken**

Az új *Monilinia* fajok (*M. fructicola*, *M. polystroma*) megjelenése következtében a csonthéjasok és almatermésűek monilíniás betegsége Európa-szerte változóban van. A fajok dominanciája megváltozik, a betegség új kártételi formái jelennek meg, amelyek akár a növényvédelmi technológia átalakítását is szükségessé tehetik. Európában jelenleg 4 *Monilinia* faj okoz megbetegedést a csonthéjas ültetvényekben. 2013-2015 között végzett vizsgálataink alapján hazánkban a *M. fructicola* és a *M. polystroma* fajok károsításának növekedésére számíthatunk. Ezt támasztják alá azok a kutatások is, amelyek kivitelezésébe és értékelésébe 2012-2014 között Olaszországban bekapcsolódhattam az ERASMUS ösztöndíjnak köszönhetően (Martini és mtsai. 2014a).

Hazánkban - megfigyeléseink szerint - a tavaszi időszakban virágok elhalását minden esetben a *M. laxa* faj okozta, bár a Mediterrán régióban a *M. fructicola* károsítására is számíthatunk ebben az időszakban (Papavasileiou és mtsai. 2015b). A *M. laxa* és *M. fructicola* közel azonos gyakorisággal volt jelen az ültetvényekben, de míg a *M. laxa* hasonló arányban károsított a virágokon és terméseken, addig a *M. fructicola* fertőzések jelentős részét a terméseken figyelték meg (Papavasileiou és mtsai. 2015b).

Vizsgálataink során hazánkban nem tapasztaltuk a *M. fructicola* virágfertőzését, feltehetően azért, mert országunk időjárása a virágzás időszakában még hideg a kórokozó számára, azonban a telek enyhülésével, a tavaszi átlagos középhőmérséklet emelkedésével ez hosszú távon megváltozhat. Kimura (1962) és Harada (1977) szerint a *M. fructicola* olyan területeken nem okoz virágelhalást, ahol nagy téli hidegek és hosszú, hűvös tavasz jellemző. A *M. laxa* kórokozó jobban adaptálódott az alacsonyabb hőmérsékletre, így tavasszal gyakrabban okoz fertőzést (Tamm és mtsai. 1995). A *M. laxa* kórokozó 8-20 °C közötti hőmérséklet tartományban fertőz (Byrde és Willetts 1977, Kiss 2007), míg a *M. fructicola* virágfertőzéséhez a 22-26 °C az optimális hőmérséklet, de 10 °C alatt egyáltalán nem is fertőz (Luo és mtsai. 2001). 2015 tavaszát az ország nagy részén 11-12 °C-os átlaghőmérséklet jellemezte, az 1971-2000 közötti időszak átlagánál 0,2–0,4 °C-kal melegebb volt (OMSZ 2016). Irodalmi adatokkal összevetve ezeket a hőmérsékleti értékek a *M. fructicola* fertőzéséhez már minimálisan elegendőek, de a klimatikus viszonyok változásával, vagy a kórokozó hidegebb éghajlathoz való alkalmazkodásával elképzelhető, hogy a jövőben ennek a fajnak is számíthatunk a virágokon és a friss hajtásokon okozott kártételére.

A Mediterrán régióban jelenleg a csonthéjas gyümölcsökön a *M. laxa* és a *M. fructicola* nagyjából fele-fele arányban károsít (Villarino és mtsai. 2013, Papavasileiou és mtsai. 2015a).

Olaszországi felmérésünk során, hasonlóan a spanyol megfigyelésekhez (De Cal és mtsai. 2014) azt tapasztaltuk, hogy a *M. fructicola* a *M. laxa* fajnál is gyakoribb. Ogawa és English (1960) nem találtak a *M. laxa* és *M. fructicola* virulenciájában igazolható különbséget. Papavasileiou és mtsai. (2015b) vizsgálatai alapján a *M. laxa* és *M. fructicola* agresszivitásában nem figyelhető meg különbség, a fajok fertőzésének megoszlását más tényezők befolyásolják.

Magyarországon a *M. fructigena* és *M. fructicola* fajok károsítása 15-30% között ingadozott. Eredményeink viszont nem támasztják alá azon nemzetközi megfigyeléseket, hogy a *M. fructicola* faj a *M. fructigena* fajt kiszorítaná az ültetvényekből (Villarino és mtsai. 2013, Papavasileiou és mtsai. 2015a). A *M. fructigena* az ültetvényekben és a kezeletlen területeken is 20-22%-ban van jelen. A *M. fructicola* károsítása inkább a *M. laxa* faj arányának csökkenésével áll összefüggésben. A sósokúti gyümölcsösben például a *M. fructicola* faj mellett kizárólag a *M. fructigena* volt jelen 2014-ben. Viszont egy ültetvényből nem gyűjtöttünk annyi mintát, hogy ezekből egyértelmű következtéseket lehessen levonni.

A *M. polystroma* kártétele elsősorban az almatermésűeken jelentős. Olaszországban végzett felmérésünk során az almatermésű gyümölcsök több, mint feléről (52%) ezt a kórokozót izoláltuk (Martini és mtsai. 2014a). Lengyelország csonthéjas ültetvényeiben a *M. polystroma* a gyümölcsfertőzések 2,6%-át (Poniatowska és mtsai. 2013) okozza, míg az almatermésű és csonthéjas ültetvényekben vegyesen gyűjtött mintáik 5%-át ez a faj fertőzte meg (Poniatowska és mtsai. 2015). Míg Olaszországban a barna rothadás tüneteit mutató csonthéjas gyümölcsök 5%-án volt jelen a *M. polystroma* faj, addig Magyarországon mindösszesen egy alkalommal izoláltuk csonthéjasokról.

A *Monilinia fructicola* és *Monilinia polystroma* fajok gazdanövényei

Felmérésünk során a leggyakrabban őszibarack és szilvaterméseken okozott rothadást a *M. fructicola* fajt, de több alkalommal kajszis és nektarin gyümölcsökről is azonosítottuk a kórokozót. Papavasileiou és mtsai. (2015a) megfigyelései alapján is őszibarackon és a szilván meghatározó, de gyakori kórokozó a cseresznyén és kajszin is. 2015-ben két meggyültetvényből azonosítottuk a *M. fructicola* fajt, 'Kántorjánosi' fajtáról Kiskunmajsán és 'Debreceni bőtermő' fajtáról Ecséden. Az átvizsgált irodalmakban nem találtunk említést a faj hazai előfordulásáról meggy gazdanövényen, bár az USA-ban gyakori (Biggs és mtsai. 1995). Hazánkban 2006-ban alma, körte, őszibarack, nektarin és szilva gazdanövényekről izolálták a kórokozót különböző ültetvényekből (Kiss 2007). Szödi (2015) kajsziról, őszibarackról és szilváról azonosította a fajt.

A *M. polystroma* fajt hazánkban korábban mindösszesen egyszer izolálták, amikor egy újfahértói almaültetvényben 'Ashton Bitter' boralma fajta hajtásain okozott elhalást (Petróczy és

Palkovics 2009). Vizsgálataink során az Újfehértótól 30 km-re fekvő ültetvényből 'Gala' fajta érett gyümölcsseiről izoláltuk a kórokozót. Az elmúlt években Európa számos országában kimutatták a kórokozó jelenlétét: Svájc (Hilber-Bodmer és mtsai. 2006, 2010), Csehország (EPPO Reporting Service 2011), Lengyelország (Poniatowska és mtsai. 2013), Szerbia (Vasic és mtsai. 2013), de az újfehértói hajtáselhaláshoz hasonló tüneteket nem figyeltek meg. Poniatowska és mtsai. (2015) eredményei alapján alma és szilvaterméseken a leggyakoribb a gomba kártétele. Lengyelországban a 16 csonthéjas izolátum közül 15 szilváról származott, 1 pedig őszibarackról (Poniatowska és mtsai. 2013). Hazánkban Zsámbékon szintén szilván mutattuk ki a *M. polystroma* kártételét. Olaszországban elsőként azonosítottuk a gomba okozta megbetegedést almatermésűeken és csonthéjasokon. A kórokozó őszibarack ültetvényekben (Martini és mtsai. 2014b) és 'Abate Fetel' körte ültetvényben (Martini és mtsai. 2015a) okozott súlyos gyümölcsrothadást.

***Monilinia* fajok által okozott tünetek**

A fertőzött növényi részeken a legtöbb esetben jellegzetes, jól ismert monilíniás tüneteket figyeltünk meg (Wormald 1954, Byrde és Willetts 1977, Barta 1991), néhány esetben azonban szokatlan tünetekkel is találkoztunk. A tavaszi fertőzés során a kórokozó a virágon keresztül jut a hajtásba, majd annak elhalását okozza (Ogawa és mtsai. 1960, Holb 2008). Megfigyeltük, hogy a *Monilinia fructicola* kórokozó gyakran a termések kocsányán keresztül is behatol a vesszőbe, amelyek később 30-40 cm-es hosszúságban elhalnak. Csehországban alma hajtásokon figyelték meg ezeket a tünetet (Duchoslavová és mtsai. 2007). Ritchie (2000) szerint is ez a *M. fructicola* károsítása következtében alakulhat ki, Holb (2008) a *M. laxa* kórokozónál nem említi ezt a tünetet. A pomázi és gönci kajszi ültetvényekben kialakult kései hajtáselhaláshoz hasonló tünetek nem szerepelnek az irodalmakban. A *M. laxa* kórokozó hajtásnövekedés lezárulta után fertőzte meg a hajtáscsúcsot és a hajtás végén található leveleket, a fertőzés innen terjedt a hajtás idősebb részei felé. Véleményünk szerint a kórokozó sebzéseken vagy sérüléseken keresztül fertőzhette meg a hajtásokat, mert a *M. laxa* általában nem képes az ép epidermiszen keresztül megfertőzni a növényi szöveteket (Batra 1991).

A *M. linhartiana* kórokozó által fertőzött birs hajtásokon kialakuló tünetek megegyeztek a más szerzők által megfigyeltekkel (Alexandrescu és Morea 1964, Nevado és mtsai. 2011), azonban a virágok elhalását egyik esetben sem figyeltük meg (Schellenberg 1923, Moral és mtsai. 2011). A birsvirágok rothadását Prillieux és Delacroix (1893) említi. Schellenberg (1923) és Moral és mtsai. (2011) leírása alapján a fertőzött levelek a birsvirágokra emlékeztető illatot bocsájtanak ki,

amellyel a konídiumokat terjesztő rovarokat igyekeznek a levelekhez vonzani. Ezt a jelenséget Woronin (1880) figyelte meg először a rokon *Monilinia urnula* faj esetében.

***Monilinia* fajok morfológiai és tenyészbélyegei**

A *Monilinia* fajok azonosítása a morfológiai tulajdonságok alapján nem minden esetben egyértelmű (OEPP/EPPO 2009). A *M. laxa* és *M. fructicola*, valamint a *M. fructigena* és *M. polystroma* exogén sztrómáinak mérete és színe hasonló (van Leeuwen és mtsai. 2002), vizsgálataink során mi sem tudtuk a fajokat egyértelműen meghatározni csupán ezen tulajdonságok alapján.

A *M. linhartiana* kórokozónak megfigyeléseink alapján nincsenek exogén sztrómái, a konídiumláncok a levelek felszínén jönnek létre bevonat formájában. A legtöbb szerző nem említi sztróma megjelenését (Schellenberg 1923, Wormald 1926, Csorba és Berend 1965, Glits 1978, Alexandrescu és Morea 1964, Nevada és mtsai. 2011, Moral és mtsai. 2011), kizárólag Batra (1991) tesz említést monográfiájában a gomba exogén sztrómáiról.

A *M. linhartiana* kórokozó a konídiumláncok szerkezete alapján is elkülöníthető a *Juntoriae* alcsoportba tartozó fajoktól. Mikroszkóp segítségével megfigyeltük a konídiumok között található diszjunktórokat, melyeket már Woronin (1888) is említ. A konídiumok átlagos mérete és a diszjunktórok hosszúsága megegyezett Sumstine (1913), Berkhout (1923), Altinyay (1972) és Moral és mtsai. (2011) által közölt értékekkel.

A *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola* tenyészbélyegei megegyeznek az irodalmakban szereplő jellemzőkkel (Byrde és Willetts 1977, Barta 1991, OEPP/EPPO 2009). Az általunk gyűjtött *M. polystroma* izolátumok tenyészbélyegei van Leeuwen és mtsai. (2002) Japánból származó izolátumainak tenyészbélyegeire hasonlítanak a legjobban, a tenyészetek sugaras szerkezetűek, kezdetben világossárga színűek. A Petróczy és Palkovics (2009) által megfigyeltekkel ellentétben nem alakult ki nagymennyiségű légmicélium a tenyészetekben és a tenyészetek szerkezete sem homogén. Fekete sztromatikus képletek jelentek meg nagy mennyiségben a tenyészetekben, gyakran koncentrikus elrendeződésben, ahogy azt számos szerző említi (van Leeuwen és mtsai. 2002, Petróczy és Palkovics 2009, Martini és mtsai. 2014a, 2015). A sztromatikus képletek megjelenését a leoltást követő 7 napon belül tapasztaltuk, míg van Leeuwen és mtsai. (2002) és Petróczy és Palkovics (2009) 10-12 nap elteltével figyelték meg kialakulásukat.

A *M. linhartiana* kórokozó tenyészbélyegeiről kevés irodalmi forrás áll rendelkezésre (Berkhout 1923, Moral és mtsai. 2011). Tapasztalataink részben megegyeznek az általuk megfigyeltekkel, miszerint a kolóniák kezdetben fehér, világossárga színűek és a tenyésztésre a

PDA táptalaj a legmegfelelőbb. Ellentétben viszont Moral és mtsai. (2011) megfigyeléseivel a tenyészetek széle nem ép, hanem csipkés és mikrokónidiumok képződését sem figyeltük meg. A szerzők nem említik sztromatikus képletek megjelenését a tenyészetekben. A magyar izolátumok tiszta tenyészeiben apró, barna sztromatikus képletek jelentek meg, míg a török izolátumban ezek fekete színűek voltak és igen nagy mennyiségben képződtek.

***Monilinia* fajok molekuláris azonosítása**

A molekuláris azonosítás során a multiplex PCR módszer (Petróczy és mtsai. 2012) az irodalmakban szereplő hosszúságú termékeket emelte ki a fajokból: *Monilinia laxa* fajból 341 bp-t, *M. fructigena* fajból 360 bp-t, *M. fructicola* fajból 537 bp-t és *M. polystroma* fajból 476 bp-t. A *M. linhartiana* kórokozó polimorf régiójának hosszát vizsgálatunk során elsőként határoztuk meg, mind a négy izolátum esetében 342 bp hosszúságú volt. A birs monilíniás betegségének kórokozója a *M. laxa* fajtól a fragmentum hosszúsága alapján nem választható el, mert mindösszesen egy bázis köztük a különbség.

A *M. polystroma* és *M. linhartiana* izolátumokat ITS régiójuk bázis sorrendje alapján is azonosítottuk. A *M. polystroma* izolátumok teljes egyezést mutattak a nemzetközi adatbázisban található *M. polystroma* izolátumokkal a vizsgált referenciaszakaszon. Van Leeuwen és mtsai. (2002) az ITS1-5,8S riboszomális DNS- ITS2 régió 5 bázispárnyi különbsége alapján különítették el a fajt a *M. fructigena* fajtól. Izolátumainkban mind az 5 szubsztitúció megtalálható. A *M. linhartiana* faj vizsgálatakor az izolátumok a *M. linhartiana* faj külföldi izolátumai mellett a *M. aucupariae* faj izolátumaival is 99,8%-os hasonlóságot mutattak az ITS1-5,8S rDNS-ITS2 szakaszon. A 28S rDNS gén részletének vizsgálatakor saját *M. linhartiana* izolátumaink egymással mutatták a legnagyobb hasonlóságot, a *M. aucupariae* izolátumoktól elkülönültek.

A *Disjunctoriae* alcsoportba tartozó fajok azonosítását nagyban megkönnyíti gazdanövény preferenciájuk. Az almatermésűeket fertőző fajok mono- vagy oligofágok, azaz kizárólag egy fajt vagy egy nemzetség fajait képesek megfertőzni (Schellenberg 1923). A *M. linhartiana* faj kártételét kizárólag *Cydonia oblonga* fajon (Batra 1991, Farr és Rosmann 2015), míg a *M. aucupariae* fajt *Sorbus aucuparia* és *Sorbus commixta* fajokon figyelték meg (Farr és Rosmann 2015).

***Monilinia* fajok evolúciója és a fajok rokonsági viszonyai**

Wang és mtsai. (2006) a *Helotiales* rend filogenetikai viszonyainak vizsgálata során nehézségekbe ütköztek, mert a klasszikus és a molekuláris filogenetika eredményeit sokszor egymásnak ellentmondónak találták. Az ITS régió filogenetikai vizsgálatával kimutatták, hogy a

Ciborinia és a *Sclerotinia* nemzetségek egyes fajai közelebbi rokonsági viszonyban állnak egyes *Monilinia* fajokkal, mint a nemzetség tagjai egymással (Carbon és Kohn 1993, Holst-Jensen és mtsai. 1997).

Carbon és Kohn (1993) a *Sclerotiniaceae* családba tartozó 27 faj ITS régiójának vizsgálatakor nagyfokú hasonlóságot figyelt meg az ide tartozó nemzetségek és fajok között, ebből következett arra, hogy a család viszonylag későn alakult ki. Vizsgálatunk során a *Junctoriae* és *Disjunctoriae* alcsoportok mind a négy vizsgált régió szekvenciái alapján elkülönültek. Barta (1991) szerint a *Junctoriae* fajai ősből származásúak. Erre utal az is, hogy a *Rosaceae* család számos fajt képesek megfertőzni, könnyen terjednek és nincsenek a terjedésre speciálizálódott képleteik (diszjunktoraik). A következő evolúciós lépés a *Rosaceae* fajait fertőző *Disjunctoriae* alcsoport kifejlődése lehetett. Gazdanövénykörük szűkebb, megjelennek a diszjunktörök, valamint rovar vektorokra van szükségük, amelyeket illatanyagok kibocsájtásával vonzani képesek (Woronin 1880, Schellenberg 1923). Ezt követően a *Disjunctoriae* csoport új gazdanövénykörrel bővült, kialakultak az *Ericaceae* családot fertőző fajaik. Evolúciósan a legfejlettebbnek a *M. ledi* és a *M. alpina* fajt tartják (Batra 1991), melyek életciklusa szoros kapcsolatban áll a gazdanövényeik fejlődési stádiumával. Ennek a két fajnak két gazdanövényre van szüksége életciklusa befejezéséhez, aszkospóráinak képzését az egyik gazda fogékony növényi részeinek megjelenéséhez, konídiumainak képződését a másik gazda fogékony növényi részeinek megjelenéséhez igazítja (Batra 1991).

Bryde és Willets (1977) a *Monilinia* fajok őseit a *M. laxa* fajhoz tartja hasonlóknak, mert a faj világszerte elterjedt, nagyon változékony, nem alakultak ki területi vagy gazdanövényre specializálódott változatai (Fulton és mtsai. 1999, Gril és mtsai. 2008). Feltételezések szerint a *M. fructigena* és *M. fructicola* ebből a fajból alakult ki, mielőtt a *M. laxa* elveszítette az apotécium képző képességét (Bryde és Willets 1977). A *M. fructigena* és rokon fajai a *M. laxa*-szerű ős almatermésűekre specializálódott alfajából alakultak ki (Bryde and Willets 1977).

Kis interspecifikus és intraspecifikus különbségeket figyeltünk meg a *Monilinia* fajok vizsgált régióiban a korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Holst-Jensen és mtsai. 1997, Ioos és Frey 2000, Fulton és mtsai. 1999, Volkova és mtsai. 2013, Poniatowska és mtsai. 2015). A magyar izolátumok 5,8S rDNS génje teljes egyezést mutatott. A 28S rDNS génjében a változékonyság a *Junctoriae* és *Disjunctoriae* alcsoport fajai között jelent meg. Moral és mtsai. (2011) eredményeihez hasonlóan az ITS1 régióban nagyobb intraspecifikus változékonyságot mutattunk ki, mint az ITS2-ben.

Vizsgálatunk során a *Junctoriae* alcsoport fajai nagyfokú hasonlóságot mutattak. Az ITS1 - 5,8S rDNS - ITS2 régió alapján a *M. fructicola* és a *M. laxa*, valamint a *M. fructigena* és *M.*

polystroma fajok közelebbi rokonságban állnak egymással. A filogenetikai analízist a klasszikus mikológiai módszerek eredményei is alátámasztják. A fajok sztrómáinak színében és méretében, fertőzési ciklusában (virág és termés fertőző vagy csak termés fertőző), tenyészbélyegeiben szintén megfigyelhetőek hasonlóságok. Nagyfokú hasonlóságukat igazolja továbbá, az hogy a *M. polystroma* fajt csak 2002-ban különítették el a *M. fructigena* fajtól (van Leeuwen és mtsai. 2002).

Holst-Jensen és mtsai. (1997) Kanadából, Norvégiából és Dániából származó *M. laxa*, *M. fructigena* és *M. fructicola* izolátumait nem tudta elkülöníteni a 28S rDNS szekvenciája alapján. Filogenetikai vizsgálatunk során a *M. fructigena* izolátumok kismértékben különböztek, de a *M. laxa*, *M. fructicola* és *M. polystroma* izolátumok 100%-os azonosságot mutattak.

Fan és mtsai. (2010) ISSR markereket Gell és mtsai. (2007) RFLP markereket használtak fel *Monilinia* populációk genetikai diverzitásának megállapítására. Vizsgálataik alapján a *M. fructicola* és a *M. fructigena* fajok állnak közelebbi rokonságban, míg a *M. laxa* tőlük meglehetősen különbözik. Ezzel szemben Sződi és mtsai. (2012) hazai populációk mikroszatelit markerekkel történt vizsgálata során a *M. laxa* és *M. fructigena* kórokozók között szorosabb rokonságot állapították meg, mint a *M. fructicola* kórokozóval. A *cyp51* és a *tub2* gének filogenetikai elemzése alapján a saját *M. laxa* izolátumok is közelebbi rokonsági viszonyban állnak a *M. fructigena* fajjal, mint a *M. fructicola*-val.

Fungicidek hatékonysága

A *M. linhartiana* kórokozó ellen eredményeink alapján a következő hatóanyagok használatát javasoljuk: boszkalid+piraklostrobin, fludioxonil+ciprodinil, iprodion, kaptán, mankoceb, miklobutanil, prokloráz, propineb, tebukonazol+trifloxistrobin. A réztartalmú készítmények (réz(I)oxid, rézhidroxid, rézoxiklorid, tribázikus rézsulfát) gyakorlati dózisban megfelelően gátolták a kórokozó fejlődését, viszont hatékonyságuk tízszeres hígításban lecsökkent, így ezen készítmények kijuttatáskor fokozottan ügyelni kell a megfelelő borítottság elérésére és a dózis precíz beállítására. A szakirodalomban a kontakt hatóanyagokról fellelhetők vizsgálatok. Radman (1970) 0,25%-os kaptán és 0,2%-os rézoxiklorid keverék hatékonyságát vizsgálta. Megfigyelései szerint a virágzás kezdetétől 8-10 naponként négyszeri kezelés nem bizonyult megfelelő hatékonyságúnak. Sokkal jobb eredményt értek el, amennyiben a vegyszeres védekezést rügypattanástól kezdték el. Tafradzhiiski és Angelov (1977, 1979) a benomil hatóanyagot javasolják, akár három egymás utáni kezelésben is. Altinyay (1975) a thiuram és a kaptán hatóanyagokat találta hatékonynak. Popescu (2011) kísérlete során a virágzás előtti 1%-os rezes kezelés, valamint a virágzás alatti 0,3%-os cineb és virágzás után 0,03%-os miklobutanil hatóanyaggal történő permetezés csökkentette a fertőzés gyakoriságát és mértékét. Moral és mtsai.

(2011) részletesen vizsgálták a kórfolyamatot és véleményük szerint sem a virágfertőzés elleni védekezés a legmegfelelőbb. A szerzők szerint a levelek aszkospórás fertőződését kell megakadályozni, ezzel elkerülhető a virágokat fertőző konídiumok képződése.

Vizsgálatunk során a ciprodinil gyakorlati dózisa a *M. fructicola* és *M. linhartiana* tenyészetek növekedését jelentősen gátolta. A *M. laxa* tenyészetek 25%-a, a *M. fructigena* tenyészetek 89%-a fejlődött a hatóanyag jelenlétében, valamint mindkét *M. polystroma* izolátum. Fazekas (2014) a *M. laxa* tenyészetek növekedését tapasztalta a leoltást követő tizedik napon a gyakorlati dózis kétszeresének használata során. A tízszeres hígítás során a fungicid gátló hatása tovább csökkent, viszont a *M. fructicola* izolátumokra továbbra is fungicid hatású. A fludioxonil és ciprodinil hatóanyagú Switch hatékonysága kiemelkedő (Lantos és mtsai. 2013). A készítmény tízszeres hígításban is megfelelően gátolta a *M. laxa* és *M. fructicola* tenyészeteket. Emiry és mtsai. (2002) *M. fructicola* izolátumok vizsgálata során a kétkomponensű készítmények esetén a hatóanyagok egymást erősítő hatását figyelték meg. A *M. fructicola* fertőzése ellen szabadföldi és laboratóriumi hatásvizsgálatai alkalmával is hatékornak találta a ciprodinil és fludioxonil kombinációját Zidarič és mtsai (2011). Peric (2008) meggy ültetvényekben végzett kísérletei során a ciprodinilt közepes – magas hatékonyságúként értékeli *M. laxa* által károsított területeken. *Monilinia* fajokban nem mutattak ki a ciprodinil hatóanyaggal szembeni rezisztenciát, a FRAC közepesen kockázatos hatóanyagnak tartja a rezisztencia kialakulásának valószínűsége szempontjából (Brendt és Hollomon 2007a). A ciprodinil hatóanyag a hazai és külföldi eredményeket figyelembe véve igen perspektivikus, főleg a *M. fructicola* kórokozó elleni védekezésben.

***Monilinia* fajok benzimidazol rezisztenciája**

Hazánkban jelenleg a tiofanát-metil hatóanyag használható a benzimidazol-származékok közül. Régebben a karbendazim és benomil hatóanyagok is rendelkeztek engedéllyel. A benzimidazol-származékok kapcsán számos országban mutattak ki rezisztenciát (Lichou és mtsai. 2002, Ma és mtsai. 2003, 2005, Thomidis és mtsai. 2009, May-De Mio és mtsai. 2011, Weger és mtsai. 2011). Malandrakis és mtsai. (2012) felmérése alapján a görögországi *Monilinia laxa* populációk 37%-a rezisztens a benzimidazolokra. Egüen és mtsai. (2015) vizsgálatai alapján a spanyol *M. fructicola* populációk 95%-a rendelkezik rezisztenciával. Spanyolországban Egüen és mtsai. (2016) vizsgálatai alapján a *M. laxa* populációk 38%-a rendelkezett rezisztenciával 2006-ban, majd 2010-ben ez az érték már meghaladta a 90%-ot.

Vizsgálataink során 1 mg/l koncentrációban kevertük a hatóanyagot a táptalajokhoz, melyeken a *M. laxa* izolátumok 21%-a, *M. fructicola* izolátumok 88%-a, a *M. linhartiana*

izolátumok közül 2, a *M. fructigena* izolátumok és a *M. polystroma* izolátumok közül 1-1 indult fejlődésnek. Irodalmi adatok szerint azok a tenyészetek, amelyek 1 mg/l koncentrációban növekednek, rezisztenciával rendelkeznek (Ma és mtsai. 2003, 2005). Hazánkban több alkalommal végeztek vizsgálatot a hatóanyagokkal, azonban rezisztens populációk kialakulását korábban nem figyelték meg. Szödi és munkatársai (2008) vizsgálatai során a *M. laxa* és *M. fructigena* izolátumok növekedését minden esetben gátolta a benomil 2 mg/l-es koncentrációja. Fazekas (2014) vizsgálataiban, valamint korábbi saját eredményeim alapján (Lantos és mtsai. 2013) is érzékenynek bizonyultak a *M. laxa* és *M. fructigena* izolátumok. Mándoki és Varga (2011) módszerünkkel megegyezően 1 mg/l-es szinten vizsgálta a tiofanát-metil hatékonyságát és a 2008-ban gyűjtött *M. fructicola* izolátumok mindegyikét érzékenynek találták.

Azokat az izolátumokat, amelyek 1 mg/l-os dózis mellett fejlődésnek indultak, 50 mg/l-es dózison is vizsgáltuk. 50 mg/l koncentráción kizárólag *M. fructicola* izolátumok növekedtek: 15 izolátumból 13 indult fejlődésnek. Ezek az izolátumok magas szintű rezisztenciával rendelkeznek (Ma és mtsai. 2003). Hasonló, magas koncentráció jelenlétében is fejlődő *M. fructicola* izolátumot korábbi vizsgálatunk során is megfigyeltünk, ez az izolátum a tiofanát-metil készítmény gyakorlati dózisában (1000 mg/l) tesztelve is micéliumot fejlesztett és sporulált (Lantos és mtsai. 2013).

A rezisztencia molekuláris hátterének vizsgálatakor az 50 mg/l-es koncentráción fejlődő izolátumok β -tubulin génjében az E198A mutációt mutattuk ki. Ez a mutáció a *M. fructicola* izolátumokban alakult ki, amely során a GAA triplet GCA-ra cserélődött, így glutaminsav helyett alanin épült be a fehérjeláncba. Ez a *Monilinia* fajoknál leggyakrabban kialakuló mutáció, amely során magas szintű rezisztencia alakul ki (Ma és mtsai. 2003, Luo és mtsai. 2007, Weger és mtsai. 2011, Fan és mtsai. 2014), így elképzelhető, hogy a mutáció nem a helytelen európai növényvédő szer felhasználás miatt alakult ki, hanem Amerikából már rezisztens egyedek érkeztek és terjedtek el Európában. A másik négy *Monilinia* faj 198-as kodonjában a GAG bázishármas található, melyből szintén kialakulhat a magas rezisztenciát kódoló mutáció, itt a GAG triplet GCG-vé alakul, így szintén alanin épül be a mutáns egyedek fehérjeláncába (Malandrakis és mtsai. 2012). Az *Oculimacula yallundae* (Wallwork & Spooner) Crous & Gams kórokozónál megfigyelték, hogy a rezisztencia mértéke a beépülő aminosavtól is függ (Albertini és mtsai. 1999).

Az alacsony rezisztenciával rendelkező izolátumokban két pontmutációt azonosítottak, melyek felelősek az érzékenység csökkenésért. *M. fructicola* izolátumokban a 6-os aminosav mutációja következtében hisztidin helyett tirozin épül be a fehérjébe (Fan és mtsai. 2014, Ma és mtsai. 2003). A *M. laxa* izolátumoknál a 240-es aminosavat kódoló szekvenciában következik be szubsztitúció, így leucin helyett fenil-alanin transzlálódik (Ma és mtsai. 2003). Vizsgálataink során mi csak az érzékeny genotípushoz tartozó tripleteket mutattuk ki. Bár a mérgezett agarlemezen

végzett vizsgálatok eredményei alapján mind az öt *Monilinia* faj izolátumai között találhatók alacsony rezisztenciával rendelkező egyedek, de az érzékenység csökkenés hátterében nem a két, fent említett pontmutáció áll. A rendelkezésre álló szekvencia részlet más pontján sem találtunk olyan mutációt, amely felelős lehet az érzékenységcsökkenésért, így arra a következtetésre jutottunk, hogy amennyiben pontmutáció áll a hatékonyság csökkenés hátterében, akkor az a gén legvégén, az általunk nem vizsgált szakaszon található. A β -tubulin gén teljes szekvenciája nem ismert egyik *Monilinia* faj esetében sem, így nem tudjuk pontosan milyen hosszú a hiányzó génszakasz. A nemzetközi adatbázisban található β -tubulin szekvenciák közül csak kevés fajnál közölték a teljes gént: a *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomenes* Daniel, Tempelton, Sm. & Fox (U14138) β -tubulin génje 2424 bp hosszú, a *Gibberella pulicaris* (Kunze) Sacc. kórokozóé (AF484166) 1643 bp, a *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. fájé (D78154) 2287 bp, míg a *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler fájé (JQ314403) 1567 bp hosszúságú.

Az tiofanát-metil-M 70 WDG jelenleg a cseresznye, meggy, szilva ültetvényekben rendelkezik engedélykirattal, a monilíniás betegség elleni védelemben legkésőbb a virágzás végéig használható fel. A *M. fructicola* fertőzését a virágzás időszakában eddig még nem figyeltük meg, így a tiofanát-metil rezisztenciának gyakorlati jelentősége egyelőre csekély. Azonban az enyhe telek és az egyre melegebb tavaszi időjárás mellett, nem lehet kizárni, hogy akár már néhány éven belül kialakulhatnak a kórokozó számára kedvező időjárási feltételek a csonthéjasok virágzása alatt is.

Súlyos - *M. fructicola* okozta - termésfertőzést figyeltünk meg 2014 során soroksári, érdi és sóskúti őszibarack ültetvényekben, így elképzelhető, hogy a jövőben kémiai védekezés válik szükségessé a termésérés időszakban is. A rezisztencia kialakulása felhívja a figyelmet a folyamatos monitoring fontosságára a növényvédő szerek hatékonysága kapcsán. A *M. fructicola* ivaros szaporodásának köszönhetően sokkal jobb adaptációs képességgel rendelkezik (Bosshard és mtsai. 2006), mint a *M. laxa* vagy *M. fructigena* fajok, ezért a jövőben más hatóanyagokkal szemben is rezisztens *M. fructicola* populációk kialakulására számíthatunk nem megfelelő szerhasználat esetén.

A légzésgátló fungicidek hatékonysága a *Monilinia* fajokra

A szukcinát-dehidrogenáz inhibitorok és a quinon outside inhibitorok a gombák légzését gátolják. Ezen hatásmechanizmusú készítmények laboratóriumi hatásvizsgálatát megnehezíti, hogy az anyagcsere utak blokkolása esetén a légzés képes alternatív anyagcsere utakon tovább folytatódni, így a vizsgálat során hamis eredményeket kaphatunk (Grasso és mtsai. 2006, Fernández-Ortuño és mtsai. 2008). A strobilurinok esetén a szalicil-hidroxamát (SHAM)

táptalajhoz keverésével blokkolják az alternatív oxidázt, amely specifikusan ennek az enzimnek a működését gátolja (Olaya és Köller, 1999a, 1999b, Ziogas és mtsai. 1999, Avila-Adame és Köller, 2003, Zhang és mtsai. 2008). Spiegel és Stammer (2006) szerint azért szükséges blokkolni ezen respirációs utakat, hiszen a természetben elenyésző jelentőségük. Amiri és mtsai. (2010) és Hu és mtsai. (2011) *Monilinia* fajok vizsgálata során kimutatták, hogy a SHAM-ot nem szükséges a boszkaliddal mérgezett táptalajokhoz keverni, mert a gátlási eredményeket nem befolyásolja.

Vizsgálatunk során a boszkalid igen gyenge gátló hatást fejtett ki, a *M. laxa* és *M. fructicola* fajok esetén az átlagos gátlási % nem érte el a 40-et, a *M. fructigena* faj esetén a 10-et. Véleményünk szerint a gyenge eredmények okai nem a hatóanyag hatékonyságában keresendők, hanem a tesztelés módszerében. Amiri és mtsai. (2010) PDA táptalajon vizsgálta a légzésgátló fungicideket. Spiegel és Stammer (2006) dupla koncentrációjú élesztő és baktópepton tartalmú (YBA, Yeast Bacto Acetate medium) táptalajt használt. Hu és mtsai. (2011) részletesen vizsgálták a boszkalid hatékonyságának meghatározására alkalmas táptalajokat. A 9 kipróbált készítmény közül a minimális tápanyag tartalmú táptalajt (MM, minimal medium: glükóz, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, élesztő kivonat, agar) tartják a legmegfelelőbbnek, a jövőben ezt a táptalajt lenne célszerű alkalmazni a boszkalid vizsgálatára.

A piraklostrobin szintén gyengén gátolta a *M. laxa*, *M. fructigena* és *M. fructicola* tenyészetek fejlődését. Az azoxistrobin csökkent hatékonyságát mutattuk ki korábbi vizsgálatunk során (Lantos és mtsai. 2013). A strobilurinokkal szembeni csökkent érzékenység számos más tanulmányban is szerepel: Villani és Cox (2008), Amiri és mtsai. (2010), May De Mio és mtsai. (2011), Halbrecht és mtsai. (2013), Chen és mtsai. (2014). Más aszkuszos gomba nemzetségekben a citokróm B génben kialakuló pontmutációk felelősek a rezisztencia kialakulásáért (Kim és mtsai. 2003, Sierotzki és mtsai. 2007, Ishii és mtsai. 2011). Izolatmainkban a 129, 137 és a 143-as kodonok környezetének szekvencia sorrendjét határoztuk meg, viszont pontmutációt egyik kodonban sem mutattunk ki. Saját izolátumaink a 129-es és 143-as kodonok helyén ugyanazokat a tripletteket tartalmazták, mint Miessner és Stammer (2010) és Lou és mtsai. (2010) *Monilinia* izolátumai. A 137-es kodonban viszont Miessner és Stammer (2010) vizsgálatai szerint GCT bázishármas található a *M. laxa*, *M. fructigena* és *M. fructicola* fajoknál, míg Lou és mtsai. (2010) izolátumaiban és a magyar izolátumokban GGT triplet.

Hily és mtsai. (2010) szerint a *M. laxa* és *M. fructicola* fajoknál a magas szintű rezisztenciát kialakító G143A mutáció kialakulásának valószínűsége korlátozott, mert a beépülő új aminosav akadályozná az mRNS érését és funkcióképtelen fehérje jönne létre. Jiang és mtsai. (2009) viszont a *Botrytis cinerea* Pers. kórokozó rezisztenciáját vizsgálva azt figyelték meg, hogy ha a G143A mutáció létrejött a citokróm B génben, akkor közvetlenül a pontmutációt követő intron már nincs

jelen a génben. Lou és mtsai. (2010) valószínűsítik, hogy a *M. fructicola* faj minden egyedében megtalálható ez az intron. Vizsgálataink során mi is kimutattuk az intron jelenlétét az összes magyar *M. laxa* és *M. fructicola* izolátumban. A *M. fructigena* faj citokróm B génjében viszont nincs jelen intron közvetlenül a kodont követően (Miessner és Stammler 2010, saját adatok), így ennél a fajnál könnyebben alakulhat ki a mutáció.

Monilinia fajok triazol rezisztenciája

A triazol származékok közül számos készítmény engedélyezett hazánkban. A tebukonazol 0,1 ml/l-es koncentrációján számos izolátum fejlődésnek indult, míg a penkonazol 0,5 ml/l-es koncentrációja fungicid hatásúnak bizonyult. Irodalmi adatok alapján a tebukonazol elválasztó koncentrációja (0,1 ml/l) alacsonyabb (May-De Mio és mtsai. 2011), mint a penkonazolé (0,3 ml/l) (Luo és Schnabel 2008), amely a fungicidek eltérő hatékonyságából eredhet.

Megállapítottuk, hogy tebukonazol hatóanyag esetében a *Monilinia laxa* izolátumok 65%-a, a *M. fructigena* izolátumok 46%-a, a *M. fructicola* izolátumok 38%-a indult fejlődésnek, valamint további 1-1 *M. linhartiana* és *M. polystroma* izolátum. Ezek May-De Mio és munkatársai (2011) szerint rezisztens izolátumok. A korábbi évek hatásvizsgálatai során a penkonazol, prokloráz, miklobutanil és tebukonazol hatóanyagú készítmények kiváló hatékonyságúnak bizonyultak. A miklobutanil és a prokloráz esetében csak 1-1 *M. laxa* izolátum indult növekedésnek, másik két hatóanyag pedig fungicid hatást biztosított minden esetben (Mándoki és Varga 2011, Lantos és mtsai. 2013, Fazekas 2014).

A triazol-származékok két helyen gátolják a gombák anyagcseréjét: az α -demetiláz enzim működésénél és az ABC transzporterek működésénél. *Monilinia* fajoknál az α -demetiláz enzim promóterében azonosítottak egy beépülő szakaszt, amely a gén túltermelődéséért felelős. A Mona genetikai elemet kizárólag Észak-Amerika államaiban (Georgia, California, New York, Ohio) mutatták ki (Luo és mtsai, 2008, Villani és mtsai. 2012). Vizsgálatunk során nem azonosítottuk ezt az inzerciót a magyar izolátumokban. Ez vélhetően akkor vált volna lehetségessé, ha pont azokból az államokból kerültek volna hozzánk olyan rezisztens *M. fructicola* vonalak, amelyek hordozzák a Mona genetikai elemet. A *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. Hamamoto és mtsai. (2000), *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx Ma és Michailides (2005) *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter (Schnabel and Jones, 2001) esetén is kimutattak beépülő szakaszokat a *cyp51* gén promóter régiójába, amely rezisztenciát okozott, mi ilyent sem találtunk.

Monilinia fajok esetében mesterségesen (UV sugarakkal) indukálva létrehozták és kimutatták a *cyp51* génben a Y136F pontmutációt (Chen és mtsai. 2012). Megfigyeléseik szerint viszont azoknak az izolátumoknak, amelyek rezisztenssé váltak, csökkent a fitnesszük: lassabban

fejlődött a micéliumuk táptalajon, kisebb mértékű volt a sporuláció és a fertőzött gyümölcsökön is lassabban terjedt a lézió. Ezek az egyedek természetes körülmények között nem maradnának fenn, kisselektálódna. Chen és munkatársai (2012) azonban elképzelhetőnek tartják, hogy a pontmutáció kialakulása esetén a genomban bekövetkező további változásokkal életképes populációk jöhetnek létre, melyek rendelkeznek a triazol-rezisztenciával, hiszen számos faj esetén jön létre természetes úton mutáció a 136-os aminosavban. A *Blumeria graminis*, *Erysiphe necator*, *Mycosphaerella graminicola* és *M. fijiensis* fajok esetében például stabil populációk és erős rezisztencia alakul ki a mutáció megjelenésekor (Délye és mtsai. 1997, 1998, Leroux és mtsai. 2007, Canas-Gutierrez és mtsai. 2009).

Az izolátumaink *cyp51* génjében nem találtunk olyan pontmutációt, amely felelős lehet az érzékenység csökkenésért. A *M. fructicola* izolátumok 100%-os egyezést mutattak egymással és az adatbázisban található érzékeny genotípusok szekvenciáival. A *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. polystroma* és *M. linhartiana* izolátumokból nem állt külföldi adat rendelkezésünkre az összehasonlításhoz, így ezekből a fajokból további izolátumokat kell vizsgálni. Elképzelhetőnek tartjuk azt is, hogy az érzékenység csökkenésért felelős változás nem itt jön létre, hanem az ABC transzporter génekben. Schnabel és munkatársai (2003), valamint Luo és Schnabel (2008) vizsgálták a triazol rezisztencia kapcsán az ABC1 transzporter gént, viszont nem találtak benne a rezisztenciához köthető változást.

Az Észak-Amerikát (Amiri és mtsai. 2010, Chen és mtsai. 2013) követően Európában is megjelentek a multirezisztens *Monilinia* populációk (Egüen és mtsai. 2016). Vizsgálataink alapján a hazai *Monilinia* populációk a legtöbb engedélyezett hatóanyagra továbbra is érzékenyek, esetleg kisebb érzékenységcsökkenés alakult ki egyes szubpopulációkban. Eredményeink alapján hazánkban kizárólag a tiofanát-metil hatóanyagra rezisztens szubpopulációk találhatók, mely a jelenlegi termesztési és védekezési technológiák mellett csak mérsékelt veszélyt jelent a hazai almatermésű és csonthéjas termesztő ágazatra. A növényvédő szerek megfontolt és következetes alkalmazásával a jövőben is megőrizhetjük azok hatékonyságát, így biztosítva a megfelelő mennyiségű és minőségű hazai gyümölcs előállítását a fogyasztók számára.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A magyarországi ültetvényekben öt *Monilinia* faj kártételével számolhatunk, közülük kettő az utóbbi évtizedben került hazánkba. Az ültetvényben jelen lévő fajok ismerete fontos, mert meghatározzák a betegség elleni védekezés módszereit. Az új fajok megismerése mellett elengedhetetlen az őshonos fajok változásának nyomon követése is, mert korábbi kutatások kimutattak csökkent fungicid érzékenységgel rendelkező populációkat hazánkban. Kiemelkedően fontos a növényvédő szerek hatékonyságának hosszútávú megőrzése, hiszen alkalmazásuk feltétlenül szükséges a monilíniás betegség elleni védekezés során.

A *Monilinia* fajok gyakoriságának megállapításhoz Magyarország területének nagyrészt lefedő állományokból gyűjtöttünk fertőzött növényi részeket. 2012-2015 között összesen 556 alkalommal izoláltunk *Monilinia* fajt csonthéjas ültetvényekből, valamint néhány alkalommal almatermésű gazdanövényekről. Az izolátumokat morfológiai és tenyészbélyegek alapján, valamint molekuláris módszerekkel azonosítottuk. A *M. laxa* a leggyakoribb faj, csonthéjasok hajtásairól kizárólag ezt a fajt azonosítottuk. Hazánkban, egy átlagos évben a *M. laxa* faj a megbetegedések feléért felelős. A *M. fructicola* és *M. fructigena* károsítására 15-30%-ban számíthatunk évjáráttól függően, a *M. polystroma* azonban igen ritka. Vizsgálatunk során először azonosítottuk hazánkban a *M. polystroma* kórokozót érett alma- és szilvatermésekről. Eredményeink és a szakirodalom ismerete alapján hazánkban a *M. fructicola* és a *M. polystroma* fajok kártételének növekedésére számíthatunk.

A *M. linhartiana* kórokozót 4 alkalommal izoláltuk magyarországi birshajtásokról. Elsőként jellemeztük hazánkban a gomba morfológiai és tenyészbélyegeit. Igazoltuk patogenitásukat, majd 21 növényvédő szer hatékonyságát teszteltük a kórokozóra mérgezett agarlemez módszerrel. A *M. linhartiana* kórokozó ellen a következő hatóanyagok használatát javasoljuk: boszkalid+piraklostrobin, iprodion, kaptán, miklobutanil, prokloráz, propineb, tebukonazol+trifloxistrobin. A réz-tartalmú készítmények hatékonysága tízszeres hígításban lecsökkent, átlagosan nem érte el a 20%-ot sem. Így ezen készítmények kijuttatáskor fokozottan ügyelni kell a megfelelő borítottság elérésére és a dózis precíz beállítására.

A rezisztencia vizsgálatok során 7 hatóanyag hatékonyságát vizsgáltuk klasszikus agarlemez módszerrel, majd a benzimidazol, triazol és strobilurin hatóanyagokkal szemben kialakuló rezisztencia molekuláris hátterét is vizsgáltuk. A tiofanát-metil és tebukonazol készítményeket, valamint a boszkalid és piraklostrobin hatóanyagokat az érzékeny és rezisztens izolátumok elválasztására szolgáló dózisban alkalmaztuk. A ciprodinil, fenhexamid és penkonazol készítményeket a gyakorlatban is felhasznált dózisban, valamint annak tízszeres hígításában vizsgáltuk.

A fenhexamid és penkonazol készítmények fungicid hatást nyújtottak. A ciprodinil a *M. fructicola* és *M. linhartiana* izolátumait megfelelően gátolta, viszont a *M. laxa* izolátumok 25%-a, *M. fructigena* izolátumok 89%-a és mindkét *M. polystroma* izolátum csökkent érzékenységgel rendelkezett. A boszkalid hatóanyagok jelentésében az összes izolátum fejlődésnek indult, a fajok átlagos gátlása egyik esetben sem érte el a 40%-ot.

A *M. fructicola* izolátumok 19%-a, a *M. laxa* izolátumok 21%-a, a *M. linhartiana* izolátumok közül 2 db, a *M. fructigena* izolátumok és a *M. polystroma* izolátumok közül 1-1 db alacsony szintű tiofanát-metil rezisztenciával rendelkezett. Kizárólag a *M. fructicola* izolátumok között voltak olyanok, amelyek magas szintű rezisztenciával rendelkeznek (összesen 69%-uk). A magas szintű rezisztenciával rendelkező izolátumok β -tubulin génjében elsőként mutattuk ki hazánkban az E198A pontmutáció jelenlétét. Az alacsony rezisztenciával rendelkező izolátumok β -tubulin génjében viszont nem találtunk olyan változást, amely kialakíthatja az ellenállóságot. Arra a következtetésre jutottunk, hogy amennyiben pontmutáció áll a hatékonyság csökkenés hátterében, akkor az a gén vége felé, az általunk nem vizsgált szakaszon található.

A piraklostrobin hatóanyag jelenlétében a *M. laxa* izolátumok 44%-a, a *M. fructigena* izolátumok fele és az összes *M. fructigena* izolátum fejlődésnek indult. Korábbi vizsgálataink során az azoxistrobin csökkent hatékonyságát is kimutattuk. A strobilurin rezisztencia a citokróm B gén pontmutációi következtében alakul ki az aszkuszos gombáknál, viszont - hasonlóan a korábbi *Monilinia* fajokon végzett kutatásokhoz - a citokróm B génben nem találtuk meg a F129L, G137R, G143A mutációk egyikét sem.

A *M. laxa* izolátumok 65%-a, a *M. fructigena* izolátumok 46%-a a *M. fructicola* izolátumok 38%-a, valamint 2 db *M. linhartiana* és 1 db *M. polystroma* izolátum rendelkezik tebukonazol ellenállósággal. A 14 α -demetiláz enzim promóter régiójában, valamint teljes génjében nem találtunk olyan változást, amely felelős lehet az érzékenység csökkenésért. Elképzelhetőnek tartjuk azt is, hogy az érzékenység csökkenésért felelős változás nem itt jön létre, hanem az ABC transzporter génekben.

A jövőben a moníliás betegség elleni védekezés során várhatóan a termesztőknek további kihívásokkal kell majd szembenézniük. A fajok dominanciájának átrendeződésével, a *M. fructicola* tavaszi fertőzésének megjelenésével, vagy további rezisztens szubpopulációk hazánkba kerülésével ill. hazai kialakulásával a védekezési technológia átalakítására lehet szükség. A továbbiakban is folytatjuk a dominancia viszonyok változásának követését, a rezisztencia monitoringot, valamint új hatóanyagokat vonunk be a vizsgálatainkba, a hatékony védekezési stratégiák megőrzése érdekében.

7. SUMMARY

Five *Monilinia* species have been observed in Hungarian orchards, two of them were first reported in the last 10 years. Understanding the occurrence of various species and populations is relevant, because the presence of a species impacts the control measure strategies. Studying the biology, symptoms and life cycle of the recently appeared species is as important as monitoring the fungicide sensitivity of species that are present for a long time. Evidence of populations with reduced fungicide sensitivity was published before but resistant isolates were not found in Hungary before.

In our survey infected samples were collected all over Hungary. Between 2012-2015, *Monilinia* species were isolated 556 times from stone fruit hosts and occasionally from pome fruit hosts. Morphological and cultural characteristics were determined followed by molecular identification. *M. laxa* was the most frequent species. From the shoots and flowers of stone fruits exclusively this species was identified. *M. laxa* causes approx. half of the fruit rots, while *M. fructigena* and *M. fructicola* cause 15-30% of the fruit rots each year. *M. polystroma* was detected sporadically. *M. polystroma* was isolated for the first time from mature apple and plum fruits in Hungary. Considering previous results from other European countries, we expect increased future significance of *M. fructicola* and *M. polystroma*.

M. linhartiana was isolated four times from quince shoots in Hungary. The attributes of the conidial chains and the isolates were characterized in Hungary for the first time. Pathogenicity of the fungus was confirmed. Nineteen fungicides were tested by amended agar method. We recommend the application of the following pesticides against this pathogen: boscalid+piraklostrobin, iprodion, captan, miklobutanil, procloraz, propineb, tebuconazol+trifloxystrobin. The efficacy of the copper-containing fungicides was greatly reduced in 10 times dilution, inhibition did not exceed 20% in average, this is why special attention is needed to choose an efficient dose and to reach a complete spray coverage.

In fungicide resistance assays performance of 7 active ingredients were investigated, followed by the analysis of the molecular background of benzimidazole, triazole and strobilurin resistance in various *Monilinia* isolates. Fenhexamid and penconazol showed efficient fungicide performance on the isolates. Thiophanate-methyl and tebukonazol fungicides along with boscalid and pyraclostrobin fungicide active ingredients were tested in discriminatory doses. Those *Monilinia* isolates that are able to grow under these pesticide concentrations possess resistance. Ciprodinil, fenhexamid and penconazol were tested at field concentrations and also at tenfold dilution.

Fenhexamid and penconazol showed excellent fungicide effect in both dilutions. Ciprodinil blocked *M. fructicola* and *M. linhartiana* isolates, but not all *M. laxa*, *M. fructigena* and *M. polystroma* isolates. Boscalid could not inhibit the growth of any *Monilinia* isolate, the average inhibition of species did not reach even 40%.

19% of *M. fructicola*, 22% of *M. laxa*, 2 of the *M. linhartiana*, and 1-1 of the *M. polystroma* and *M. fructigena* isolates showed low resistance to thiophanate-methyl. Sixty-nine percent of *M. fructicola* isolates showed high resistance to thiophanate-methyl. The E198A point mutation in the beta-tubulin gene was first reported from Hungary by us in case of highly resistant *M. fructicola* isolates. Other point mutations, which could also result in resistance were not present in this gene. We assume that lower resistance caused by changes in beta-tubulin gene is probably located in the second part of the gene which we did not study.

Forty-four percent of *M. laxa* isolates, 50% of *M. fructicola* isolates and all of the *M. fructigena* isolates were able to grow on pyraclostrobin-containing plates. In previous studies we also found *M. laxa* isolates with reduced sensitivity to azoxistrobin. Generally, strobilurin resistance is caused by mutations in the cytochrome B gene, but we could not detect any of the F129L, G137R or G143A mutations.

Sixty-five percent of *M. laxa*, 46% of *M. fructigena*, 38% of *M. fructicola* isolates and 2 of the *M. linhartiana* and 1 of the *M. polystroma* isolates showed reduced sensitivity to tebuconazole. Neither the promoter region nor the full sequence of the α -demethylase gene contained any variations, which could be responsible for reduced sensitivity. Unlike in the American populations the mutation does not appear in this gene, but more likely in the ABC transporter genes.

Probably monilinia disease will cause further difficulties for the farmers in the future. The control strategies would have changed by the changes of the dominancy, or the appearing of the flower infection of *M. fructicola* in Hungary, or other resistant subpopulations can show up. The next years dominancy monitoring and fungicide efficacy studies will go on, supplemented with other active ingredients as well.

8. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Irodalomjegyzék

1. Ábrahám R, Érsek T, Kuroli G, Németh L és Reisinger P (2011): Növényvédelem. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem. 79–80.
2. Aderhold RFT und Ruhland W (1905): Zur Kenntnis der Obstbaum-Sklerotiniën. Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 4(5): 427–442.
3. Agrios GN (1978): Plant Pathology (2th Edition). London. Academic Press. 631–640.
4. Albertini C, Gredt M and Leroux P (1999): Mutations of the b-tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yellundae* and *Tapesia acutormis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 64: 17–23.
5. Alexandrescu A and Morea I (1964): Contributii la studiul bolilor si combaterii ciupercii *Monilinia linhartiana* /Prill.et Delacr./ Honey. Annalele sectiei de Protectia Plantelor, 3: 115–125.
6. Altinyay N (1972): Investigations on the biology situation and chemical control of *Monilinia linhartiana* Prill. et Dell. on the quinces in Amasya. Yeni Desen, Ankara 44.
7. Altinyay N (1975): Amasya ve Samsun illerinde ayvalarda zarar yapan *Monilia linhartiana* Prill. et Del'in apothec olusumu uzerinde arastirmalar. Bitki Koruma Bülteni, 15(3): 139–161.
8. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. (1990): Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215(3): 403–10.
9. Amiri A, Brannen PM and Schnabel G (2010): Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. Plant Disease, 94: 737–743.
10. Avila-Adame C and Köller W (2003): Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides. Pest Management Science, 59: 303–309.
11. Balogh S és Kovács V (1974): Növényvédelmi technológiák. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. 238.
12. Batra LR (1979): First authenticated North American record of *Monilinia fructigena*, with notes on related species. Mycotaxon, 8(2):476–484.
13. Batra LR (1983): *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Sclerotiniaceae): Its Biology on Blueberry and Comparison with Related Species. Mycologia, 75(1): 131–152.
14. Batra LR (1991): World species of *Monilinia* (Fungi): Their ecology, biosystematics and control. Mycologia Memoir, 16: 135.
15. Batra LR and Harada Y (1986): A Field Record of Apothecia of *Monilinia fructigena* in Japan and Its Significance. Mycologia, 78(6): 13.

16. Baura GT, Szaro M and Bruns TD (1992): *Gastrosuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. *Mycologia*, 84: 592–597.
17. Belbahri L, McLeod A, Paul B, Calmin G, Moralejo E, Spies CFJ, Botha WJ, Clemente A, Descals E, Sánchez-Hernández EE and Lefort F (2008): Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (*Pythiaceae*). *FEMS Microbiology Letters*, 284 (1): 17–27.
18. Berkhout CM (1923): De Schimmelgeslachten *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *Torula*. Doctorate Thesis, Published by University of Utrecht. 12–35.
19. Bertram HE (1916): A study of the brown rot fungus in northern Vermont. *Phytopathology*, 6: 71–78.
20. Biggs AR, Hickey KD and Yoder KS (1995): Brown Rot - *Monilinia fructicola*. In: Hogmire HW (Ed.): Mid-Atlantic Orchard Monitoring Guide. NRAES. New York, USA. 25.
21. Boehm EWA, Ma Z and Michailides TJ (2001): Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. *Phytopathology*, 91: 428–439.
22. Bosshard E, Hilber-Bodmer M, Schärer H-J, Bünter M and Duffy B (2006): First report of the quarantine brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on imported stone fruits in Switzerland. *Plant Disease*, 90: 1554.
23. Box GEP and Cox DR (1964): "An analysis of transformations". *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 26(2): 211–252.
24. Brent KJ and Hollomon DW (2007a): Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph No. 1 (2nd, revised edition) Fungicide Resistance Action Committee, Brüssel, Belgium. 5–46.
25. Brent KJ and Hollomon DW (2007b): Fungicide resistance: The assessment of risk FRAC Monograph No. 2 (second revised edition), Fungicide Resistance Action Committee. 1–28.
26. Brooks C, Bratley CO and McColloch LP (1936): Transit and storage diseases of fruits and vegetables as affected by initial carbon dioxide treatments. U.S. Department of Agriculture Bulletin, 519: 23.
27. Bubán T, Glits M, Gonda I, G. Tóth M, Harmat L, Hrotkó K, Kállay T, Nyéki J, Papp J, Péntes B, Porpáczy A, Simon G, Sipos BZ, Soltész M, Szabó L, Szabó Z, Szalay L, Timon B, Tóth T és Vályi I (2004): Szilva. In Pap J (szerk): A gyümölcsök termesztése 2. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 197.
28. Byrde RJW and Willets HJ (1977): The brown rot fungi of fruit. Their biology and control. Pergamon Press. Oxford. 156–377.
29. CABI (2016): *Monilia polystroma* (Asiatic brown rot) Datasheet. Systematic Mycology & Microbiology Laboratory, USDA-ARS, USA. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/34755#20113091538>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: *Monilia polystroma* Datasheet. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.

30. Campbell CL and Madden LV (1990): Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York, USA. 10-12.
31. Canas-Gutierrez GP, Angarita-Velasquez MJ, Restrepo-Florez JM, Rodríguez P, Moreno CX and Arango R (2009): Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. Pest management science, 65(8): 892–899.
32. Capote N, Pastrana AM, Aguado A and Sánchez-Torres P (2012): Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: Cumagun CJ (Ed.): Plant pathology. 151–202. <http://www.intechopen.com/books/plantpathology/molecular-tools-for-detection-of-plant-pathogenic-fungi-and-fungicide-resistance> Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.
33. Carbone I and Kohn L (1993): Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the *Sclerotiniaceae*. Mycologia, 85: 415–427.
34. Chalkley D (2016): Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Invasive Fungi. Asiatic brown fruit rot - *Monilia polystroma*. <http://sbmlweb/fungi/index.cfm>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Asiatic brown fruit rot. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.
35. Chen F, Liu X, Chen S, Schnabel E and Schnabel G (2013): Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid. Plant Disease, 97:645–651.
36. Chen SN, Shang Y, Wang Y, Schnabel G, Lin Y, Yin LF and Luo CX (2014): Sensitivity of *Monilinia fructicola* from peach farms in China to four fungicides and characterization of isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin. Plant Disease, 98: 1555–1560.
37. Christen R (1994): Molecular phylogeny and the origin of Metazoa. In: Bengtson S (ed.): Early Life on Earth, Nobel symposium No. 84, Columbia University Press, New York. 467–474.
38. Côté M J, Tardif MC and Meldrum AJ (2004): Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* and *M. polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. Plant Disease, 99 (11): 1219–1225.
39. Cox KD, Bryson PK and Schnabel G (2007): Instability of propiconazole resistance and fitness in *Monilinia fructicola*. Phytopathology, 97:448–453.
40. Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V and Stegehuis G (2004): "MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century" (PDF). Studies in Mycology, 50: 19–22.
41. Csorba Z és Berend I (1965): Ascomycetes. In: Ubrizsy G (szerk.): Növénykórtan II. Akadémiai Kiadó, Budapest. 286.
42. De Cal A and Melgarejo P (1999): Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. Plant Disease, 83(1): 62–65.
43. De Cal A, Gell I, Usall J, Viñas I and Melgarejo P (2009): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in peach orchards in Ebro Valley, Spain. Plant Diseases, 93: 763.

44. De Cal A, Egüen B and Melgarejo P (2014): Vegetative compatibility groups and sexual reproduction among Spanish *Monilinia fructicola* isolates obtained from peach and nectarine orchards, but not *Monilinia laxa*. Fungal Biology, 118(5-6): 484–494.
45. De Waard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeek HJ, Stergiopoulos I and Zwiers LH (2006): Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. Pest Management Science, 62: 195–207.
46. Delmotte F, Bucheli E and Shykoff JA (1999): Host and parasite population structure in a natural plant–pathogen system. Heredity, 82: 300–308.
47. Délye C, Laigret F and Corio-Costet MF (1997): A mutation in the 14 α - demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. Applied and Environmental Microbiology, 63: 2966–2970.
48. Délye C, Bousset L and Corio-Coste MF (1998): PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a ‘recalcitrant’ fungus. Current Genetics, 34: 399–403.
49. Dernoeden PH (2012): Creeping Bentgrass Management (2nd Edition). CRC Press. Boca Raton, London, New York. 222.
50. Dimova M and Titjnov M (2013): Control of early brown rot - blossom blight in sour cherry caused by *Monilia laxa*. IV International Symposium „Agrosym 2013“. 3-6 October 2013, Jahorina, Bosnia and Herzegovina. 573–577.
51. Dovas C, Skylakakis G and Georgopoulos SG (1976): The adaptability of the benomyl-resistant population of *Cercospora beticola* in Northern Greece. Phytopathology, 66: 1452–1456.
52. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D and Rambaut A (2012): Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 Molecular Biology And Evolution 29: 1969–1973.
53. Dula B (2007): A fungicidrezisztencia kérdésköre, különös tekintettel a liztharmatgombákra. Növényvédelem, 43(6): 253–259.
54. EFSA (2011): European Food Safety Authority: Pest risk assessment of *Monilinia fructicola* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. EFSA Journal, 9(4): 2119.
55. Egüen B, Melgarejo P and De Cal A (2015): Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodione, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. European Journal of Plant Pathology, 141: 789–801.
56. Egüen B, Melgarejo P and De Cal A (2016): The effect of fungicide resistance on the structure of *Monilinia laxa* populations in Spanish peach and nectarine orchards. European Journal of Plant Pathology. DOI 10.1007/s10658-016-0871-4
57. Elliott ME (1974): *Monilinia fructicola*. Fungi Canadenses. 38: 1–2.
58. EPPO Reporting Service (2011): First reports of *Monilia polystroma* in Hungary and the Czech Republic. No. 6. <http://invasivespeciesireland.com/wp-content/uploads/2011/07/Rse->

1106.pdf Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: *Monilia polystroma* in Hungary. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.

59. EPPO Reporting Service (2016): EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests as approved by EPPO [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02\(24\)_A1A2_2015.pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02(24)_A1A2_2015.pdf)

Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: EPPO Reporting Service quarantine. Lekérdezés időpontja: 2016.08.25.

60. EPPO/CABI (1997): Quarantine Pests for Europe (2nd edition). In: Smith IM, McNamara DG, Scott PR and Holderness M. (Eds.): CABI, Wallingford, UK, 1425. <http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm> Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Quarantine Pests for Europe. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.

61. Faes H. and Staehelin M. (1924): La maladie cryptogamique des abricotiers en Valais: *Stromatinia/Sclerotinia/Monilia laxa* Ehrenberg. Station fédérale d'essais viticoles à Lausanne, Bern. 1–23.

62. Fan JY, Guo LY, Xu JP, Luo Y and Michailides TJ (2010): Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from china. Journal of Eukaryotic Microbiology, 57: 206–212.

63. Fan J, Luo Y, Michailides TJ and Guo L (2014): Simultaneous quantification of alleles E198A and H6Y in the β -tubulin gene conferring benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* using a duplex real-time (TaqMan) PCR. Pest Management Science, 70(2): 245–51.

64. Farr DF and Rossman AY (2015): Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved June 17, 2015, from <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/SystematicMycologyandMicrobiologyLaboratoryFungus-HostDistributionsDatabase>. June 17, 2015. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

65. Fawcett CH and Spencer DM (1966): Antifungal compounds in apple fruit infected with *Sclerotinia fructigena*. Nature, 211: 548–549.

66. Fazekas MÉ (2014): *Monilinia* gombafajok genetikai variabilitásának, járványbiológiájának, az ellenük való védekezés lehetőségeinek és fungicid-rezisztencia vizsgálatának egyes aspektusai. Doktori (PhD) értekezés, Debrecen: 33–37.

67. Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A and Pérez-García A (2008): Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. International Microbiology, 11(1): 1–9.

68. Fogle HW and Faust M (1975): Ultrastructure of nectarine fruit surfaces. Proceedings of the Society for Horticultural Science, 100: 74–77.

69. Fogle HW and Faust M (1976): Fruit growth and cracking in nectarines. Journal of the American Society for Horticultural Science, 101: 434–439.

70. Förster H and Adaskaveg JE (2000): Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. Phytopathology, 90: 171–178.

71. FRAC (2014): FRAC: Pathogen Risk List. <http://www.frac.info/docs/defaultsource/publications/pathogen-risk/pathogen-risklist.pdf?sfvrsn=Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: FRAC: Pathogen Risk List. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.>
72. Free SJ, Holtz BA and Michailides TJ (1996): Mating behavior in field populations of *Monilinia fructicola* in California. *Mycologia*, 88: 208–211.
73. Fulton CE and Brown AE (1997): Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *FEMS Microbiology Letters*, 157: 307–312.
74. Fulton CE, Van Leeuwen GCM and Brown AE (1999): Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brownrot of stone and pome fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 495–500.
75. Garic R, Stamenkovic S and Canak M (1990): The effect of *Cydia molesta* on the incidence of *Monilinia* spp. on quince fruits. *EPPO Bulletin*, 20(4): 603–606.
76. Gelfand AE and Smith AFM (1990): Sampling-based approaches to calculating marginal densities. *Journal of the American Statistical Association*, 85: 398–409.
77. Gell I, Larena I and Melgarejo P (2007): Genetic Diversity in *Monilinia laxa* Populations in Peach Orchards in Spain. *Journal of Phytopathology*, 155: 549–556.
78. Glits M (1978): A gyümölcsfélék betegségei. In: Glits M, Folk GY és Imre K: Növénykórtan II. Kertészeti Egyetem Egyetemi jegyzet. Budapest. 5.
79. Glits (2000): Gyümölcsfélék betegségei. In: Glits és Folk: Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 201–250.
80. Gólya G (2002): Csonthéjsaok moníliaas betegségei. *Kertészet és szőlészet*, 51: 19–23.
81. Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A and Gisi U (2006): Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science*, 62(6): 465–72.
82. Gril T, Celar F, Munda A, Javornik B and Jakse J (2008): AFLP Analysis of Intraspecific Variation Between *Monilinia laxa* Isolates. *Plant Disease*, 92(12): 1616–1624.
83. Gril T, Celar F, Javornik B and Jakse J (2010): Fluorescent AFLP fingerprinting of *Monilinia fructicola*. *The Journal of Plant Diseases and Protection*, 117: 168–172.
84. Gróf B és Révy D (1929): Növénykórtan. Pátria Irodalmi Vállalat és Nyomdai Résvénytársaság. Budapest. 61–64.
85. Guan J, Braks HMJ, Derkenaar S and deWaard MA (1992a): Interaction of microsomal cytochrome P450 isozyme isolated from *Penicillium italicum* with DMI fungicides, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 42: 24–34.

86. Guan J, Stehmann C, Ellis SW, Kerkenaar A and deWaard MA (1992b): Ergosterol biosynthesis in a cell-free preparation of *Penicillium italicum* and its sensitivity to DMI fungicides, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 42: 262–270.
87. Halbrendt NO, Ngugi HK, Magdama F and Jimenez-Gasco M (2013): Multi-drug resistance to site-specific fungicides in populations *Monilinia fructicola* in Pennsylvania orchards. APS - MSA Joint Meeting. 2013. Augustus 10-14. Austin, Texas, USA: 220.
88. Hall R (1963). Cytology of the asexual stages of the australian brown rot fungus *Monilinia fructicola*. *Cytologia* (Tokyo), 28: 181–193.
89. Halpern AL and Bruno WJ (1998): "Evolutionary distances for protein-coding sequences: modeling site-specific residue frequencies". *Molecular Biology and Evolution*, 15(7): 910–917.
90. Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, Lee YJ, Makizumi Y, Akutsu K and Hibi T (2000): Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14a-demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 3421–3426.
91. Harada Y (1977): Studies on the Japanese species of *Monilinia* (*Sclerotiniaceae*). *Fac. Agric. Hirosaki Univ. Bulletin*, 27: 30–109.
92. Heald FD (1933): *Manual of Plant Diseases*. New York and London: McGraw-Hill Book Company. 540.
93. Hewitt WB and Leach LD (1939): Brown rot Sclerotinias occurring in California and their distribution on stone fruits. *Phytopathology*, 29: 337–351.
94. Hilber-Bodmer M, Schärer H-J, Bünter M and Duffy B (2006): First Report of the Quarantine Brown Rot Pathogen *Monilinia fructicola* on Imported Stone Fruits in SwitzerlandE. Bosshard. *Plant Disease*, 90(12): 1554.
95. Hilber-Bodmer M, Bunter M and Patocchi A (2010): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on apricot in a Swiss orchard. *Plant Disease*, 94(5): 643.
96. Hily JM, Singer SD, Villani SM and Cox KD (2011): Characterization of the cytochrome b (cyt b) gene from *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruit and its significance in the development of QoI resistance. *Pest Managenent Science*, 67(4): 385–396.
97. Hoffman G (1974): Zum Vorkommen von Heterokaryose bei *Monilinia laxa*. *Journal of Phytopathology*, 79: 193–202.
98. Holb IJ (2003): The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.): I. Important features of their biology. *International Journal of Horticultural Science*, 9: 23–36.
99. Holb IJ (2004): The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.): III. Important features of their disease control. *International Journal of Horticultural Science*, 10(4): 31–49.
100. Holb IJ (szerk.) (2005): A gyümölcsösök és s szőlő ökológiai növényvédelme. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 163.

101. Holb IJ (2008): Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance, and biological control. *International Journal of Horticultural Science*, 14 (3): 15–21.
102. Holb IJ and Schnabel G (2005): Effect of Fungicide Treatments and Sanitation Practices on Brown Rot Blossom Blight Incidence, Phytotoxicity, and Yield for Organic Sour Cherry Production. *Plant Diseases*, 89(11): 1164–1170.
103. Holb IJ, Szoke S and Abonyi F (2013): Temporal development and relationship amongst brown rot blossom blight, fruit blight and fruit rot in integrated and organic sour cherry orchards. *Plant Pathology*, 62: 799–808.
104. Holst-Jensen A, Kohn L, Jakobsen K and Schumacher T (1997): Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia* (*Sclerotiniaceae*) based on coding and noncoding rDNA sequences. *American Journal of Botany*, 84: 686–701.
105. Holtz BA, Michailides TJ and Hong CX (1998): Development of apothecia from stone fruit infected and stromatized by *Monilinia fructicola* in California. *Plant Diseases*, 82: 1375–1380.
106. Honey EE (1928): The monilioid species of *Sclerotinia*. *Mycologia*, 20: 127–157.
107. Honey EE (1936): North American species of *Monilinia*. I. Occurrence, grouping, and life-histories. *American Journal of Botany*, 23: 100–106.
108. Hsiang T, Yang L and Barton W (1997): Baseline sensitivity and cross-resistance to demethylation-inhibiting fungicides in Ontario isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*, *European Journal of Plant Pathology*, 103(5): 409–416.
109. Hu M, Cox KD, Schnabel G and Luo C (2011): *Monilinia* species causing brown rot of peach in china. *PLoS ONE* 6, e24990. doi:10.1371/journal.pone.0024990
110. Ioos R and Frey P (2000): Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 373–378.
111. Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Noguchi K, Nishimura K, Takeda T, Amano T and Hollomon DW (2001): Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*, 91: 1166–1171.
112. Jansch M, Frey JE, Hilber-Bodmer M, Broggini GAL, Weger J, Schnabel G and Patocchi A (2012): SSR marker analysis of *Monilinia fructicola* from Swiss apricots suggests introduction of the pathogen from neighbouring countries and the United States. *Plant Pathology*, 61(2): 247–254.
113. Jiang J, Ding L, Michailides TJ, Li H and Ma Z (2009): Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93: 72–76.
114. Josepovits GY (1991): Növénybetegségek – Fungicid rezisztencia. *Növényvédelem*, 27(8): 337–343.
115. Kállay T és Szenci GY (2009): A magyar meggytermesztés kilátásai. *Kertgazdaság*, 1: 35.

116. Kaptás T (1994): A szőlő szürkerothadásáról. Gyakorlati Agroforum, 5: 22–23.
117. Karaoglanidis GS and Thanassoulopoulos CC (2002): Phenotypic instability of *Cercospora beticola* sacc. strains expressing resistance to the sterol demethylation-inhibiting (DMI) fungicide flutriafol after cold exposure. Journal of Phytopathology, 150: 692–696.
118. Karova V (1974): Proucsvanija vörhu *Monilinia laxa* Ehr. i Bioetologia. Gradin. Loz. Nauka Szofija. 11(2): 27–33.
119. Katan T, Shabi E and Gilpatrick JD (1983): Genetics of resistance to benomyl in *Venturia inaequalis* isolates from Israel and New York.- Phytopathology, 73: 600–603.
120. Katoh K, Misawa K, Kuma K and Miyata T (2002): MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Research, 30: 3059–3066.
121. Katoh K, Kuma K, Toh H and Miyata T (2005): MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Research, 33: 511–518.
122. Kern H (1912): A gyümölcsfák monilia-betegsége. Pallas könyvsajtó. Budapest. 1–2.
123. Kim YS, Dixon EW, Vincelli P and Farman ML (2003): Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. Phytopathology, 93: 891–900.
124. Kimura J (1962): Studies on the Monilia disease of the apple caused by *Sclerotinia mali* Takahashi. Aomori Apple Exp. Stn. Bull, 6: 1–87.
125. Kiss A (2007): Új *Monilia* faj veszélyezteti a gyümölcsösöket. Agroforum, 18(8): 34–35.
126. Koenraadt H, Somerville SC and Jones AL (1992): Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plani pathogenic fungi. Phytopathology, 82: 1348–1354.
127. Kuck KH and Russell PE (2006): FRAC: Combined resistance risk assessment. Aspects of Applied Biology, 78: 3–10.
128. Kurtzman CP and Robnett CJ. (1997): Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. Journal of Clinical Microbiology, 35(5): 1216–23.
129. Lantos A, Petrőczy M, Erdélyi É és Palkovics L (2013): *Monilia laxa* és *Monilia fructicola* izolátumok fungicidekkel szembeni érzékenysége. Növényvédelem, 49 (7): 297–304.
130. Larena I, Torres R, De Cal A, Liñán M, Melgarejo P, Domenichini P, Bellini A, Mandrin JF, Lichou J, Ochoa de Eribe X and Usall J (2005): Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoecum nigrum*. Biological Control, 32: 305–310.

131. Leroux P, Albertini C, Gautier A, Gredt M and Walker AS (2007): Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 63: 688–698.
132. Leroux P, Chapeland F, Desbrosses D and Gredt M (1999): Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, 18: 687–697.
133. Li JL, Wu FC and Zhu FX (2015): Fitness is Recovered with the Decline of Dimethachlon Resistance in Laboratory-induced Mutants of *Sclerotinia sclerotiorum* after Long-term Cold Storage *Plant Pathology Journal*, 31(3): 305–309.
134. Lichou J, Mandrin JF, Breniaux D, Mercier V, Giauque P, Desbrus D, Blanc P, Belluau E (2002): Une nouvelle moniliose. *Phytoma. La Defense des Vegetaux.*, 547: 22-25.
135. List (2012): List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides. Qoi Working Group, FRAC. <http://www.frac.info>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: field resistance towards QoI. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.
136. Luo CX and Schnabel G (2008): The cytochrome P450 lanosterol 14- α demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide re-sistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 359-366.
137. Luo Y, Ma Z and Michailides TJ (2007a): Quantification of allele E198A in betatubulin conferring benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* using real-time PCR. *Pest Management Science*, 63: 1178–1184.
138. Luo Y, Ma Z, Reyes HC, Morgan D and Michailides TJ (2007b): Quantification of airborne spores of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards of California using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 145–154.
139. Luo CX, Cox KD, Amiri A and Schnabel G (2008): Occurrence and Detection of the DMI Resistance-Associated Genetic Element ‘Mona’ in *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, 92(7): 1099–1103.
140. Luo CX, Hu MJ, Jin X, Yin LF, Bryson PK and Schnabel G (2010): An intron in the cytochrome b gene of *Monilinia fructicola* mitigates the risk of resistance development to QoI fungicides. *Pest Management Science*, 66: 1308–1315.
141. Luo Y, Morgan DP and Michailides TJ (2001): Risk Analysis of Brown Rot Blossom Blight of Prune Caused by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology*, 91(8): 759–68.
142. Ma Z and Michailides TJ (2005): Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi *Crop Protection*, 24: 853–863.
143. Ma ZH, Yoshimura MA and Michailides TJ (2003): Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:7145–7152.

144. Ma ZH, Yoshimura MA, Holtz BA and Michailides TJ (2005): Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Management Science*, 61:449–457.
145. Malandrakis AA, Markoglou AN and Ziogas VN (2012). PCR-RFLP detection of the E198A mutation conferring resistance to benzimidazoles in field isolates of *Monilinia laxa* from Greece. *Crop Protection*, 39: 11–17.
146. Malloch D and Cain RF (1971): The genus *Kernia*. *Canadian Journal of Botany*, 49(6): 855–867.
147. Mándoki A és Varga A (2011): Súlypontos gombabetegségek hazánk meggyültetvényeiben. *Országos mezőgazdasági szakfolyóirat*, 15(4): 12–13.
148. Maniatis T, Sambrook J and Fritsch EF (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1–250.
149. Maring E and Lienshöft H (2011): Kutatások a csonthéjasok moníliafajtái leküzdésében. *Zöldség- Gyümölcs Piac és Technológia*. 15(6): 9–10.
150. Martini C, Lantos A, Di Francesco A, Guidarelli M, Baraldi E and Mari M (2014a): *Monilinia* spp. causing brown rot of pome and stone fruits in Italy. 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology. Kraków, 2014. szeptember 8–13: 170.
151. Martini C, Lantos A, Di Francesco A, Guidarelli M, D’Aquino S and Baraldi E (2014b): First Report of Asiatic Brown rot caused by *Monilinia polystroma* on Peach in Italy. *Plant Disease*, 98(11): 1585.
152. Martini C, Di Francesco A, Lantos A and Mari M (2015): First Report of Asiatic Brown rot (*Monilinia polystroma*) and Brown rot (*Monilinia fructicola*) on Pears in Italy. *Plant Disease*, 99(4): 556.
153. May-De Mio L, Luo Y and Michailides T (2011): Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. *Plant Disease*, 95: 821–827.
154. McDonald BA (1997): The population genetics of fungi: Tools and techniques. *Phytopathology*, 87: 448–453.
155. McDonald BA and Linde C (2002): Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *The Annual Review of Phytopathology*, 40: 349–379.
156. McKay GJ, Egan D, Morris E and Brown AE (1998): Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. *Mycological Research*, 102: 671–676.
157. McLaren GF, Fraser JA and Lynch DG (1996): An evaluation of sulphur for brown rot control in Central Otago stone fruit. *Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference*, 49: 32–36.

158. Mező G és Schweigert A (2005): Rendszeres megelőző védekezések a meggy moniliás betegsége ellen. Gyakorlati Agrofórum, 16(1): 33–34.
159. Michailides TJ and Morgan DP (1997): Influence of fruit-to fruit contact on the susceptibility of French prune to infection by *Monilinia fructicola*. Plant Disease, 81: 1416–1424.
160. Michailides TJ, Ogawa JM and Opgenorth DC (1987): Shift of *Monilinia* spp. and distribution of isolates sensitive and resistant to benomyl in California prune and apricot orchards. Plant Disease, 71: 893–896.
161. Miessner S and Stammer G (2010): *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. Journal of Plant Diseases and Protection, 117 (4): 162–167.
162. Mónus B. Gyöngyössi M és Kerekes B (1999): A meggy és a cseresznye integrált termesztése. RIMOM Vállalkozásélénkítő Alapítvány, Nyíregyháza. 92.
163. Moore MH (1950): Brown rot of apples: fungicide trials and studies of the relative importance of different wound agents. Journal of Horticultural Science, 25: 225–234.
164. Moral J, Cabello D, Benítez MJ, Lovera M, Arquero O and Trapero A (2008): Epidemiology of *Monilia* disease of quince in southern Spain. Journal of Plant Pathology, 90 (Suppl. 1): 182.
165. Moral J, Muñoz-Díez CC, Cabello D, Arquero O, Lovera M, Benítez MJ and Trapero A (2011): Characterization of monilia disease caused by *Monilinia linhartiana* on quince in southern Spain. Plant Pathology, 60: 1128–1139.
166. Mordue JEM (1979a): *Sclerotinia fructicola*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. 616: 1–2.
167. Mordue JEM (1979b): *Sclerotinia fructigena*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. 617: 1–2.
168. Mordue JEM (1979c): *Sclerotinia laxa*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. 619: 1–2.
169. Mycobank (2015): Fungal Databases Nomenclature and Species Banks. <http://www.mycobank.org/> Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Mycobank. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.
170. NÉBIH (2016): Növényvédő szerek adatbázisa: <https://novenyvedoszer.nebih.gov.hu/Engedelykereso/kereso> Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Növényvédő szerek adatbázisa. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.
171. Nei M (1987): Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York, USA 187.
172. Némethy Zs (2013): Hamarosan időszerű a csonthéjas gyümölcsfák virágfertőző moniliás betegsége elleni védekezés. <http://www.balintgazda.hu/kertesz/novenydoctor/mikor-permetezzunk-monilia-ellen.html> Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Hamarosan időszerű a csonthéjas gyümölcsfák. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.

173. Nevado MIC, de la Cruz Blanco JI, López AJG, Fernández AC and Merino RS (2011): Moniliosis del membrillero. *Monilinia linhartiana*. Fichas técnicas de sanidad vegetal. No: 069.
174. Nyéki J (2004): Birs. In: Papp János (2004): A gyümölcsök termesztése. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 77–80.
175. Nyporko AZ and Blume YB (2008): Spatial distribution of tubulin mutations conferring resistance to antimicrotubular compounds. In: Blume YB et al. (eds.) The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology. Springer Science + Business Media BV: 409.
176. Odds FC, Brown AJP and Gow NAR (2003): Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiology, 11: 272–279.
177. OEPP/EPPO (2009): *Monilinia fructicola*. OEPP/EPPO Bulletin 39: 337–343.
178. Ogawa JM and English H (1960): Relative pathogenicity of two brown rot fungi, *Sclerotinia laxa* and *Sclerotinia fructicola*, on twigs and blossoms. Phytopathology, 50: 550–558.
179. Ogawa JM, Manji BT, Bostock RM, Canez VM and Bose EA (1984): Detection and characterization of benomyl resistant *Monilinia laxa* on apricots. Plant Diseases, 68: 29–31.
180. Ogawa JM, Zehr EI and Biggs AR (1995): Brown rot. In: Ogawa JM, Zehr EI, Bird GW, Ritchie DF, Uriu K and Uyemoto JK (Eds.), Compendium of Stone Fruit Diseases. St. Paul, MN: APS Press. 7-10.
181. Olaya G and Köller W (1999a): Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. Plant Disease, 83: 273–278.
182. Olaya G and Köller W (1999b): Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. Pesticide Science, 55: 1083–1088.
183. Olgyay M (1943): Növénykórtan. Budapest: Kéziratként. 57–62.
184. OMSZ (2016): Elmúlt évek időjárása. http://met.hu/eghajlat/magyarorszag_eghajlata/eghajlati_visszatekinto/elmult_evek_idojarasa/index.php Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: OMSZ 2015. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.
185. Orbach MJ, Porro EB and Yanofsky C (1986): Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. Molecular and Cellular Biology, 6 (7): 2452–2461.
186. Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG, Pedersen KF, Lin Y, Garretson J, McEntaggart NO, Sailor CA, Dawson RB and Andrew S (2008): IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. Nucleic Acids Research, 1(36): W163–W169.
187. Papavasileiou A, Testempasis S, Michailides TJ and Karaoglanidis GS (2015a): Frequency of brown rot fungi on blossoms and fruit in stone fruit orchards in Greece. Plant Pathology, 64 (2): 416–424.

188. Papavasileiou A, Karaoglanidis GS and Michailides TJ (2015b): Intraspecific Diversity of *Monilinia fructicola* and *M. laxa* Populations from Blossoms and Fruit of Different Hosts in Greece. *Plant Disease*, 99(10): 1353–1359.
189. Peck CH (1881): Report of the Botanist. Annual Report on the New York State Museum of Natural History, 34: 24–58.
190. Penrose LJ, Koffmann W and Nicholls MR (1985): Field occurrence of vinclozolin resistance in *Monilinia fructicola*. *Plant Pathology*, 34(2): 228–234.
191. Peric S (2008): The efficiency of low risk fungicides and mechanical measures in control of *Monilinia laxa* on sour cherry. (Efikasnost niskorizicnih fungicida i mehanickih mera u suzbijanju *Monilinia laxa*.) *Zaštita bilja*, 59(1-4): 25–57.
192. Persoon CH (1796): *Seu, Descriptiones tam novorum quan notabilium fungorum*. Wolf, Lipsiae. *Observations Mycologicae*, 100.
193. Petrőczy M (2009): A *Monilinia fructicola* és a *Monilia polystroma* megjelenése Magyarországon és a védekezés újabb lehetősége. Doktori (PhD) értekezés. Budapest. 52–105.
194. Petrőczy M és Palkovics L (2005): A *Monilinia fructicola* karantén kórokozó hazai megjelenése és azonosítása import őszibarackon. *Növényvédelem*, 41 (12): 603–608.
195. Petrőczy M and Palkovics L (2006): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on imported peach in Hungary. *Plant Disease*, 90(3): 375.
196. Petroczy M and Palkovics L (2009): First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 343–7.
197. Petrőczy M, Szigethy A and Palkovics L (2012): *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics and molecular analysis. *Trees-Struct Funct*, 26: 153–164.
198. Pizzuolo PH, Chilosi G, Balmas V, Aleandri MP, Vitale S, Luongo L, Corazza L and Margo P (2006): Variations in the molecular and physiological characteristics and the virulence of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa* isolates. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 139–152.
199. Plant (2014): Plant Health: Commission updates rules to better protect Europe's crops and forests from harmful pests and diseases. http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/dyna/enews/enews.cfm?al_id=1459. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Plant Health: Commission updates rules to better protect Europe's crops. Lekérdezés időpontja: 2016.02.25.
200. Poniatowska A, Michalecka M and Bielenin A (2013): Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4): 855–865.
201. Poniatowska A, Michalecka M and Puławska J (2015): Genetic diversity and pathogenicity of *Monilinia polystroma* – the new pathogen of cherries. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/ppa.12463

202. Popescu E (2011): Study of the Effect of Some Environmental Systems for Plant Protection in Production of Fruit in the Alpine Region of Central Rhodope Mountains. Institute of Agricultural Economics. 48(3): 299–301.
203. Prillieux EE and Delacroix EG (1893): *Ciboria (Stromatinia) linhartiana* forme ascospore de *Monilia linhartiana*, Sacc. Bulletin, de la Société Mycologique de France, 9(3): 196–202.
204. Radmanl J (1970): Efficacite des traitements du cognassier a differentes phases de sa vigitation contre *Monilia linhartiana*. ZaStita Bilja, 110–111: 331–333.
205. Ritchie DF (2000): Brown rot of stone fruits. The Plant Health Instructor, DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1025-01
206. Roberts JW and Dunegan JC (1932): Pech brown rot. United States Department of Agricultura. Washington. 1–60.
207. Rozsnyay Zs és Vajna L (2001): *Monilinia* járvány a csonthéjas ültetvényekben. Kertészet és szőlészet, 29: 8–10.
208. Rudolph BA (1936): Brown-rot of stone fruits on the Pacific coast and its control. Bett. Fruit 30: 3–5.
209. Ruxton GD and Beauchamp G (2008): ‘Time for some a priori thinking about post hoc testing’, Behavioral Ecology, 19(3):690-693. doi: 10.1093/beheco/arn020.
210. Schellenberg C (1923): Infektionsversuche mit Vertretern der Gattung Sclerotinia. Actes Soc. Helvctique Sci. Nat. CIV, 16–12.
211. Schnabel G and Jones AL (2001): The 14a-demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistance to myclobutanil. Phytopathology, 91: 102–110.
212. Schnabel G, Dait Q and Paradkar MR (2003): Cloning and expression analysis of the ATP-binding cassette transporter gene MFABC1 and the alternative oxidase gene MfAOX1 from *Monilinia fructicola*. Pest Management Science, 59(10): 1143–51.
213. Sholberg AP and Kappel F (2008): Integrated Management Of Stone Fruit Disease. In: Ciancio A and Mukerji KG (Ed): Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria. Springer Science+Business Media B.V. ISBN: 978-1-4020-8570-3 10.
214. Sierotzki H, Frey R, Wullschlegel J, Palermo S, Karlin S, Godwin J and Gisi U (2007): Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. Pest Management Science, 63(3): 225–33.
215. Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD and Higgins D (2011): Fast scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega Molecular Systems Biology, 7: 539 doi:10.1038/msb.2011.75
216. Sogin ML (1994): Evolution of ribosomal-RNAs and animal origins. Journal of neurochemistry, 62: 190000057-190000057.

217. Spiegel J and Stammeler G (2006): Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* to pyraclostrobin and boscalid. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113(5): 199–206.
218. Sumstine DR (1913): Studies in North American *Hyphomycetes*: II. The Tribe *Oosporeae*. *Mycologia*, 5: 45–61.
219. Sutton TB and Clayton CN (1972): Role and survival of *Monilinia fructicola* in blighted peach branches. *Phytopathology*, 62: 1369–1373.
220. Szepessy I (1967): *Mezőgazdasági növénykórtan*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 331.
221. Sződi SZ (2015): Csonthéjasok monilíás megbetegedését előidéző kórokozók növénykórtani, genetikai és rezisztencia vizsgálatának egyes aspektusai. Doktori (PhD) értekezés, Gödöllő: 30–31.
222. Sződi SZ, Major G, Komjáti H és Turóczy Gy (2008): Monília izolátumok fungicid érzékenységének vizsgálata. *Növényvédelem*, 44 (10): 505–511.
223. Sződi SZ, Komjáti H és Turóczy GY (2012): Characterization of *M. laxa* and *M. fructigena* isolates from Hungary with MP-PCR. *Horticulture Science*, 39: 116–122.
224. Tabachnick BG and Fidell LS (2007): *Using Multivariate Statistics* (5 th ed). Needham Heights, MA: Allyn & Bacon. 1–354.
225. Tafradzhiiski I and Angelov T (1977): Studies on the *Sclerotinia cydoniae* Schellenberg on quince. *Grad. Loz. Nauka*, 14 (6): 16–21.
226. Tafradzhiiski I and Angelov T (1979): Ovary perishing in quince and its control. Fungus disease caused by *Sclerotinia cydoniae* an *Monilinia cydoniae*. *Rastitelna Zashchita*, 27(4): 22–24.
227. Tamm L, Minder CE and Fliickiger W (1995): Phenological analysis of brown rot blossom blight of sweet cherry caused by *Monilinia laxa*. *Phytopathology*, 85:401–408.
228. Thomidis T, Michailides T and Exadaktylou E (2009): Contribution of pathogens to peach fruit rot in northern Greece and their sensitivity to iprodione, carbendazim, thiophanate-methyl and tebuconazole fungicides. *Phytopathology*, 157: 194–200.
229. Tóth Á (2007): A fungicidhasználat szempontjai a csonthéjasok monília betegségei ellen. *Agrofórum Extra*, 19: 63–64.
230. Tukey JW (1962): The future of data analysis. *Annals of Mathematical Statistics*, 33: 1–67.
231. van Leeuwen GCM and van Kesteren HA (1998): Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* ssp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany*, 76: 2042–2050.
232. van Leeuwen GCM, Baayen RP and Jeger MJ (2001): Pest risk assessment for the countries of the European Union (as PRA area) on *Monilinia fructicola*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 31(4): 481–487.

233. van Leeuwen GCM, Baayen RP, Holb IJ and Jeger MJ (2002): Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp nov from *M. fructigena*. Mycological Research, 106: 444–451.
234. Vasic M, Dudek N and Isovnik MS (2013): First Report of Brown Rot Caused by *Monilia polystroma* on Apple in Serbia. Plant Disease, 97(1): 145.
235. Villani S and Cox K (2008): QoI sensitivity and the prevalence of DMI resistance in NY populations of the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. Phytopathology, 98: 163.
236. Villani SM and Cox KD (2009): Molecular characterization and fungicide sensitivity profiling of *Monilinia laxa* from a cherry orchard in western NY. Phytopathology, 99: 135.
237. Villarino M, Larena I, Martinez F, Melgarejo P and De Cal A (2012): Analysis of genetic diversity in *Monilinia fructicola* from the Ebro Valley in Spain using ISSR és RAPD markers. European Journal of Plant Pathology, 132: 511–524.
238. Villarino M, Eguen B, Lamarca N, Segarra J, Usall J, Melgarejo P and De Cal A (2013): Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. European Journal of Plant Pathology, 137: 835–845.
239. Volkova J, Vilka L, Stanke L, Rancane R and Bazenova A (2013): Molecular characterization of *Monilinia laxa* and *Monilinia fructigena* causing brown rot of sweet cherry in Zemgale region of Latvia. Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis, 13(1): 165–172.
240. Wang Z, Binder M, Schoch CL, Johnston PR, Spatafora JW and Hibbet DS (2006): Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution, 41: 295–312.
241. Weaver LO (1950): Effect of temperature and relative humidity on occurrence of blossom blight of stone fruits. Phytopathology, 40: 1136–1153.
242. Weger J, Schanze M, Hilber-Bodmer M, Smits THM and Patocchi A (2011): First Report of the -Tubulin E198A Mutation Conferring Resistance to Methyl Benzimidazole Carbamates in European Isolates of *Monilinia fructicola*. Plant Disease, 95(4): 497.
243. White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press. New York. USA. 315–322.
244. Wicks T (1981): Suppression of *Monilinia laxa* spore production by fungicides applied to infected apricot twigs during dormancy. Plant Disease, 65: 911–912.
245. Willetts HJ and Calogne FD (1969): Spore development in the brown rot fungi (*Sclerotinia* spp.). New Phytologist, 68: 123–131.
246. Willetts HJ and Harada Y (1984): A Review of Apothecial Production by *Monilinia* Fungi in Japan. Mycologia, 76(2): 314–325.
247. Windsor JJ, McFarlane L, Asano T and Suga H (2006): Internal transcribed spacer dimorphism in *Dientamoeba fragilis*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 53: 188–192.

248. Wormald H (1926): On the occurrence in Britain of the conidial stage of *Sclerotinia Cydoniae* Schell. Transactions of the British Mycological Society, 10(4): 303–306.
249. Wormald H (1930): Further studies of the brown rot fungi: IV. *Sclerotinia fructigena* as the cause of an apple canker. Transactions of the British Mycological Society, 15(1-2): 102–107.
250. Wormald H (1954): The brown rot diseases of fruit trees. Technical Bulletin of the Ministry of Agriculture No. 3. London. 1–113.
251. Woronin MS (1880): "Die Sklerotienkrankheit der Vaccinienbeere," Mem. de V 'Acad, de St Petersburg, Serie 7: 46.
252. Woronin MS (1888): Über die Sclerotienkrankheit der Vaccinieen-beeren. Entwicklungsgeschichte der diese Krankheit verursachenden Sclerotinien. Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Pétersbourg. 36(6): 1–49.
253. Ypema HL, Ypema M and Gubler WD (1997): Sensitivity of *Uncinula necator* to benomyl, triadimefon, myclobutanil, and fenarimol in California, Plant Disease, 81: 293–297.
254. Zambino PJ and Szabo LJ (1993): Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. Mycologia, 85: 401–414.
255. Zehr EI (1982): Control of brown rot in peach orchards. Plant Disease Report, 66: 1101–1105.
256. Zhang C-Q, Zhang Y and Zhu GN (2008): The mixture of kresoxim-methyl and boscalid, an excellent alternative controlling grey mould caused by *Botrytis cinerea*. Annals of Applied Biology, 153: 205–213.
257. Zhu FX Amiri A and Schnabel G (2010): First Report of the β -tubulin E198A Allele for Fungicide Resistance in *Monilinia fructicola* from South Carolina. Plant Disease, 94: 1511.
258. Zidarič I, Škerlavaj V, Zemljič MU and Munda A (2011): Efficiency of fungicides used for the brown rot (*Monilinia* sp.) control in peaches and determination of relative presence of the species *Monilinia fructicola*. (Učinkovitost fungicidov za zatiranje gliv iz rodu *Monilinia* v breskvah in določitev relativne zastopanosti vrste *Monilinia fructicola*.) Zbornik Predavanj in Referatov 10, Szlovénia, 2011. Március 1-2: 285–291.
259. Ziogas NB, Baldwin CB and Young EJ (1999): Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA5504) in *Septoria tritici*. Pesticide Science, 50: 28–34.
260. .

2. melléklet: Az izolátumok neve, begyűjtött mintaszám, gazdanövénye, a gyűjtés helyszíne és éve

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
MLH1		<i>Cydonia oblonga</i>	hajtás	Siófok	2013.05.09	x				x
MLH2		<i>Cydonia oblonga</i> *	hajtás	Harkány	2013.05.01	x		x		x
UFT		<i>Malus domestica</i> 'Ashton bitter'	hajtás	Újfehértó	2005.	x				x
2010/PS-78		<i>Malus domestica</i>	termés	Lengyelország	2010.	x		x		x
2013/LX-1	5	<i>Prunus armeniaca</i> 'Ceglédi óriás'	hajtás és virág	Berencse	2013.04.28					x
2013/LX-2	3	<i>Prunus armeniaca</i> 'Mandulakajsi'	hajtás és virág	Sóskút	2013.05.10	x			x	
2013/LX-3	5	<i>Prunus armeniaca</i> 'Ceglédi óriás'	hajtás és virág	Kápolnásnyék	2013.05.09					
2013/LX-4	2	<i>Prunus armeniaca</i> 'Pannónia'	hajtás és virág	Kápolnásnyék	2013.05.09					x
2013/LX-5	5	<i>Prunus armeniaca</i> 'Ceglédi bíbor'	hajtás és virág	Kápolnásnyék	2013.05.09	x		x	x	x
2013/LX-6	5	<i>Prunus armeniaca</i> 'Bergeron'	hajtás és virág	Kápolnásnyék	2013.05.09					
2013/LX-7	5	<i>Prunus armeniaca</i> 'Ceglédi bíbor'	hajtás és virág	Pécs	2013.04.24					
2013/LX-8	2	<i>Prunus armeniaca</i> 'Chrisgold'	hajtás és virág	Siófok	2013.05.09					x
2013/LX-9	1	<i>Prunus armeniaca</i> 'Bergarouge'	hajtás és virág	Siófok	2013.05.09	x				x
2013/LX-10	5	<i>Prunus amygdalus</i> *	hajtás és virág	Budapest	2013.05.15					
2013/LX-11	5	<i>Prunus armeniaca</i>	hajtás és virág	Érd-Elvira major	2013.05.09					
2013/LX-12	5	<i>Prunus armeniaca</i> 'C235'	hajtás és virág	Kisgörbő	2013.05.09					
2013/LX-13	5	<i>Prunus triloba</i> 'Multiplex'*	hajtás és virág	Baracska	2013.05.10	x	x	x	x	x
2013/LX-14	1	<i>Prunus domestica</i>	hajtás és virág	Kecskemét	2013.05.10					
2013/LX-15	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Érdi bőtermő'	hajtás és virág	Agárd	2013.05.14				x	
2013/LX-16	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Érdi bőtermő'	hajtás és virág	Ravazd	2013.05.17					
2013/LX-17		<i>Cydonia oblonga</i> *	gyümölcsmúmia	Törökbalint	2013.05.15					
2013/LX-18	2	<i>Prunus subhirtella</i> 'Autumnale'*	hajtás és virág	Budapest	2013.05.25		x			
2013/LX-19	5	<i>Prunus armeniaca</i> 'Ceglédi arany'	múmia	Cserépfalu	2013.05.21					
2013/LX-20	4	<i>Prunus domestica</i>	zöld termés	Békéscsaba	2013.05.27					
2013/FG-21	1	<i>Prunus domestica</i>	zöld termés	Békéscsaba	2013.05.27	x				

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
2013/LX-22	5	<i>Prunus subhirtella</i> 'Autumnale'*	hajtás és virág	Törökbálint	2013.05.21					
2013/LX-23	5	<i>Prunus domestica</i> 'Besztercei'*	zöld termés	Kétegyháza	2013.05.27					
2013/LX-24	5	<i>Prunus armeniaca</i>	hajtás és virág	Kiskunmajsa	2013.05.30					
2013/LX-25	4	<i>Prunus</i> 'Acclade'*	hajtás és virág	Budapest	2013.05.25					
2013/LX-26	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Érdi bőtermő'	termés	Agárd	2013.05.17					
2013/LX-27	1	<i>Prunus persica</i> 'Babygold 6'	gyümölcsmúmia	Agárd	2013.05.17					
2013/LX-28	2	<i>Prunus cerasifera</i> *	zöld termés	Budapest	2013.06.05					
2013/LX-29	2	<i>Prunus domestica</i> 'Besztercei'*	zöld termés	Törökbálint	2013.06.06					
2013/LX-30	5	<i>Prunus avium</i> *	termés	Diósd	2013.06.10					
2013/LX-31	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Érdi bőtermő'	termés	Törökbálint	2013.06.18					
2013/LX-32		<i>Cydonia oblonga</i> *	gyümölcsmúmia	Törökbálint	2013.05.15					
2013/LX-33	5	<i>Prunus avium</i> 'Bigarreau Burlat'	hajtás és virág	Vámosmikola	2013.06.11					
2013/LX-34	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Érdi bőtermő'*	termés	Törökbálint	2013.06.18					
2013/LX-35	5	<i>Prunus avium</i>	termés	Kecskemét	2013.06.13					x
2013/LX-36	5	<i>Prunus avium</i> 'Bigarreau Burlat'	termés	Veszprém	2013.06.09					
2013/LX-37	2	<i>Prunus cerasus</i> 'Érdi bőtermő'*	termés	Törökbálint	2013.06.18				x	
2013/LX-38	4	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Balassagyarmat	2013.06.20					
2013/LX-39	1	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Balassagyarmat	2013.06.20					
2013/FC-40	1	<i>Prunus cerasus</i> 'Kántor Jánosi'	termés	Kiskunmajsa	2013.07.02					
2013/LX-41	2	<i>Prunus armeniaca</i> 'Aurora'	termés	Veszprém	2013.06.25					
2013/LX-42	2	<i>Prunus cerasus</i> *	termés	Baracska	2013.06.26	x			x	
2013/FG-43	2	<i>Prunus cerasus</i> *	termés	Balassagyarmat	2013.06.20	x			x	
2013/LX-44	3	<i>Prunus cerasus</i> *	termés	Balassagyarmat	2013.06.20					
2013/LX-45	5	<i>Prunus armeniaca</i>	termés	Sóskút	2013.07.10					
2013/FG-46	3	<i>Prunus cerasus</i>	termés	Újfehértó	2013.07.03	x				x
2013/LX-47	5	<i>Prunus avium</i>	termés	Újfehértó	2013.07.03					
2013/LX-48	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Debreceni bőtermő'*	termés	Salgótarján	2013.06.28					

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
2013/LX-49	3	<i>Prunus armeniaca</i> 'Korai piros'	termés	Szatymaz	2013.07.10					
2013/FC-50	1	<i>Prunus cerasus</i> 'Debreceni bőtermő'	termés	Ecséd	2013.07.14	x			x	x
2013/LX-51	3	<i>Prunus cerasus</i> 'Debreceni bőtermő'	termés	Ecséd	2013.07.14		x			
2013/FG-52	2	<i>Prunus persica</i> *	termés	Olaszliszka	2013.07.15	x				
2013/LX-53	3	<i>Prunus persica</i> *	termés	Olaszliszka	2013.07.15					
2013/LX-54	1	<i>Prunus avium</i> 'Alex'	termés	Veszprém	2013.06.29					
2013/LX-55	1	<i>Prunus avium</i> 'Alex'	termés	Veszprém	2013.06.29					
2013/LX-56	3	<i>Prunus armeniaca</i> 'Ceglédi óriás'	termés	Cserpéfalú	2013.07.16					
2013/FG-57	1	<i>Prunus armeniaca</i> 'Mandulakajsi'	termés	Cserpéfalú	2013.07.16				x	
2013/LX-58	3	<i>Prunus armeniaca</i> 'Korai piros'	termés	Szatymaz	2013.07.10					
2013/LX-59	1	<i>Prunus cerasus</i> 'Debreceni bőtermő'	termés	Ecséd	2013.07.10					
2013/LX-60	1	<i>Prunus cerasifera</i> *	termés	Miskolc	2013.07.13					
2013/FG-61	1	<i>Prunus cerasifera</i> *	termés	Miskolc	2013.07.13				x	
2013/LX-62	2	<i>Prunus cerasifera</i> *	termés	Pannonhalma	2013.09.12					
2013/FG-63	2	<i>Prunus persica</i> *	termés	Révfülöp	2013.09.22					
2013/FG-64	1	<i>Prunus persica</i> *	termés	Mátészalka	2013.08.25					
2013/LX-65	5	<i>Prunus cerasifera</i> *	termés	Balatonfenyves	2013.08.26					
2013/LX-66	1	<i>Prunus persica</i> 'Fantasia'	termés	Szatymaz	2013.09.10					
2013/LX-67	2	<i>Prunus persica</i> 'Royal pride'	termés	Péntekhely	2013.09.09					
2013/FG-68	2	<i>Prunus domestica</i>	termés	Hédervár	2013.09.02					
2013/LX-69	5	<i>Prunus cerasus</i>	termés	Soroksár	2013.09.10					
2013/FG-70	3	<i>Prunus domestica</i>	termés	Hédervár	2013.09.02					
2013/FG-71		<i>Cydonia oblonga</i> *	termés	Kétegyháza	2013.09.30					
2013/LX-72	5	<i>Prunus persica</i>	termés	Debrecen	2013.09.01					
2013/FG-73		<i>Cydonia oblonga</i> *	termés	Pincehely	2013.11.07	x		x		x
2013/LX-74	2	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Mórahalom	2013.11.11					

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
2013/FG-75	3	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Szombathely	2013.11.11					
2013/FG-76	5	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Mórahalom	2013.11.11					
MLH3		<i>Cydonia oblonga</i> *	hajtás	Kelenföld	2014.05.02	x				x
MLH4		<i>Cydonia oblonga</i>	hajtás	Kecskemét	2014.05.10	x		x		x
2014/LX-3	5	<i>Prunus armeniaca</i>	hajtás és virág	Tevel	2014.		x			x
2014/LX-4	2	<i>Prunus cerasus</i> *	hajtás és virág	Tamási	2014.		x			x
2014/LX-5	5	<i>Prunus armeniaca</i> *	hajtás és virág	Tamási	2014.				x	x
2014/LX-6	5	<i>Prunus cerasus</i> *	hajtás és virág	Szarka-hegy	2014.					
2014/LX-7	1	<i>Prunus cerasus</i> *	termés	Diósd	2014.					
2014/LX-9	5	<i>Prunus amygdalus</i> *	hajtás és virág	Budaörs	2014.					
2014/LX-10	3	<i>Prunus cerasus</i> *	hajtás és virág	Tamási	2014.					
2014/LX-11	3	<i>Prunus armeniaca</i>	termés	Kecskemét	2014.				x	
2014/FG-12	1	<i>Prunus persica</i> *	termés	Révfülöp	2014.	x	x		x	
2014/LX-13	1	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.				x	
2014/FC-14	1	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.				x	x
2014/LX-15	5	<i>Prunus armeniaca</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.		x	x	x	
2014/LX-16	2	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.					
2014/FC-17	1	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.				x	
2014/FC-18	3	<i>Prunus persica</i> 'Suncrest'	termés	Érd, Elvira-major	2014.08.10					x
2014/LX-19	5	<i>Prunus armeniaca</i>	hajtás	Gyula	2014.08.15				x	
2014/FG-20	5	<i>Prunus domestica</i> 'President'	termés	Sóskút	2014.08.27	x			x	x
2014/FG-21	3	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Sóskút	2014.08.27					
2014/FC-22	3	<i>Prunus persica</i> 'Redcal'	termés	Sóskút	2014.08.27					x
2014/FC-23	1	<i>Prunus persica</i> 'Redcal'	termés	Sóskút	2014.08.27					x

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
2014/FG-24	1	<i>Prunus persica</i> 'Redcal'	termés	Sóskút	2014.08.27					
2014/FC-25	1	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Sóskút	2014.08.27					x
2014/FC-26	3	<i>Prunus persica</i> 'Michellini'	termés	Sóskút	2014.08.27		x			
2014/FC-27	5	<i>Prunus persica</i> 'Babygold'	termés	Sóskút	2014.08.27					x
2014/LX-28	4	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'*	termés	Balassagyarmat	2014.08.28					
2014/FG-29	1	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'*	termés	Balassagyarmat	2014.08.28					
2014/LX-30	2	<i>Prunus avium</i> *	termés	Röszke	2014.04.05					
2014/LX-31	5	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Budakalász	2013.08.10				x	
2014/FC-32	3	<i>Prunus persica</i> 'Cresthaven'	termés	Érd	2014.08.29	x		x	x	
2014/LX-33	2	<i>Prunus persica</i>	termés	Érd	2014.08.29				x	
2014/FG-34	2	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Zsámbék	2014.08.21					
2014/FG-35	1	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Zsámbék	2014.08.21				x	
2014/PS-36	1	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Zsámbék	2014.08.21	x		x		x
2014/LX-37	1	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Zsámbék	2014.08.21					
2014/FG-38	1	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>	termés	Zsámbék	2014.08.21				x	
2014/LX-39	1	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>	termés	Zsámbék	2014.08.21					
2014/FG-40		<i>Pyrus communis</i> *	termés	Alsóörs	2014.08.17				x	
2014/FG-41		<i>Pyrus communis</i> *	termés	Abasár	2014.08.15					
2014/FG-42		<i>Pyrus communis</i> *	termés	Abasár	2014.08.15	x	x	x		x
2014/LX-43	1	<i>Prunus cerasus</i> *	termés	Diósd	2014.06.10					
2014/LX-44	1	<i>Prunus persica</i>	termés	Hajdúszoboszló	2014.08.20					
2014/LX-45	1	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Sóskút	2014.08.27					
2014/FG-46		<i>Pyrus communis</i>	termés	Alsóörs	2014.08.26					
2014/ FC-47	1	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.08.30				x	x
2014/FC-48	1	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.08.30	x		x	x	x

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
2014/FC-50	1	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.09.02				x	x
2014/FC-51	1	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.09.11	x			x	x
2014/FG-52		<i>Cydonia oblonga</i>	termés	Sukoró	2014.09.22					
2014/FG-53	5	<i>Prunus domestica</i>	termés	Soroksár	2014.09.17	x				
2014/FC-54	2	<i>Prunus persica</i>	termés	Soroksár	2014.09.17		x		x	x
2014/LX-55	3	<i>Prunus persica</i>	termés	Soroksár	2014.09.17					
2014/LX-56	5	<i>Prunus domestica</i> 'Besztercei'	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.02					
2014/LX-57	2	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.06					
2014/LX-58	5	<i>Prunus domestica</i> 'Besztercei'	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.06					
2014/LX-59	3	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.13					
2014/FC-60	1	<i>Prunus domestica</i> 'Besztercei'	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.13					x
2014/LX-61	4	<i>Prunus domestica</i> 'Besztercei'	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.13					
2014/FC-62	2	<i>Prunus salicina</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.26				x	
2014/FC-63	1	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.26				x	
2014/LX-64	1	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Kereskedelmi forg.	2014.10.26					
2014/LX-65	1	<i>Prunus persica</i>	termés	Kecskemét	2014.10.20.					
MLH5		<i>Cydonia oblonga</i>	hajtás	Törökország	2015.04.23.	x				x
2015/LX-1	2	<i>Prunus cerasus</i> 'Érdi bőtermő'	gyümölcsmúmia	Érd-Elvira major	2015.05.12					
2015/LX-2	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Bigarreau Burlat'	hajtás és virág	Érd-Elvira major	2015.05.12					

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
2015/LX-3	5	<i>Prunus armeniaca</i>	hajtás és virág	Érd-Elvira major	2015.05.12					
2015/LX-4	5	<i>Prunus cerasus</i> fajtagyűjtemény	hajtás és virág	Érd-Elvira major	2015.05.12					
2015/LX-6	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Bigarreau Burlat'	hajtás és virág	Baracska	2015.05.12					
2015/LX-7	3	<i>Prunus armeniaca</i>	hajtás és virág	Nyíregyháza	2015.05.14					
2015/LX-8	5	<i>Prunus cerasus</i>	hajtás és virág	Bicske	2015.04.28					
2015/LX-9	1	<i>Prunus cerasus</i>	hajtás és virág	Sáregres	2015.04.29					
2015/LX-10	5	<i>Prunus cerasus</i>	hajtás és virág	Soroksár	2015.05.20					
2015/LX-11	5	<i>Prunus cerasus</i>	fiatal termés	Soroksár	2015.05.20					
2015/LX-12	5	<i>Prunus cerasus</i> *	hajtás és virág	Olaszliszka	2015.05.26					
2015/LX-13	5	<i>Prunus cerasus</i> *	hajtás és virág	Sárszentmihály	2015.05.26					
2015/LX-14	3	<i>Prunus cerasus</i> *	fiatal termés	Sárszentmihály	2015.05.26					
2015/LX-15	5	<i>Prunus cerasus</i> *	hajtás és virág	Órhalom	2015.05.23					
2015/LX-16	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Újfehértói fürtös'	hajtás és virág	Sóskút	2015.06.04					
2015/LX-17	3	<i>Prunus armeniaca</i> 'Piroska'	gyümölcsmúmia	Sóskút	2015.06.04					
2015/LX-18	1	<i>Prunus armeniaca</i> 'Ceglédi piros'	fiatal termés	Sóskút	2015.06.04					
2015/LX-19	3	<i>Prunus armeniaca</i>	hajtás és virág	Pomáz	2015.06.01					
2015/LX-20	1	<i>Prunus armeniaca</i> 'Tomcot'	termés	Sóskút	2015.06.15					
2015/FG-21	1	<i>P. domestica</i> subsp. <i>italica</i> *	termés	Harkány	2015.06.17					
2015/LX-22	4	<i>Prunus persica</i>	termés	Érd- Elvira major	2015.08.17					
2015/LX-23	5	<i>Prunus tenella</i> *	hajtás és virág	Budapest	2015.05.06					
2015/LX-24	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Érdi bőtermő'	hajtás és virág	Törökbálint	2015.05.07					
2015/LX-25	5	<i>Prunus armeniaca</i>	hajtás és virág	Törökbálint	2015.05.07					
2015/LX-26	5	<i>Prunus cerasus</i> 'Pándy'	hajtás és virág	Baracska	2015.05.07					
2015/FC-27	3	<i>Prunus persica</i> 'Redhaven'	termés	Sóskút	2015.08.18					
2015/FG-28	5	<i>Punus domestica</i> 'Blufre'	termés	Pallag	2015.08.26					
2015/LX-29	1	<i>Prunus cerasus</i>	termés	Agárd	2015.08.20					

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
2015/LX-30	2	<i>Prunus persica</i>	termés	Pécs	2015.08.20					
2015/LX-31	3	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i> 'Andosa'	termés	Pallag	2015.08.26					
2015/PS-32		<i>Malus domestica</i> 'Gala'	termés	Pallag	2015.08.26	x				
2015/FG-33	5	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Pallag	2015.08.26					
2015/FG-34	1	<i>Prunus persica</i> 'Red Haven'	termés	Pallag	2015.08.26	x				
2015/LX-35	3	<i>Prunus persica</i> 'Red Haven'	termés	Pallag	2015.08.26					
2015/FG-36	2	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i> 'Andosa'	termés	Pallag	2015.08.26					
2015/FG-37	3	<i>P. domestica</i> 'Sárga besztercei'	termés	Soroksár	2015.09.14					
2015/FG-38	5	<i>Prunus domestica</i>	termés	Soroksár	2015.09.14					
2015/FC-39	2	<i>Prunus persica</i> 'Michellini'	termés	Soroksár	2015.09.14					
2015/FG-40	1	<i>Prunus persica</i> 'Michellini'	termés	Soroksár	2015.09.14					
2015/LX-41	2	<i>Prunus persica</i> 'Michellini'	termés	Soroksár	2015.09.14					
2015/LX-42	4	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>	termés	Soroksár	2015.09.14					
2015/LX-43	1	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>	termés	Soroksár	2015.09.14					
2015/FG-44	1	<i>Prunus domestica</i> subsp. <i>italica</i> *	termés	Pécs	2015.07.12					
2015/LX-45	5	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'*	termés	Körösszegapáti	2015.09.20					
2015/FG-46	5	<i>Prunus domestica</i> 'Stanley'	termés	Komárom	2015.09.20					
2015/LX-47	5	<i>Prunus domestica</i> *	termés	Komárom	2015.09.28					
2015/FG-48		<i>Cydonia oblonga</i> *	termés	Diósviszló	2015.09.29					
2015/FC-49	1	<i>Prunus domestica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2015.09.30					
2015/FC-50	2	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2015.09.15					
2015/FC-51	5	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2015.09.30					
2015/FG-52		<i>Malus domestica</i>	termés	Törökbálint	2015.10.08					

Izolátum kódja	Minta-szám**	Gazdanövény*	Fertőzött növényi rész	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	A molekuláris módszerekkel vizsgált régiók				
						ITS régió	Cyt B gén	Cyp51 gén	Cyp51 gén promótere	TUB2 gén
2015/FG-53	2	<i>Cydonia oblonga</i>	termés	Kelenföld	2015.10.10					
2015/LX-54	5	<i>Prunus domestica</i>	termés	Balassagyarmat	2015.10.10					
2015/LX-55	2	<i>Prunus persica</i>	termés	Kereskedelmi forg.	2015.10.08					
2015/LX-56	5	<i>Prunus armeniaca</i>	termés-múmia	Göncz	2015.10.20					
2015/LX-57	5	<i>Prunus armeniaca</i> 'Roboda'	hajtás	Pomáz	2015.11.06					
2015/LX-58	1	<i>P. armeniaca</i> 'Ceglédi Piroska'	hajtás	Pomáz	2015.11.07					
2015/FG-59	1	<i>Prunus armeniaca</i>	termés-múmia	Göncz	2015.10.20					

* a minták nem üzemi növényvédelem alatt álló fákról származnak

**a mintaszámot csak a csonthéjas gazdanövényekről származó minták esetén tüntettük fel

3. melléklet: Össznukleinsav kivonása tenyészetből

Az össznukleinsav kinyeréséhez a kórokozó tiszta, növekvő tenyészetének 5 mm-es korongjait használtuk fel. A micéliumkorongokat lándzsatűvel leválasztottuk a táptalajról, majd dörzsmozsárban kvarchomok segítségével eldörzsöltük.

600 µl CTAB puffer hozzáadása után Eppendorf csövekbe öntöttük át az elegyet, majd 45 percig 65 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk.

A nukleinsavak kinyeréséhez kloroform/izoamil-alkohol-extrakciót végeztünk, 24:1 arányú eleggyel (600 µl), majd 10 percig centrifugáltuk.

A felső fázist tiszta Eppendorf csőbe átpipettáztuk, majd megismételtük az extrakciót, majd ismételen 10 percig centrifugáltuk.

400 µl izopropanollal kicsaptuk a nukleinsavakat, majd 5 percig centrifugáltuk.

A centrifugálást követően leöntöttük a felülúszót. A pellethez 1 ml 70%-os etanolt adtunk, majd 5 perces centrifugálás után ismét leöntöttük a felülúszót.

A pelletet szárítottuk, majd 30 µl 10 µg/ml RNase-t tartalmazó TE-oldatba szuszpendáltuk (Maniatis és mtsai. 1989).

4. melléklet: Izolátumok hasonlóságának vizsgálata során felhasznált izolátumok génbanki azonosító kódjai

14. táblázat: Izolátumok hasonlóságának vizsgálata során felhasznált izolátumok génbanki azonosító kódjai

vizsgált szakasz	<i>Monilinia laxa</i>	<i>Monilinia fructigena</i>	<i>Monilinia fructigena</i>	<i>Monilinia polystroma</i>	<i>Monilinia linhartiana</i>
ITS1-5,8S rDNA-ITS2	AB470891, AF150673– AF150680, EF153013– EF153017, GU952816, GQ423060, HQ908790, KC544793– KC544799, KJ542644, KU695549, KP279669, LN714571, HQ846947– HQ846955, Z73784–Z73787	EF207424– EF207429, HQ846917, HQ846945, HQ846946, HQ846956– HQ846965, HQ166375, HQ908791, HQ166375, HQ166417, KC544804– KC544807, KP279656, KP279661– KP279668, KP903577, KP903590, KP903604, KP903605	EF207419– EF207423, FJ411109, FJ411110, FJ515894, HQ893747, HQ893748, HQ908789, KF516934, KF516935, KJ131183, KJ131184, KJ541032, KM279616, KM279617, KM652445– KM652469, Z73777, Z73778	GU067539, HQ856916, HQ846944, JF820317, JN128835, JX315717, KJ814976, KP279655– KP279660, KP742806– KP742813, KR778902– KR778909,	HM581953, HM581954
<i>tub2</i> gén	AY349149, HQ908772	HQ908771	AY283676– AY283683, AY283685, HM051379– HM051383, HQ908769, HQ908770	-	-
<i>cyp51</i> gén	-	-	AF470621, EF372329– EF372338, EU136400, EU779922– EU779931, GU136401– GU136407	-	-
28s rDNA gén	AY544670, NG_027608, Z73752	Z73749	AY544683, Z73748	-	-

5. melléklet: A *Monilinia linhartiana* kórokozó általunk meghatározott génrészleteinek azonosító kódjai

15. táblázat: A *Monilinia linhartiana* kórokozó általunk meghatározott génrészleteinek azonosító kódjai

Izolátum	ITS régió és 28S rDNA gén	<i>tub2</i> gén	Polimorf régió
MLH1	LN908896	LN908895	LN908894
MLH2	LN908897	LN908901	LN908905
MLH3	LN908898	LN908902	LN908906
MLH4	LN908899	LN908903	LN908907
MLH5	LN908900	LN908904	-

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek Dr. Palkovics Lászlónak és Dr. Petróczy Mariettának, akik mellett 2001-től Növényorvos MSc hallgatóként, 2013-tól doktoranduszként tanulhattam, kutathattam. Szeretném megköszönni Dr. Palkovics Lászlónak, hogy segítette téma választásomat és kutatásom tudományos megalapozását, valamint biztosította a kutatás létrejöttéhez szükséges feltételeket. Köszönöm Dr. Petróczy Mariettának, azt hogy témavezetőmként irányította munkámat, biztatására és értékes tanácsaira mindig számíthattam.

A mintagyűjtés során kollégáim, barátaim és családtagjaim gyakran hozzájárultak egy-egy mintával gyűjteményemhez. Szeretném megköszönni Ádám Jánosnak, Ágoston Jánosnak, Hanczár Jázminnak, Hartmann Katának, Dr. Karacs-Végh Anitának, Koncz Lászlónak, Lantos Andrásnak, Dr. Nagy Gézának, Oláh Richárdnak, Dr. Pájtli Évának, Dr. Palkovics Lászlónak, Papp Ágnesnek, Dr. Péntes Bélának, Dr. Petróczy Mariettának és Tóth Annamáriának a mintagyűjtés során nyújtott segítségüket.

Köszönöm Dr. Erdélyi Évának a bátorítást és a statisztikai elemzésben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Pájtli Évának a molekuláris elemzésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Deák Tamás és Dr. Kovács M. Gábor segítségét a filogenetikai törzsfa elkészítésében.

Köszönöm Dr. Nagy Géza értékes szakmai tanácsait.

Szeretném megköszönni a Bolognai Egyetem munkatársainak, hogy külföldi tapasztalatokkal gazdagították tudásomat. Köszönöm Marta Mari professzor asszonynak, hogy lehetőséget biztosított a közös munkára a Növénykórtani és Növényvédelmi CRIOF laboratóriumban. Köszönöm Dr. Camilla Martininek, hogy a kint töltött hónapok során mindig számíthattam ötleteire és segítségére.