

Doktori (PhD) értekezés

Bagi Bianka

Budapest

2023



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

A repce plenodómuszos betegségét okozó hazai kórokozók
jellemezése

DOI: 10.54598/003780

Bagi Bianka

Budapest

2023

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Zámboriné dr. Németh Éva
egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Kertészettudományi Intézet
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezetők: Dr. Petróczy Marietta
egyetemi docens, PhD
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Növényvédelmi Intézet
Növénykórtani Tanszék

Dr. Palkovics László
egyetemi tanár, DSc
Széchenyi István Egyetem
Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar
Növénytudományi Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1. A repce jelentősége és termesztésének helyzete.....	10
2.2. A repce plenodómuszos betegsége és kórokozói	11
2.2.1. A kórokozók rendszertana és elnevezései	12
2.2.2. A kórokozók elkülönítése.....	12
2.3. A kórokozók földrajzi elterjedése és jelentőségük	13
2.4. A kórokozók által előidézett tünetek	15
2.5. A kórokozók morfológiai és tenyészbélyegei	15
2.6. A kórokozók azonosítása molekuláris módszerekkel fajsztinten	17
2.7. A <i>P. lingam</i> és a <i>P. biglobosus</i> genetikai változékonysága.....	18
2.8. A kórokozók biológiája	20
2.8.1. A kórokozók életmódja	20
2.8.2. A kórokozók párosodási típusai	21
2.9. A kórokozók elleni védekezés lehetőségei	22
2.9.1. A kórokozók elleni rezisztencianemesítés	22
2.9.1. Agrotechnikai védekezés.....	24
2.9.2. Kémiai védekezés.....	25
2.9.3. Biológiai védekezés.....	28
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	30
3.1. A vizsgálat helye és ideje	30
3.2. A vizsgálat anyaga.....	30
3.2.1. Növények és izolátumok	30
3.2.2. Indítószekvenciák.....	32
3.2.3. Táptalaj, vegyszerek, enzim, kit.....	37
3.2.4. Fungicid hatóanyagok	38
3.2.5. Eszközök	38

3.3.	A vizsgálat módszere	38
3.3.1.	A növényi részek gyűjtése és tárolása.....	38
3.3.2.	A kórokozók izolálása táptalajon, a tenyészetek fenntartása	39
3.3.3.	Morfológiai és tenyészbélyegek jellemzése és értékelése.....	40
3.3.4.	Patogenitási teszt	41
3.3.5.	Az izolátumok molekuláris vizsgálatai	41
3.3.6.	A fungicid hatóanyagok tesztelése a kórokozók micéliumának növekedésére.....	46
3.3.7.	A vizsgálatok során alkalmazott statisztikai módszerek	48
4.	EREDMÉNYEK	49
4.1	A <i>Plenodomus</i> -fajok előfordulása őszi káposztarepcén	49
4.1.1.	A kórokozók elterjedtsége.....	49
4.2.	<i>Plenodomus</i> -fajok okozta tünetek őszi káposztarepcén	50
4.2.1.	<i>Plenodomus</i> -fajok morfológiai- és tenyészbélyegei	51
4.3.	Patogenitási teszt	57
4.4.	<i>Plenodomus</i> izolátumok molekuláris vizsgálata.....	58
4.4.1.	<i>Plenodomus</i> izolátumok fajszerűtű elkülönítése	58
4.4.2.	<i>Plenodomus lingam</i> párosodási típusainak vizsgálata	60
4.4.3.	<i>Plenodomus</i> izolátumok <i>AvrLm4</i> génjének vizsgálata.....	61
4.4.4.	<i>Plenodomus</i> izolátumok 18S-28S szakaszának vizsgálata.....	61
4.4.5.	<i>Plenodomus</i> izolátumok LSU régiójának vizsgálata.....	62
4.4.6.	<i>Plenodomus</i> izolátumok <i>tub2</i> génjének vizsgálata.....	62
4.4.7.	<i>Plenodomus</i> izolátumok <i>rpb2</i> régiójának vizsgálata.....	63
4.4.8.	<i>Plenodomus</i> izolátumok <i>act1</i> génjének vizsgálata.....	63
4.5.	Filogenetikai analízis	64
4.5.1.	Filogenetikai törzsfá az ITS1-5,8S-ITS2 régió alapján.....	64
4.5.2.	A két kórokozó filogenetikai analízise „multilocus”-os törzsfá alapján	66
4.5.3.	Filogenetikai törzsfá az <i>act1</i> gén egy szakasza alapján	68

4.6. Fungicid hatóanyagok <i>in vitro</i> tesztelése a <i>Plenodomus</i> izolátumok micéliumának növekedésére	70
4.6.1. Boszkalid	70
4.6.2. Fluopiram	71
4.6.3. Azoxistrobin	73
4.6.4. Piraklostrobin	75
4.6.5. Tebukonazol	76
4.7. Új tudományos eredmények	78
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	79
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	87
7. SUMMARY	89
8. MELLÉKLETEK.....	91
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	142

Rövidítések jegyzéke

2-ME	2-merkapto-etanol
<i>act1</i>	aktin 1 gén
<i>Avr</i>	avirulencia gén
<i>B.</i>	<i>Brassica</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	bázispár
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid
<i>CYP51</i>	14-demetiláz enzim
ddPCR	droplet digital polymerase chain reaction, csepp digitális polimeráz lánreakció
DMI	demethylase inhibitor, demetiláz inhibitor
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ENA	European Nucleotide Archive, Európai Nukleotid Archívum
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee, Fungicid-rezisztencia Bizottság
ITS	Internal Transcribed Spacer
<i>L.</i>	<i>Leptosphaeria</i>
LAMP	loop-mediated isothermal amplification, hurok által közvetített izotermikus amplifikáció
LSU	large subunit, nagy alegység
MANOVA	Multivariate analysis of variance, többváltozós varianciaanalízis
MAT	mating-type, párosodási típus
M	mol
mM	millimol

NaCl	nátrium-klorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
p	a hiba valószínűsége
<i>P.</i>	<i>Plenodomus</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció
PDA	potato dextrose agar, burgonya-dextróx agar
QoI	quinone outside inhibitor, külső kinon gátló inhibitor
QTL	Quantitative Trait Loci, kvantitatív tulajdonságokat meghatározó lókuszek
<i>Rlm</i>	resistance to <i>Leptosphaeria maculans</i> , rassz-specifikus rezisztenciáért felelős gén
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA, véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS
rDNS	riboszomális RNS-t kódoló sejtmagi dezoxiribonukleinsav
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism, restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus
<i>rpb2</i>	RNA polymerase II second largest subunit, RNS polimeráz II második nagy alegysége
SBI	sterol biosynthesis inhibitor, szterol bioszintézis inhibitor
SDHI	succinate dehydrogenase inhibitor, szukcinát dehidrogenáz inhibitor
SSU	small subunit, kis alegység
<i>tub2</i>	β -tubulin-2 gén

1. BEVEZETÉS

A repce (*Brassica napus* L.) világszerte az egyik legfőbb olajnövény, melyet jelentős területen termesztnek (Brachaczek és mtsai., 2021). Az 1980-as évektől a főbb repcetermesztő régiókban – úgy, mint Kanadában, Európában, Kínában, Indiában, valamint Ausztráliában – a nagy hozamú hibridek bevezetése az élelmiszeripar és a takarmányozás piacán a repcemag előállításának fokozatos növekedését eredményezte. Az 1990-es évektől azonban Európában és Ausztráliában a termésmennyiség átlagos növekedési rátája hanyatlani kezdett. Ebben az időben a biotikus tényezőkkel szembeni védelem nem volt megfelelő, emellett a repce magas erukasav és glükoszínolát szinttel rendelkezett, amely mind élelmiszeripari, mind takarmányozási szempontból kedvezőtlen volt (Allender és King, 2010; Zheng és mtsai., 2020).

A nemesítés során ugyan optimalizálták az erukasav és a glükoszínolát szintjét, azonban ennek következményeképp csökkent a növények ellenállósága a kórokozókkal, többek között a plenodómuszos betegség kórokozóival szemben is. Az ellenállóképesség csökkenése miatt gyakoribbá vált a kórokozók előfordulása, egyre nagyobb károkat okoztak a repcetermesztők számára (Kightley és mtsai., 2012). Egyes feljegyzések szerint a plenodómuszos betegség kórokozói világszerte jelentős gazdasági kárt, évente több, mint 900 millió dollár veszteséget jelentenek (Fitt és mtsai., 2008).

A betegségért felelős két kórokozó – a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* – együttes jelenlétét ezidáig számos európai országban igazolták. Magyarországon a *P. lingam*-ot először 2006-ban írták le (Magyar és mtsai., 2006; Szlávik és mtsai., 2006). Szerbiában, Rimski Šančevi közelében gyűjtött repcemintákból 2016-ban Mitrović és mtsai. izolálták a *P. biglobosus*-t. A 2018-ban gyűjtött mintáinkból néhány esetben azonosítottuk a kórokozót, amelynek jelenléte Magyarországon korábban ismeretlen volt (Bagi és mtsai., 2020).

Vizsgálataink során célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- A plenodómuszos betegség kórokozói elterjedtségének feltérképezése hazánkban;
- A *Plenodomus* izolátumok fajszerűtű azonosítása és jellemzése morfológiai, valamint tenyészbélyegek alapján;
- A *Plenodomus*-fajok megbízható azonosítása molekuláris módszerrel;
- A *Plenodomus* izolátumok különböző genomi régiói (teljes ITS régió, az LSU, a β -tubulin-2 gén, az *rpb2* régió, valamint az *act1* gén egy szakasza) nukleotid szekvenciájának együttes elemzésével a hazai populáció változékonyságának feltérképezése, az izolátumok filogenetikai rokonságának feltárása;

- Egyéb genomi régiók (avirulencia gén, párosodási típusokat meghatározó gén) molekuláris vizsgálata;
- A *P. lingam* és a *P. biglobosus* izolátumok fungicid hatóanyagokkal szembeni érzékenységének *in vitro* vizsgálata sorozathígításos, mérgezett agarlemezes módszerrel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A repce jelentősége és termesztésének helyzete

A repce (*Brassica napus* L.) napjainkban a világ legfontosabb szántóföldi kultúrnövényei közé tartozik (Al-Shehbaz és mtsai., 2006). Olajban gazdag magjaiból étolajat (Matthäus és Brühl, 2003), biodízelt (Raymer, 2002) és a kérődzők, valamint a baromfik számára jó minőségű takarmányt állítanak elő (Fenwick, 1982; Salem és Nefzaoui, 2003).

A telített zsírsavak viszonylag alacsony, valamint a telítetlen zsírsavak magas szintjének köszönhetően a repceolaj emberi fogyasztásra alkalmas (Lin és mtsai., 2013), felhasználása az utóbbi időben Európa-szerte (Carré és Pouzet, 2014), valamint globálisan is növekedett (Internet1). A telítetlen zsírsavakban gazdag étrend számos jótékony hatással rendelkezik, csökkenti a koleszterinszintet, emellett pedig növeli a szív- és érrendszer védelmét (Lin és mtsai., 2013). Ezenkívül a repceolaj más hasznos összetevőket is tartalmaz, mint például szterolokat, karotinoidokat, K-vitamint és tokoferolt (Jakobsen és mtsai., 2015). A biodízel előállítását tekintve az Európai Unió a világban jelentős szerepet tölt be, megközelítőleg a globális termelés 60%-át biztosítja (Thamsiriroj és Murphy, 2010; Bórawski és mtsai., 2019). A tagországaiban ezen üzemanyag előállításának fő nyersanyaga a repce, amelyből előállított termék a lehetséges forrásokhoz képest a legjobb minőségi tulajdonságokkal rendelkezik (Internet2). A biodízel előállítása során keletkező melléktermékből repcefogácsát készítenek, amelyet állati takarmány alapanyagaként használnak fel, ugyanis nagy mennyiségű energiát, valamint értékes tápanyagokat biztosít az állatok számára (Jakobsen és mtsai., 2015).

A repce őszi típusát (őszi káposztarepcét) főként Európában és Kína egyes részein, míg a tavaszi típusát Kanadában, Észak-Európában és Kínában termesztik. Ausztráliában és az Egyesült Államok délkeleti részén, ahol a telek enyhék, a tavaszi típusa átteleltethető (Raymer, 2002).

A nagy hozamú hibridek bevezetésének és elterjesztésének köszönhetően a repce átlagos termésmennyisége 1981-től növekedésnek indult (Zheng és mtsai., 2020). Az elérhető termésmennyiség továbbfejlesztésével és a repcemag erukasav, valamint glükozinolat tartalmának csökkentésével ebben az időben az élelmiszeriparban és az állati takarmányozásban is új piacok nyíltak a repce számára (Dimov és Möllers, 2010). A kedvezőbb tulajdonságok jelentősen növelték a repce jövedelmezőségét, valamint ennek köszönhetően a termőterületét is. 1990-től azonban Németországban, Franciaországban, az Egyesült Királyságban és Ausztráliában az átlagos termőterületek évenkénti növekedési aránya csökkenni kezdett, amelynek háttérében több befolyásoló tényező is állt (Zheng és mtsai., 2020).

Ahogy a XX. század végén, úgy az utóbbi években is a repce átlagos termésmennyiségének instabilitása figyelhető meg többek között Európában is (Brown és mtsai., 2019). A várható termésmennyiség más szántóföldi növényekhez képest kevésbé kiszámítható (Berry és Spink, 2006; Rondanini és mtsai., 2012; Zheng és mtsai., 2020). A kiszámíthatatlanság aggodalomra adott okot a repcetermesztők körében, emiatt a repce termőterülete az utóbbi időben a korábbi területmérethez képest csökkent (Arthey, 2020).

Manapság a klímaváltozásnak köszönhetően az abiotikus stresszfaktorok közül a magas hőmérséklet, különösen a levél- és termésképzés időszakában (Weymann és mtsai., 2015), valamint a virágzás utáni kevés csapadék (Champolivier és Merrien, 1996) negatív hatással van a betakarítható termésmennyiségre. Mindemellett a növényvédelemben is számos nehezítő tényező akadályozza a kívánt termésmennyiség elérését.

A kórokozókat figyelembe véve jelentős azok széleskörű elterjedése, a növényi rezisztencia áttörésére képes populációk megjelenése (Fu és mtsai., 2020), illetve a fungicid-rezisztens populációk szelektálódása (Van de Wouw és mtsai., 2018b). A kórokozókhoz hasonlóan a kártevők elterjedése is számottevő, valamint fokozódik a kulcsfontosságú rovarkártevők inszekticidekkel szembeni rezisztenciája is (Slater és mtsai., 2011; Andert és mtsai., 2021). Ugyancsak meghatározó az Európai Unióban a korábban alkalmazott neonikotinoidok repce vetőmagok csávázásának céljából történő használatának betiltása 2013. decemberétől (Noleppa, 2017). A neonikotinoid hatóanyagokkal történő csávázás nemcsak a rovarkártételre, hanem azon növénypatogén vírusok terjedésére is hatással volt, amelyek rovarok által terjednek, így a vírusok is egyre nagyobb kihívást jelentenek a repce növényvédelmében. A repcét megfertőző *Turnip yellows virus* (TuYV) vektora a repcét is károsító őszibarack-levéltetű (*Myzus persicae*). Egyes megfigyelések szerint a *Turnip yellows virus*-nak is jelentős szerepe van abban, hogy a repce nem képes elérni a potenciális termésmennyiségének maximumát (Stevens és mtsai., 2008).

A kedvező jövedelmezőség és a gabonaalapú vetésforgó alkalmazásában betöltött fontos szerepe miatt a repcetermesztés azonban a nehézségek ellenére is nagy népszerűségnek örvend (Dawidziuk és mtsai., 2012).

2.2 A repce plenodómuszos betegsége és kórokozói

Az őszi káposztarepce betegségei között világszerte jelentős a plenodómuszos betegség, amely a repce fómás levélfoltossága és szárrájkaként, a repce fómás gyökérnyak- és szárróhadásaként, illetve feketelábúságaként (Rouxel és Balesdent, 2005; Ábrahám és mtsai., 2011), a repce fómás- (Varga, 2014), valamint leptoszfériás betegségeként (Keszthelyi és

Kazinczi, 2014) is ismert. A betegséget két kórokozó a *Plenodomus lingam* (Tode) Höhn. és a *Plenodomus biglobosus* (Shoemaker & H. Brun) Gruyter, Aveskamp & Verkley okozza (Brachaczek és mtsai., 2021; Internet3).

2.2.1. A kórokozók rendszertana és elnevezései

A régebbi megfigyelésekkel ellentétben a betegséget nem egy kórokozó (Smith és Sutton, 1964) és nem is egy fajkomplex (Balesdent és mtsai., 1998), hanem két, egymással közeli rokonságban lévő kórokozó, a *P. lingam* és a *P. biglobosus* okozza (Dilmaghani és mtsai., 2009). Rendszertanilag az *Ascomycota* törzsbe, a *Pezizomycotina* altörzsbe, a *Dothideomycetes* osztályba, a *Pleosporomycetidae* alosztályba, a *Pleosporales* rendbe és a *Leptosphaeriaceae* családba tartoznak (Internet3). Ezeket a kórokozókat korábban a *Leptosphaeria* nemzetségbe sorolták, azonban egyes vizsgálatok alapján manapság a *Plenodomus* nemzetségbe tartoznak (de Gruyter és mtsai., 2012; Wijayawardene és mtsai., 2014). A nemzetség neve egyben a kórokozók legitim nevét is képezi. Ez az elnevezés azonban általánosan még nem terjedt el (Zamanmirabadi és mtsai., 2022).

A növénypatogén gombák taxonómiájára korábban jellemző volt, hogy a kórokozók teleomorf (ivaros) és anamorf (ivartalan) alakját a megjelenésük alapján külön névvel illették (Crous, 2005). A dezoxiribonukleinsav (DNS) szekvenálási technológiák elterjedésével, a kórokozók örökítő anyagának megismerésével azonban az utóbbi időben az „egy gomba egy név” alapján történő azonosítása vált elfogadottá (Wingfield és mtsai., 2012). A fellelhető szakirodalomban számtalanszor találkozhatunk a régebbi elnevezésekkel. A *P. lingam*-ot a kettős nevezéktan szerint a teleomorf alak alapján *Leptosphaeria maculans* Ces. & De Not., anamorf alak alapján *Phoma lingam* (Tode) Desm. (Rouxel és Balesdent, 2005), míg a *P. biglobosus*-t teleomorf alak alapján *Leptosphaeria biglobosa* Shoemaker & H. Brun, anamorf alak alapján *Plenodomus biglobosus* (Shoemaker & H. Brun) Gruyter elnevezéssel illették (Shoemaker és Brun, 2001).

2.2.2. A kórokozók elkülönítése

2001-ig a *P. lingam* és a *P. biglobosus* kórokozókat egy fajnak tekintették annak ellenére, hogy korábban számos kutatást végeztek a *P. lingam* izolátumok elkülönítésére vonatkozóan. Az egyik, elkülönítésre alkalmazott módszer az izolátumok eltérő virulenciáján alapult (Badawy és mtsai., 1991), majd az izolátumok örökítőanyagának restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus (RFLP, restriction fragment length polymorphism) mintázatának analízisét is elvégezték (Koch és mtsai., 1991). Balesdent és mtsai. (1992) a későbbiekben az izolátumok fitotoxin-termelését is megfigyelték. Vizsgálatuk során a fitotoxint nem termelő izolátumokat

Tox⁰, míg a fitotoxint termelőket Tox⁺ jelöléssel látták el. Williams és Fitt (1999) kutatásuk során több tulajdonság esetében is különbséget figyeltek meg a kevésbé virulens (B csoport) és az agresszívebb (A csoport) izolátumok között. Vizsgálták a csíratömlő növekedési ütemét *in vitro*, a pigmentek termelődését folyékony közegben, valamint vizsgálták a pigmentek hiányát, a különböző vonalak sirodezmin termelését, a fehérjékben megjelenő különbségeket, az azonos kémiai reakciót katalizáló, de szekvenciájukban eltérő izoenzimek felépítését és az elektroforetikus kariotípusokat, valamint a nukleinsavban megfigyelhető különbségeket.

Az izolátumok közötti különbségek alapján 2001-ben, a kevésbé agresszív, fitotoxint nem termelő izolátumokat új fajként, *Plenodomus biglobosus*-ként különítették el (Shoemaker és Brun, 2001; Kuusk és mtsai., 2002).

2.3. A kórokozók földrajzi elterjedése és jelentőségük

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* fajok az USA-ban (Henderson, 1918), Kanadában (Gugel és Petrie, 1992), Afrikában (Fitt és mtsai., 2006b), Ausztráliában (Sivasithamparam és mtsai., 2005), valamint Európa-szerte (West és mtsai., 2001) óriási károkat okoznak. A kártétel mértéke kontinensenként eltérő, amelynek okai a kórokozók populáció-összetételében, a termesztett repce típusokban (tavaszi/őszi), fajtákban és hibridekben, a kontinensek uralkodó klimatikus viszonyaiban, valamint a szántóföldön alkalmazott termesztéstechnológiai módszerekben (West és mtsai., 2001) keresendők.

Európában, Kanadában és Ausztráliában, ahol mindkét kórokozó bizonyítottan jelen van, 5-től 50%-ig terjedő termésveszteséget képesek eredményezni (Hall és mtsai., 1993; Barbetti és Khangura, 1999; Zhou és mtsai., 1999). A kórokozók egyre növekvő jelentősége, valamint a klímaváltozás közötti összefüggést több megfigyelés is alátámasztja. Az általuk kialakított járványok az utóbbi időben a legsúlyosabb veszteséget Ausztrália és Franciaország mediterrán klímájú területein okozták (Fitt és mtsai., 2006a). Evans és mtsai. (2008), valamint Butterworth és mtsai. (2010) Angliában, Wales-ben, valamint Skóciában végzett tanulmánya alapján a növekvő hőmérséklet 50%-os terméscsökkenést eredményezhet. A növekvő hőmérséklet hatására a kórokozók egyre jelentősebb kárt fognak okozni az északi, skót területeken is. Egyes területeken epidémiaként akár 90%-os kárt is okozhatnak, azonban megfelelő növényvédelem mellett az általuk előidézett terméscsökkenés 10% alá csökkenthető (Sprague és mtsai., 2006; Van de Wouw és mtsai., 2016; Van de Wouw és mtsai., 2018b).

A két kórokozó együttes jelenlétét korábban már Európa számos országában – beleértve Lengyelországot (Kaczmarek és Jędryczka, 2011), Litvániát (Brazauskienė és mtsai., 2011), Csehországot (Mazáková és mtsai., 2017), Szlovákiát (Jędryczka és mtsai., 2000) – megfigyelték.

A *P. lingam*-ot Romániában 1964-ben, Szerbiában 1997-ben izolálták először (Mitrović, 1997). A *P. biglobosus* jelenlétét Szerbiában 2016-ban, 2010-ben gyűjtött repcemintákból izolálva mutatták ki (Mitrović és mtsai., 2016).

1996 őszén az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet Növénykórtani Osztályának Magkórtani Csoportja *P. lingam*-mal fertőzött vetőmagokat figyelt meg az őszi káposztarepce vetőmagtétel vizsgálatának során. Ezeket a vetőmagtétel Kemenesszentpéteren, Bakonygyepesen, Pápán, valamint Nyőgéren állították elő (Jakabné és mtsai., 1997). A korábbi megfigyelések ellenére hazánkban a *P. lingam* megjelenését hivatalosan 2006-ban írták le először (Magyar és mtsai., 2006; Szlávik és mtsai., 2006). Varga (2014) feljegyzései alapján az utóbbi időben a plenodómuszos betegség a Kárpát-medencében is a repce növényvédelmének egyik legjelentősebb tényezőjévé vált. A betegséget okozó másik kórokozó, a *P. biglobosus* jelenléte egészen 2018-ig ismeretlen volt hazánkban (Bagi és mtsai., 2020).

A kórokozók gazdasági jelentőségét alátámasztja, hogy a világ több régiójában előrejelző modelleket is fejlesztettek az ellenük való hatékonyabb védekezés érdekében. Franciaországban egy kezdetleges előrejelzési módszert dolgoztak ki, amely információt biztosít az első *P. lingam* aszkospórák várható kiszóródásáról. Az aszkospórák kiszóródásához a betakarítás után 16-19 egymást követő esős nap, valamint 14 °C alatti napi átlagos léghőmérséklet szükséges (Pérès és Poisson, 1997; West és mtsai., 2000). Ezen módszer alkalmazásával optimalizálták a fungicidekkel történő permetezés időpontját, valamint ennek köszönhetően csökkenthető volt a kijuttatandó fungicid mennyisége is (Penaud és Walker, 2015). Az Ausztráliában fejlesztett Blackleg Sporacle előrejelző modell szintén a hőmérsékleten és az esőzéseken alapul. Előrevetíti, hogy az aszkospórák kiszóródása 43 nappal a betakarítás után fog bekövetkezni, ha 10 napon keresztül az átlagos hőmérséklet 22 °C alatt lesz, valamint legalább heti 4 mm a csapadék mennyisége (Salam és mtsai., 2003). A franciaországi, valamint az ausztráliai előrejelzési módszerek alkalmazása az adott ország klimatikus viszonyai miatt korlátolt. Salam és mtsai. (2007) tesztelték a Blackleg Sporacle előrejelzési modellt, újrakalibrálták ausztráliai, kanadai, franciaországi, lengyelországi és az egyesült királyságbeli környezeti viszonyok alapján, majd ezután tesztelték a továbbfejlesztett változatot. Így hozták létre a SporacleEzy modellt, amely már több régióban is alkalmazható.

Az előrejelző modellek összességében hozzájárulhatnak a kórokozók elleni védekezési stratégiák optimalizálásához azáltal, hogy az alkalmazásukkal csökkenthető a növényi maradványokon fennmaradó inokulum mennyisége, amely további fertőzési forrásként szolgálna (Salam és mtsai., 2007).

2.4. A kórokozók által előidézett tünetek

A kórokozók által előidézett tünetek már csíranövény korban megfigyelhetők, de többnyire az első néhány levélen jelentkeznek először (Brachaczek és mtsai., 2016). A *P. lingam* és a *P. biglobosus* a leveleken nagyon hasonló, kivilágosodó közepű, kerekded, több mm átmérőjű léziókat okoz (Keszthelyi és Kazinczi, 2014). Johnson és Lewis (1994) a *P. biglobosus* által okozott léziókat többnyire kisebbnek és kevésbé intenzíven sporulálónak tartották. Mazáková és mtsai. (2017) is a kisebb, sötétebb, csupán néhány piknídiumot tartalmazó, vagy piknídium nélküli, sötét szegéllyel rendelkező foltokat a *P. biglobosus*, míg a nagyobb, halványabb szürke színű, kevés piknídiumot tartalmazó, szegély nélküli léziókat a *P. lingam* fertőzésének tulajdonították.

A *P. lingam* a száron, virágzati tengelyen, valamint a becőtermésen bemélyedő, rothadó, megrepedező, majd később beszáradó, sötétbarna léziókat (Keszthelyi és Kazinczi, 2014), a magon elszíneződést, valamint deformációt okoz (Chen és mtsai., 2010). A fertőzés bekövetkeztével a szár alapi, gyökérnyaknál elhelyezkedő része, valamint a gyökér elfeketedik (Howlett, 2004; Keszthelyi és Kazinczi, 2014). A kórokozó által kialakított legveszélyesebb tünet a szárrák, amely szártörést és ezáltal termés kiesést eredményez (Fernando és mtsai., 2007). Egyes megfigyelések szerint azon növények esetében, amelyek már csíranövény korban megfertőződtek, sokkal nagyobb eséllyel alakul ki szárrák, mint azoknál, amelyek csupán fejlettebb korban fertőződtek (West és mtsai., 2001; Marcroft és mtsai., 2005). A *P. biglobosus* a *P. lingam*-hoz képest többnyire kisebb jelentőségű, mert a szár alapi része feletti régióban idéz elő léziókat (West és mtsai., 2002).

2.5. A kórokozók morfológiai és tenyészbélyegei

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* morfológiailag rendkívül hasonló, de genetikailag különböző fajok (Howlett és mtsai., 2001). A két kórokozót klasszikus mikológiai módszerekkel a morfológiai bélyegeik alapján nem lehet egyértelműen elkülöníteni (Johnson és Lewis, 1994).

A *P. lingam* piknídiuma sötétbarna színű vagy fekete, rendelkezik osztiólummal, valamint a növényi szövetbe ágyazódott (Smith és Sutton, 1964). Hosszanti átmérőjének mérete 200 µm-nél nagyobb, akár 600 µm is lehet (Ghanbarnia és mtsai., 2011). Fala többrétegű, vékony pszeudoparenchimából áll, amit egy vastag falú, sötét színű szkleroplektenchima vesz körbe, parafízisek nem találhatók a piknídiumokban. Az érett piknídium ürege általában szabálytalan (Boerema és mtsai., 1994). A piknídiumban elhelyezkedő konídiumok hengeresek, végük lekerekített, színük világosbarna vagy hialin, méretük $3-5 \times 1,2-2$ µm (Smith és Sutton, 1964).

A *P. biglobosus* piknídiuma hasonlít a *P. lingam* piknídiumára. Formája kerekded, mérete $200 \times 400 \mu\text{m}$, felülete sima. Rendelkezik osztiólummal, amely hengeres, közepén helyezkedik el, fala egyenes, hossza $150\text{-}200 \times 100 \mu\text{m}$, fala $15\text{-}20 \mu\text{m}$ vastag, külső $2\text{-}4 \mu\text{m}$ -es pszeudoparenchima rétege sötét színű, belső $6\text{-}8$ sejtrétege hialin, szögletes sejtekből áll. A piknídium fala egységesen $18\text{-}24 \mu\text{m}$ vastagságú, külső $4\text{-}6 \mu\text{m}$ -es pszeudoparenchima rétege sötét, szögletes sejtek alkotják. A piknídiumban lévő konídiumok formája egyenes henger, mérete $4\text{-}5 \times 1,5\text{-}2 \mu\text{m}$, fialid fűzi le, tömegesen világosbarna színű, de egyedül hialin (Shoemaker és Brun, 2001).

A *P. lingam* pszeudotéciuma szubepidermálisan a növény szövetébe, jellemzően a szárába van beágyazódva. Mérete a $600 \mu\text{m}$ -es átmérőt is elérheti, gömb alakja van, amelynek alja kissé lapított, alig észrevehetően kúpos nyaki résszel rendelkezik. Fala részben szkleroplektenchimikus. A pszeudotéciumban lévő aszkuszok $120\text{-}135 \times 12\text{-}16 \mu\text{m}$ nagyságúak, 8 spórát tartalmaznak, a spórák felül 4 rekeszesek, alul pedig 2 rekeszből állnak. Az aszkospórák $45\text{-}55 \times 6\text{-}7 \mu\text{m}$ -esek, keskenyek, orsó alakúak, 5 részre szeptáltak, sárgás-barna színűek (Shoemaker, 1984; Boerema és mtsai., 1994).

A *P. biglobosus* pszeudotéciuma különbözik a *P. lingam* pszeudotéciumától. A növény szövetébe ágyazódva, szubepidermálisan helyezkedik el, színe sötét, formája kerekded, amelynek alja enyhén lapított. Átmérője $280\text{-}350 \mu\text{m}$, felülete sima, kívülről laza, hialin micéliumréteg határolja. Nyaki része központi elhelyezkedésű, alakja kissé kúpos, hossza $200\text{-}400 \mu\text{m}$, szélessége $200\text{-}300 \mu\text{m}$, $8\text{-}10$, néha 15 réteg sokszög alakú pszeudoplektenchima sejtéből áll, amelyek átmérője $6\text{-}8 \mu\text{m}$. Ezekben a rétegekben elszórtan néhány nagyobb, $25\text{-}30 \mu\text{m}$ átmérőjű sejt is megtalálható. A nyaki rész belső oldalán elszórtan hialin perifizisek is előfordulnak, amelyek $10\text{-}20 \times 5\text{-}6 \mu\text{m}$ nagyságúak (Shoemaker és Brun, 2001).

Habár a két kórokozó morfológiai bélyegeik alapján nem különíthető el, tenyészbélyegeik alapján könnyebben megkülönböztethetők egymástól (Mitrović és mtsai., 2016). Míg a *P. lingam* tenyészete agar tartalmú táptalajon lassabb növekedésű, valamint a tenyészet széle szabálytalan, addig a *P. biglobosus* izolátumok sokkal gyorsabban és egyenletesebben növekednek (McGee és Petrie, 1978; Humpherson-Jones, 1983; Koch és mtsai., 1989), tenyészetük szabályos kör alakú, a micélium laza szerkezetű, eleinte fehér, fehéres szürke színű, valamint a kórokozó légmicéliumot is képez (Mitrović és mtsai., 2016).

A különböző fajokhoz tartozó izolátumok a vízdoldható sárgás-barna vagy pirosas-barna pigment felhalmozásában is különböznek (McGee és Petrie, 1978; Koch és mtsai., 1989; Johnson és Lewis, 1990). Mitrović és mtsai. (2016) az általuk vizsgált *P. biglobosus* izolátumok esetén a 15 napos tenyészeteknél már intenzív sárgás-barna pigmenttermelést figyeltek meg a

micéliumban. A *P. lingam* izolátumaik esetében egy idő után fekete pigmentek keletkeztek a micéliumban agar tartalmú táptalajon (Mitrović és mtsai., 2016).

Calvert és mtsai. (1949) kutatásuk során izolátumaikat egy fajhoz tartozónak tekintették, azonban megfigyelték, hogy egyes izolátumok *in vitro* nem hoztak létre piknídiumot, más izolátumoknál csupán elszórtan, vagy bőségesen keletkeztek piknídiumok. Boerema (1976) megfigyelése alapján táptalajon a *P. lingam* izolátumok változatosak a piknídiumok termelését tekintve. McGee és Petrie (1978) vizsgálata során a *P. lingam* izolátumok piknídiumok tömegét hozták létre, míg a *P. biglobosus* izolátumok V8 agaron csupán néhány piknídiumot képeztek. Az ausztrál izolátumok nem termeltek piknídiumot *in vitro* körülmények között. Mitrović és mtsai. (2016) vizsgálatuk során tenyészeiket 25 ± 1 °C-on termosztátban tartva piknídiumok keletkezését figyelték meg burgonya-dextróz agar (PDA, potato dextrose agar) táptalajon mindkét faj esetében. Az általuk vizsgált *P. lingam* tenyészetek közül néhány esetben 220-510 µm-es, míg a tíz *P. biglobosus* izolátum esetében 240-480 µm-es nagyságú piknídiumokat figyeltek meg, amelyek rózsaszínes konídiummasszát bocsátottak ki.

A pszeudotéciumok mindkét faj esetében létrejöhetnek mesterséges táptalajon abban az esetben, ha ellentétes párosodási típusokat keresztezünk egymással, viszont a két faj közötti ivaros szaporodás nem bizonyított (Gall és mtsai., 1994; Somda és mtsai., 1997; Balesdent és mtsai., 2001). Delwiche (1981), valamint Petrie és Lewis (1985) kísérletet tett a két faj keresztezésére *in vitro*, azonban vizsgálatuk során nem keletkeztek pszeudotéciumok.

A két kórokozó tenyészbélyegei változatosak lehetnek, ezért megbízható elkülönítésük kizárólag molekuláris módszerrel lehetséges (Rouxel és mtsai., 2004).

2.6. A kórokozók azonosítása molekuláris módszerekkel fajszenen

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* azonosítására több, általánosan elterjedt módszer létezik: *in vitro* tenyészetek létrehozása és a tenyészbélyegek alapján történő fajszenintű meghatározás (Mitrović és mtsai., 2016), toxintermelés értékelése (Balesdent és mtsai., 1992), sirodezmin termelés vizsgálata (Williams és Fitt, 1999), valamint a virulencia mértékének értékelése különböző rezisztenciagénekkel rendelkező fajtákon (Ghanbarnia és mtsai., 2012). Ezek a vizsgálatok azonban gyakran rendkívül idő- és munkaigényesek, nem elég érzékenyek, nem elég megbízhatóak, valamint nem minden esetben megfelelőek ezen közeli rokon fajok elkülönítéséhez. Ezzel ellentétben a nukleinsav alapú polimeráz láncreakció (PCR, polimerase chain reaction) alapú eljárások használata ebben a tekintetben rendkívül előnyös, mert pontosak, érzékenyek és lehetővé teszik a fitopatogének gyors meghatározását.

White és mtsai. (1990) által tervezett univerzális ITS4 és ITS5 primerek felhasználásával, Liu és mtsai. (2006) a *P. lingam* és a *P. biglobosus* riboszomális RNS-t kódoló sejtmagi dezoxiribonukleinsavának (rDNS) Internal Transcribed Spacer (ITS) régióit és az 5,8S rDNS gént tartalmazó szakaszát szaporították fel. A szerzők a szekvenciák összehasonlítását követően olyan primereket terveztek, amelyek segítségével egy PCR reakcióban lehetővé vált a *P. lingam* és a *P. biglobosus* azonosítása és egymástól való elkülönítése a célszekvencia mérete alapján (multiplex PCR).

A kórokozók jelenlétének kimutatására további módszerek is alkalmasak. A két faj levegőben terjedő askospóráinak mennyiségi meghatározására Kaczmarek és mtsai. (2009) valós idejű PCR-t alkalmaztak. Jellemzős tüneteket mutató őszi káposztarepce magokból univerzális ITS4 és ITS5 primerek segítségével Song és mtsai. (2016) nested (fészek) PCR-rel mutatták ki a *P. lingam*-ot. Schnippenkoetter és mtsai. (2021) kutatásuk során a *P. lingam*-ot, valamint a patogén DNS-ének mennyiségét csepp digitális polimeráz láncreakció (ddPCR, droplet digital PCR) segítségével határozták meg *in planta*. Du és mtsai. (2021) Kínában a *Plenodomus* populáció monitorozására egy ún. hurok által közvetített izotermikus amplifikáció (LAMP, loop-mediated isothermal amplification) reakción alapuló diagnosztikai eljárást fejlesztettek ki. Ehhez a módszerhez 615 bázispár (bp) hosszúságú *P. biglobosus* 'brassicae'-ből származó DNS szekvenciát használtak fel, amely előállításához korábban véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS (RAPD, random amplified polymorphic DNA) módszert alkalmaztak. A LAMP reakcióhoz használt primerkészlet a *P. biglobosus* 'brassicae'-re nézve specifikus és rendkívül érzékeny volt, reakciónként már 132 femtogram (fg) mennyiségben is képesek voltak kimutatni a *P. biglobosus* 'brassicae' DNS-ének jelenlétét.

2.7. A *P. lingam* és a *P. biglobosus* genetikai változékonysága

A *P. lingam* esetében kettő, a 'brassicae' és a 'lepidii', míg a *P. biglobosus* esetében hét különböző szubklád különíthető el, amelyek a 'brassicae', a 'canadensis', a 'thlaspii', az 'erysimii', az 'australensis', az 'occiaustralensis' és az 'americensis' (Mendes-Pereira és mtsai., 2003; Vincenot és mtsai., 2008; Zou és mtsai., 2019). A szubkládokba történő besorolás a földrajzi elterjedésen, a gazdanövényeken, valamint a filogenetikai analízisen alapult (Zou és mtsai., 2019). Az eddigiek során a repcéről kimutatott *Plenodomus* izolátumok a *P. lingam* 'brassicae' (Mendes-Pereira és mtsai., 2003), a *P. biglobosus* 'brassicae' (Liu és mtsai., 2014), 'canadensis' (Van de Wouw és mtsai., 2008; Dilmaghani és mtsai., 2009), 'australensis' (Plummer és mtsai., 1994; Voigt és mtsai., 2005), valamint az 'occiaustralensis' (Vincenot és mtsai., 2008; Dilmaghani és mtsai., 2009) szubkládokba tartoztak. A *P. biglobosus* szubkládjai közül a 'brassicae' a

leelterjedtebb, a legtöbb repcetermesztő régióban megtalálható (Liu és mtsai., 2014). A *P. biglobosus* 'canadensis'-t eddig a *B. napus*-ról, illetve a *B. rapa*-ról izolálták Kanadában és Ausztráliában, filogenetikailag ezen szubklád helyezkedik el legközelebb a *P. biglobosus* 'brassicae' szubkládhoz (Van de Wouw és mtsai., 2008; Dilmaghani és mtsai., 2009). A 'thlaspii', az 'erysimii', az 'australensis' és az 'occiaustralensis' szubklád kevésbé elterjedt, csupán néhány specifikus esetben izolálták. A *P. biglobosus* 'thlaspii'-t keresztesvirágú gyomnövényről, a *Thlaspi arvense*-ről, Kanada középső régiójában mutatták ki. A *P. biglobosus* 'erysimii'-t *Erysimum* spp.-ről szintén Kanadában (Mendes-Pereira és mtsai., 2003), a *P. biglobosus* 'australensis'-t *B. napus*-ról és *B. rapa*-ról az Egyesült Államokban és Ausztráliában (Plummer és mtsai., 1994; Voigt és mtsai., 2005), a *P. biglobosus* 'occiaustralensis'-t pedig főként olyan repcékről izolálták, amelyek *B. rapa* sp. *sylvestris*-ből és vad retekéből (*Raphanus raphanistrum*) származó rezisztenciagénekkel rendelkeztek. Ezek az izolátumok Ausztrália nyugati részéről, Chiléből és az Amerikai Egyesült Államok egyik tagállamából, Georgiából származtak (Vincenot és mtsai., 2008; Dilmaghani és mtsai., 2009).

King és West (2022) a kutatásuk során rávilágított arra, hogy a *P. biglobosus* szubkládjainak elterjedését vizsgálni szükséges, mert egyre növekvő problémát jelent a repcetermesztők számára (Huang és mtsai., 2014). Korábban kizárólag a *P. biglobosus* 'brassicae' szubklád jelenlétét mutatták ki Európában (Mendes-Pereira és mtsai., 2003; Liu és mtsai., 2014), azonban 2022-ben a *P. biglobosus* 'canadensis' jelenléte is bizonyítottá vált (King és West, 2022).

A riboszomális DNS szekvenciák, úgy, mint a 18S kis alegység (SSU, small subunit) és a 28S nagy alegység (LSU, large subunit) szakasz bizonyos részei rendkívül konzerváltak, valamint alkalmasak arra, hogy vizsgálatukkal a rendek és az országok elkülöníthetők legyenek egymástól (Balesdent és mtsai., 1998; de Gruyter és mtsai., 2009). Az ITS régiókat és az 5,8S rDNS gént már évek óta alkalmazzák az *Ascomycota* gombák fajsztípus meghatározására, valamint a fajon belüli diverzitás megfigyelésére (White és mtsai., 1990; Capote és mtsai., 2012). Zou és mtsai. (2019) a szubkládok meghatározásához, valamint a filogenetikai analízishez a riboszomális DNS ITS régióit használták mindkét faj esetében. Mendes-Pereira és mtsai. (2003) a klaszteranalízishez a β -tubulin-2 gén (*tub2*) szekvenciáit is felhasználták, de ezeket a szekvenciákat a nemzetközi adatbázisban (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Európai Nukleotid Archívum (ENA, European Nucleotide Archive)) nem publikálták. A két kórokozó β -tubulin fehérjéit kódoló szekvenciákat Voigt és mtsai. (2005) is vizsgálták, amelyek eredményeik alapján rendkívül hasonlóak voltak. Chen és mtsai. (2015) az RNS polimeráz II második nagy alegységét (*rpb2*, RNA polymerase II second largest subunit régiót) is elemezték. Az *rpb2* régió

informatívabb és változékonyabb, mint az ITS régió, így ez alapján a faj alatti különbségek könnyebben vizsgálhatók (Drehmel és mtsai., 2008).

Voigt és Wöstemeyer (2000) filogenetikai vizsgálataikhoz a konzervált, aktin fehérjét kódoló gént (*act1*) választották. Ezen vizsgálatok alapján a későbbiekben Voigt és mtsai. (2005) többek között a *P. lingam* és a *P. biglobosus* szekvenciáit is összehasonlították. Eredményeikkel alátámasztották, hogy a két kórokozó esetében ez a régió rendkívül hasonló.

2.8. A kórokozók biológiája

2.8.1. A kórokozók életmódja

A fertőzött növényi maradványokból kiszabaduló aszkospórák és konídiumok elsődleges fertőzési forrásként szolgálnak a fiatal repcenövények számára. Míg az inokulumok fennmaradási ideje a növényi maradványokon Európában kevesebb, mint két év, addig Nyugat-Ausztráliában akár több, mint négy évig is fertőzőképesek maradhatnak (West és mtsai., 2001; Fitt és mtsai., 2006a). A kórokozók terjedése leginkább a levegőben lévő aszkospórák által történik, amelyek epidémia kialakulásához is vezethetnek (Gladders és Musa, 1980). Az aszkospórák kiszóródásának mértéke 5 és 20 °C-os léghőmérséklet között nem különbözik jelentősen, azonban esőzések hatására szignifikánsan emelkedhet (Huang és mtsai., 2005). Az esőcseppek által történő terjedésük főként 14 cm-es távolságon belül következik be (Travadon és mtsai., 2007), azonban a spórák szél által akár 10 km-es távolságra is eljuthatnak (Piliponyte-Dzikiene és mtsai., 2014). A csapadékos időjárás, valamint a téli, tavasz eleji környezeti körülmények kedveznek a kórokozók felszaporodásának (Bokor, 1972).

A kórokozók a repce magjait is fertőzik, így a kontinensek közötti áruszállítás lehetőséget teremt a kórokozók terjedéséhez világszerte (Hall és mtsai., 1996). Habár korábban a *P. lingam*-ot Kínában a karantén kórokozók között tartották számon, a repcemagok Kanadából történő importálásának köszönhetően ebben az országban is kimutatható a kórokozó jelenléte (Chen és mtsai., 2010).

Egyes feltételezések szerint a két kórokozó hemibiotróf parazita. A tenyészidőszak elején és végén rövid ideig fakultatív parazita (nekrotrof) életmódot folytatnak, amely alatt a toxinok és a degradációs enzimek által levélfoltosságot, valamint a száron rákos sebeket és léziókat alakítanak ki. Ezen két szakasz között endofita fázisban biotróf életmódot folytatnak. Ez a periódus a levélfoltosság kialakulásától a száron megjelenő lézióig tart. Ekkor a kórokozók micéliuma a levél és a szár szállítónyalábjában intercellulárisan növekszik (Fernando és mtsai., 2007), amelynek hatására csökken a víz, valamint a tápanyagok szállítása (Hammond és mtsai., 1985).

Annak ellenére, hogy a *P. lingam* és a *P. biglobosus* epidemiológiája hasonló, fertőzési stratégiájuk azonos és gyakran együtt fordulnak elő a fertőzött növények szöveteiben, a kórokozók patogenitása és a betegség mértéke gyakran számottevően különbözik (West és mtsai., 2002). A két kórokozó életmódjában eltérő, hogy a pszeudotéciumok a *P. lingam* esetében korábban, míg a *P. biglobosus* esetén később jelennek meg. Emiatt a pszeudotéciumok érése (Toscano-Underwood és mtsai., 2003), valamint az aszkospórák kiszóródásának időszaka is különböző időszakra tehető. A *P. lingam* aszkospórái kora ősszel és télen, míg a *P. biglobosus* aszkospórái késő ősszel, télen, és/vagy tavasszal fertőzőképesek (Huang és mtsai., 2005).

2.8.2. A kórokozók párosodási típusai

A fenotípusosan megjelenő, valamint a molekuláris különbségek mellett a genetikai inkompatibilitás is megerősíti azt a tényt, miszerint a *P. lingam* és a *P. biglobosus* két külön faj (Koch és mtsai., 1991; Somda és mtsai., 1996; Shoemaker és Brun, 2001). Az ivaros szaporodásukra bipoláris heterotallizmus jellemző (Shoemaker és Brun, 2001). A heterotallikus gombák esetében fajonként két különböző párosodási típus, vagyis két különböző meiospórából származtatható sejt/hifa szükséges az ivaros szaporodáshoz. A párosodási típusok kifejeződéséért az ún. MAT (mating type) lókuszek felelősek a genomban (Kovács, 2013), amelyek közül a *P. lingam* esetében – az egyéb *Dothideomycetes* osztályba tartozó gombákhoz hasonlóan – egy darab található meg. A MAT lókusznak ennél a fajnál két alternatív formája (idiomorf allélja) van (bipoláris), amelyeknek különbözniük kell az adott kórokozó ivaros szaporodásához (Cozijnsen és Howlett, 2003; Kovács, 2013).

Cozijnsen és Howlett (2003) meghatározták a *P. lingam* 'brassicae' genom egyes régióinak nukleotid szekvenciáit, beleértve a MAT lókuszt is. A MAT-lókuszon elhelyezkedő gén idiomorf alléljai a MAT1-1 és a MAT1-2. A MAT1-1 allél 1368 bp-ból áll, 441 aminosavból álló fehérjét kódol, valamint egy 45 bp-ból álló intront tartalmaz. A MAT1-2 allél 1246 bp-ból áll, 397 aminosavból álló fehérjét kódol és egy 55 bp hosszúságú intron található meg benne.

Cozijnsen és Howlett (2003) által tervezett primerkészlet egyes primerei a nukleotid sorrend vizsgálatán kívül az izolátumok párosodási típusának meghatározására is alkalmasak. A kutatók két specifikus szensz és egy univerzális antiszensz primer felhasználásával multiplex PCR-t végeztek, amely során a MAT gén különböző hosszúságú fragmentumai szaporodtak fel. A MAT1-1 allél esetében 686 bp, míg a MAT1-2 allél esetében 445 bp hosszúságú amplikon képződött, ezáltal a *P. lingam* 'brassicae' két párosodási típusa jól elkülönült. Ezen vizsgálat lehetővé teszi egy területen lévő *P. lingam* 'brassicae' populáció genetikai vizsgálatát abból a

célből, hogy jellemezhesük a genetikai diverzitását, valamint az ivaros szaporodás fennállásának járványtanilag betöltött szerepét (Cozijnsen és Howlett, 2003).

2.9. A kórokozók elleni védekezés lehetőségei

A szántóföldi növények, így a repce esetében is az élelmiszerbiztonságot érintő kérdések miatt egyre nagyobb szükség van arra, hogy megértsük a klímaváltozás növényekre gyakorolt hatásait, valamint azokat az alkalmazkodási stratégiákat, amelyek a rendelkezésünkre állnak a kórokozók által indukált veszteségek csökkentésében (Barnes és mtsai., 2010).

Ilyen nélkülözhetetlen stratégiai elemek az integrált szemlélet alapjait képező rezisztens hibridek alkalmazása, valamint az okszerű növényvédelem, amelyek a *P. lingam* és a *P. biglobosus* elleni növényvédelem alappilléreit is képezik. Ezek mellett az agrotechnikai elemekkel, mint például a talajműveléssel, a vetésforgó bővítésével, a vetés időpontjának megválasztásával, a növényesűrűség beállításával, valamint a növények nitrogénellátásának kialakításával is körültekintően kell eljárni (Aubertot és mtsai., 2004).

2.9.1. A kórokozók elleni rezisztencianemesítés

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* közül a nagyobb gazdasági veszteséget a *P. lingam* okozza, így a kórokozó elleni rezisztencia kialakítása a növénynevelők számára jelentős kutatási terület (Shoemaker és Brun, 2001; Delourme és mtsai., 2006). A *Brassica* fajok és a *P. lingam* közötti genetikai kölcsönhatás már számos vizsgálat tárgyát képezte (Delourme és mtsai., 2006), a *P. biglobosus* elleni rezisztenciára viszont ezidáig kevesebb figyelmet fordítottak, emiatt a rezisztenciaforrások felkutatására további vizsgálatok szükségesek (Fitt és mtsai., 2006a).

2.9.1.1. Monogénikus (rassz-specifikus, vertikális, kvalitatív) rezisztencia

A monogénikus rezisztencia a csíranövény és a kifejlett növény esetében egyaránt kifejeződik (Fitt és mtsai., 2006a). A monogénikus rezisztencia kifejeződése a *P. lingam* tekintetében általában a rassz-specifikus rezisztenciáért felelős génnek (*Rlm*, resistance to *Leptosphaeria maculans*) köszönhető (Hayward és mtsai., 2012). Ezen gén (*Rlm*) a *P. lingam* rasszainak megfelelő avirulencia génjeit (*AvrLm*) ismeri fel. A két gén közötti kölcsönhatás által a növény védekező mechanizmusa működésbe lép (Vincenot és mtsai., 2008). A *B. napus*-ban és a vele rokonságban lévő növényekben számos rassz-specifikus gént azonosítottak (Delourme és mtsai., 2006; Fitt és mtsai., 2006a).

A különböző repce fajtákban és hibridekben különböző *P. lingam* izolátumokkal való vizsgálatok során hat rezisztenciagént azonosítottak: az *Rlm1*-et a 'Quinta' (Ansan-Melayah és mtsai., 1998), az *Rlm2*-t és az *Rlm3*-at a 'Glacier' (Ansan-Melayah és mtsai., 1998; Balesdent és

mtsai., 2002), az *Rlm4*-et a 'Jet Neuf' fajtában (Balesdent és mtsai., 2001), az *Rlm7*-et nem kereskedelmi vonalakban (Balesdent és mtsai., 2002), az *Rlm9*-et pedig a 'Darmor' (Delourme és mtsai., 2004) fajtában találták meg. A gének közül öt (*Rlm1*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* és *Rlm9*) az N7-es kapcsoltsági csoportba, az *Rlm2* gén pedig egy másik kapcsoltsági csoportba tartozik (Delourme és mtsai., 2004; 2006).

A *P. lingam* a nemesítés során kialakított rezisztencia gyors áttörésére képes (Van de Wouw és mtsai., 2010; 2014). Franciaországban a 2000-es évek elején számoltak be a rezisztencia áttöréséről (Brun és mtsai., 2000), ami a *P. lingam* populációjában bekövetkező változást igazolja. A monogén rezisztenciával rendelkező fajták széleskörű alkalmazásával a kórokozó könnyebben válik képtessé az adott rezisztenciagén áttörésére, ennek köszönhetően egyes megfigyelések szerint az *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm4* géneket bizonyos területeken már áttörték a kórokozó jelenlévő populációi (Rouxel és mtsai., 2003). Annak érdekében, hogy egy adott rezisztenciagén áttörését megelőzzék, ahogy a világ nagy részén, úgy Franciaországban is a különböző rezisztenciagénnel, vagy rezisztenciagénekkel rendelkező fajtákat váltogatják (Gladders és mtsai., 2006). Azokban az országokban, ahol a *P. lingam* jelentős járványokat idéz elő, a nemzeti fajtaregisztráció során a kórokozóval szembeni rezisztencia alapvető követelménynek számít (Fitt és mtsai., 2006a).

A *P. biglobosus* izolátumok esetében a *P. lingam*-ra jellemző, a kórokozó és a gazdanövény közötti speciális, rezisztenciáért felelős kölcsönhatás nem figyelhető meg (Vincenot és mtsai., 2008). Néhány eredmény arra enged következtetni, hogy a *P. lingam*-mal szembeni rezisztenciáért felelős gének nem hatékonyak a *P. biglobosus*-szal szemben. Például a 'Vivol' fajtában megjelenő *Rlm1* gén (Brun és mtsai., 1997) és az MX vonalakban megjelenő *Rlm6* gén is mutat rezisztenciát a *P. lingam*-mal szemben, a *P. biglobosus*-szal szemben viszont nem működnek eredményesen (Somda és mtsai., 1998).

2.9.1.2. Poligénikus (horizontális, kvantitatív) rezisztencia

Néhány *B. napus* fajtában feltételezhetően nem rassz-specifikus, hanem a kvantitatív tulajdonságokat meghatározó lókuszek (QTL, Quantitative Trait Loci) régiója által közvetített poligénikus rezisztencia jelenik meg. A kromoszómákon belül a QTL régióban a mennyiségi tulajdonságok kialakításában szerepet játszó gének (*QR*) találhatóak (Delourme és mtsai., 2006; Fitt és mtsai., 2006a). Az utóbbi években egyre inkább a szárrák elleni kvantitatív rezisztencia kutatása került a középpontba, a különböző *Brassica* fajokban több rezisztenciagént is találtak (Jestin és mtsai., 2011; Huang és mtsai., 2016).

A rassz-specifikus rezisztenciával szemben a poligénikus (horizontális) rezisztencia (*QR*) csupán részleges védelmet nyújt a *P. lingam*-mal szemben, emiatt abban az esetben, ha az inokulum koncentrációja magas, nem tudja megelőzni a nagy termés kiesést (Salisbury és mtsai., 1995; Khangura és Barbetti, 2001; Marcroft és mtsai., 2003). Kifejeződése csak a levél fertőződése után várható, így nem gátolja meg a patogén megtelepedését, csupán csökkenti a tünet súlyosságát és/vagy a járvány kialakulásának esélyét (Hayward és mtsai., 2012).

A kvantitatív rezisztencia sokkal tartósabb rezisztenciának bizonyul, mint a kvalitatív rezisztencia, mert a patogén sokkal lassabban küzdi le, mint a rassz-specifikus rezisztenciagéneket (Lindhout, 2002; Boyd, 2006).

A QTL régiókat kapcsoltságra irányuló analízisek folyamán azonosították olyan populációkban, amelyek két szülő (*Brassica napus* × *Brassica* sp.) keresztezésekből származtak (Flint-Garcia és mtsai., 2003; Delourme és mtsai., 2006; Rimmer, 2006). Az utóbbi időben számos vizsgálat irányult a 'Darmor' fajtára, amelyben felfedezték a poligénikus rezisztenciáért felelős QTL régiókat. A QTL régiók által ez a fajta rezisztenciaforrásként szolgál a nemesítők számára (Pilet és mtsai., 1998; Pilet és mtsai., 2001; Jestin és mtsai., 2011).

Egyes vizsgálatok alátámasztják, hogy a kvantitatív rezisztencia, akár önmagában, akár rassz-specifikus génekkel kombináltan alkalmazva, fő alkotóelemét képezi a patogén elleni tartós védelemnek. A *P. lingam* elleni poligénikus rezisztenciával rendelkező 'Jet Neuf' fajtát széleskörűen termesztették az 1970-es és 1980-as években Európa-szerte anélkül, hogy elveszítette volna a szántóföldön kialakított hatékonyságát a kórokozó ellen (Pinochet és mtsai., 2003). Egyes vizsgálatokban kimutatták, hogy a jelentősebb rassz-specifikus rezisztenciáért felelős géneket a poligénikus rezisztenciával kombinálva lelassítható a virulens izolátumok repce növényekhez való alkalmazkodása (Brun és mtsai., 2009).

2.9.1. Agrotechnikai védekezés

Az agrotechnikai védekezés a két kórokozó ellen alapvetően a prevencióra épül. Meghatározó jelentőségű az egészséges vetőmag használata, valamint a betakarítást követően a növényi maradványok alászántása, amelyek enélkül fertőzési forrásként szolgálhatnak. Ezenkívül jelentős szerepe van a legalább 4 éves vetésforgó alkalmazásának, amely során rotációt alkalmazunk a repce és más szántóföldi növények között abból a célból, hogy elkerüljük a kórokozók fennmaradását a fertőzött növényi maradványokon (Keszthelyi és Kazinczi, 2014; Van de Wouw és Howlett, 2020).

A repcetermesztés gazdasági megtérülése, a kedvező piaci lehetőségek, valamint jó tulajdonságokkal rendelkező fajták elérhetősége Kanada nyugati részén a repce intenzívebb

termesztéséhez, valamint az optimálisnál rövidebb vetésforgó alkalmazásához vezetett (Kutcher és mtsai., 2013). Ennek köszönhetően 2010 és 2015 között ebben a régióban a plenodómuszos betegség kórokozójának előfordulása egyre gyakoribbá vált (Zhang és Fernando, 2017). Guo és mtsai. (2008) vizsgálatai alátámasztották, hogy a vetésváltás, valamint a talajművelés együttes alkalmazása szignifikánsan csökkentette a plenodómuszos betegség kórokozójára jellemző tünetek kialakulását. Abban az esetben, amikor a vetésforgóban a repce búza után következett, kevesebb volt a fertőzött növény, kevesebb fertőzött levél és lézió volt megfigyelhető növényenként, valamint alacsonyabb volt a levelek léziókkal való borítottságának aránya is.

A fertőzött növényi maradványok aláforgatása fontos szerepet játszik a plenodómuszos betegség kórokozói elleni védekezésben. Ezzel a módszerrel felgyorsíthatjuk a maradványok bomlását, valamint lerövidítjük ezen kórokozók élettartamát (Huang és mtsai., 2003; Peluola és mtsai., 2013). A kórokozók élettartamának lerövidítéséhez hozzájárulnak azok a lebontó és antagonistá szervezettek, amelyek aktivitásukkal képesek csökkenteni a talajba forgatott növényi részekben lévő növénypatogén gombák mennyiségét (Naseri és mtsai., 2008).

2.9.2. Kémiai védekezés

A plenodómuszos betegség kórokozói ellen már a vetőmag csávázásakor védekezhetünk (Van de Wouw és mtsai., 2018a). Csávázásra alkalmas mikroorganizmus a *Bacillus amyloliquefaciens* MBI 600-as törzse, amelynek hatásmechanizmusát a 2.9.4. pontban részletezem. A magon is felszaporodó kórokozók (*Plenodomus* sp., *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola*, *Rhizoctonia solani*, *Peronospora parasitica*) által okozott csírákori pusztulás ellen fungicid hatóanyagok is alkalmazhatók (Internet4). A fungicid hatóanyagokkal szembeni rezisztencia késleltetésére, illetve megelőzésére segítséget nyújt a repcetermesztők számára a Fungicid-rezisztencia Bizottság (FRAC, Fungicide Resistance Action Committee), amely a hatóanyagokat hatástani csoportokba sorolja, az azonos csoportokba tartozó hatóanyagokhoz pedig egy-egy kódszámot rendel (FRAC, 2022). A repce esetében a hatóanyagok közül a fluopikolid, valamint a fluoxastrobin alkalmazhatók csávázásra, amelyek jelenleg kombinációként vannak forgalomban (Internet4). A fluopikolid mitózist gátló (FRAC kód: 43), a fluoxastrobin sejtlégzést gátló (FRAC kód: 11) felszívódó hatóanyag. A fluopikolid esetében közepes, míg a fluoxastrobin esetében – a többi strobilurin hatóanyaghoz hasonlóan – magas a rezisztencia kialakulásának kockázata (FRAC, 2022).

A fungicid-rezisztencia kialakulásának elkerülése érdekében a későbbi fenológiai fázisok során is ajánlott a különböző hatásmechanizmussal rendelkező hatóanyagokat kombinációban,

vagy váltakoztatva alkalmazni (Fajemisin és mtsai., 2022b). Ezeket a lehetőségeket a fejezet további részében részletezem.

Manapság a *Plenodomus*-fajokkal szembeni kémiai védelem leginkább az azol-származékok alkalmazására épül (Van de Wouw és mtsai., 2018a), amelyek őszi és tavaszi kijuttatásával érhető el a leghatékonyabb védekezés (Zamani-Noor és Knüfer, 2018). Ezen hatóanyagok fungicid hatása a gombák C14 demetiláz (= 14 α -demetiláz) enzimének és ezáltal az ergoszterol bioszintézisének gátlásán alapul (Davis és mtsai., 1988). A hatásmechanizmus miatt a szterol bioszintézis inhibitor (SBI, sterol biosynthesis inhibitor) fungicidek közé (Matysiak és Kaczmarek, 2013), a demetiláz enzim gátlása miatt pedig a demetiláz inhibitor (DMI, demethylase inhibitor) fungicidek csoportjába tartoznak (Shalini és mtsai., 2011). Gyakori alkalmazásuk miatt ezen hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakulásának kockázata magas (FRAC kód: 3) (Van de Wouw és mtsai., 2018b; FRAC, 2022).

Korábbi *in vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a *P. lingam* és a *P. biglobosus* különbözik a triazolokkal szembeni érzékenységük tekintetében. A micélium növekedését vizsgálva a *P. lingam* izolátumok sokkal érzékenyebbek voltak a fluziazolra és a tebukonazolra, mint a *P. biglobosus* izolátumok, egyelőre azonban még nem tisztázott, hogy a triazolok ugyanolyan módon hatnak-e a kórokozók növekedésére *in planta*, mint *in vitro* (Eckert és mtsai., 2010). Habár Eckert és mtsai. (2010) a *P. lingam* izolátumok érzékenysége között is figyeltek meg különbségeket, nem azonosították, hogy ezen különbségek a *P. lingam* 14-demetiláz enzim (*CYP51*) (= *ERG11*) génjének mutációi miatt jöhettek létre, amely mutációk más patogének esetében fungicid-rezisztencia kialakulásához vezettek (Cools és Fraaije, 2008). A *P. lingam* populációk esetében Van de Wouw és mtsai. (2017) Ausztráliában a fluquikonazol, Yang és mtsai. (2020) Ausztráliában, valamint Fajemisin és mtsai. (2022a) Csehországban a tebukonazol hatékonyságának csökkenését figyelték meg. Van de Wouw és mtsai. (2017) molekuláris szinten is megvizsgálták a fungicid-rezisztens izolátumokat, azonban a *CYP51* gén esetében mutációt, valamint a gén kifejeződésében változást nem azonosítottak. Yang és mtsai. (2020) is megvizsgálták a kevésbé érzékeny izolátumokat molekuláris szinten. A *CYP51* gén kódoló régiójában mutációt ők sem azonosítottak, azonban különböző hosszúságú szakaszok inzercióját figyelték meg a *CYP51* gén szabályozó régiójában, amely DMI rezisztenciához vezetett.

A triazolokat nemcsak a kórokozók elleni védelem, hanem a növények növekedésének szabályozásában (= retardálásban, regulátorozásban) betöltött szerepük miatt is alkalmazzák (Berry és Spink, 2009), amelyet a gibberellin bioszintézis első lépéseinél történő gátló hatásnak tulajdonítanak (Rademacher, 2000). A triazolok javítják a repcenövények télállóságát (Balodis és Gaile, 2012), valamint csökkentik azok megdőlésének veszélyét (Matysiak és Kaczmarek, 2013),

ezen kívül pedig különféle kedvező morfológiai és fiziológiai változásokat okoznak a növényekben. A sejtek megnyúlásának gátlása miatt rövidebbek maradnak a hajtások, elősegítik a klorofill szintézist („zöldítő hatás”), változatlan marad az internódiumok és a levelek száma, a növény zömökebb lesz, mialatt a gyökér erőteljesebben növekszik. A főgyökér gyakran hosszabb és vastosabb lesz, a gyökér és a hajtás egymáshoz viszonyított növekedésének aránya a gyökér irányába tolódik el (Grossmann, 1990). A triazolok továbbá lassítják a szenescenciát a klorofill, valamint a különböző fehérjék és ásványi anyagok koncentrációjának fokozása által (Sankhla és mtsai., 1985), továbbá javítják az abiotikus stresszel szembeni ellenállóságot (Grossmann, 1990).

Növekedésszabályozás céljából a triazolok mellett az egyik leggyakrabban alkalmazott hatóanyag a mepiquat-klorid, amelyet őszi káposztarepcében többnyire kombinációban alkalmaznak (Riediker és mtsai., 2002). A növekedésszabályozásban betöltött szerepe mellett javítja a növények megdőléssel szembeni ellenállóképességét, valamint pozitívan befolyásolja a betakarítható termést minőségi és mennyiségi szempontból is (Zamani-Noor és Knüfer, 2018).

A triazolokon kívül egyéb fungicidek is rendelkezésre állnak a repcetermesztők számára. Ilyenek a külső kinon gátló inhibitor (QoI, quinone outside inhibitor) és a szukcinát dehidrogenáz inhibitor (SDHI, succinate dehydrogenase inhibitor) fungicidek. Mindkét csoport tagjai a gombasejt energiatermelésébe avatkoznak bele (Bartlett és mtsai., 2002; Avenot és Michailides, 2010).

A QoI fungicidek gátolják a mitokondriális légzést azáltal, hogy a citokróm bc₁ enzimkomplexben (komplex III) a Q_o (quinon outside) helyen gátolják a mitokondriális elektrontranszportot (Gisi és mtsai., 2002). A specifikus aktivitásuk miatt a citokróm bc₁ enzimkomplexben mutációk jöhetnek létre, amelyek fungicid-rezisztens vagy toleráns gomba vonalak megjelenését eredményezhetik (Vincelli, 2002). A mitokondriális elektrontranszport gátlása során reaktív oxigének is keletkeznek, amelyek károsítják a sejteket, valamint ezáltal hozzájárulnak a patogén gombák elleni védelemhez (Inoue és mtsai., 2012). Ebbe a csoportba tartoznak a strobilurinok is, amelyek manapság az általánosan elterjedt fungicidek közé sorolhatók. Széles hatásspektrummal rendelkező fungicidek (Ellner, 2005), hatékonyan gátolják a spórák csírázását, amely energiaigényes fázisa a gomba fejlődésének (Bartlett és mtsai., 2002). A strobilurinokkal szembeni rezisztencia kialakulásának kockázata magas (FRAC kód: 11) (Gullino és mtsai., 2000; FRAC, 2022).

A strobilurinok közé tartozó piraklostrobinnal Wang és mtsai. (2020) a kanadai *P. lingam* izolátumaikat tesztelték és a vizsgálat során az izolátumok érzékenységének változását figyelték meg. Fajemisin és mtsai. (2022b) kutatásuk során felvetették annak lehetőségét, miszerint a

P. lingam egyes izolátumai rezisztensek lehetnek a dimoxistrobinnal szemben, így ezt a hatóanyagot más hatóanyaggal kombinálva érdemes alkalmazni.

A strobilurinok nemcsak a növénypatogén gombákkal szemben nyújtanak védelmet, hanem számos fiziológiai változást is képesek előidézni a növényekben (Giuliani és mtsai., 2019). Hatással vannak a szeneszcencia késleltetésére és a levelek fokozott pigmentációjára is (Spitzer és mtsai., 2012). Jamieson és mtsai. (1999) megfigyelték, hogy azoxistrobinnal a levelek fokozott klorofillképzése („zöldítő hatás”) tovább fenntartható, valamint a betakarítható termés mennyisége is pozitívan befolyásolható. Alkalmazásuk triazolokkal való kombinációban a virágzás alatt indokolt lehet, mert a későbbi növekedési fázisokban, valamint az érési időszak alatt a növényállomány már nehezen hozzáférhető (Bečka és mtsai., 2011; Spitzer és mtsai., 2012).

Az SDHI (szukcinát dehidrogenáz inhibitor) csoportba tartozó fungicidek a gombák sejtlégzését gátolják azáltal, hogy blokkolják a mitokondriális II komplexben az ubiquinon-kötő oldalt és ezáltal gátolják a mitokondriális elektrontranszportot (Avenot és Michailides, 2010; Sierotzki és Scalliet, 2013). Ebbe a csoportba tartoznak például a repcetermesztés során is alkalmazható boszkalid, fluopiram és izopirazam hatóanyagok, amelyekkel szembeni rezisztencia kialakulásának kockázata nemcsak közepes, de egyes hatóanyagok esetében magas is lehet (FRAC kód: 7) (FRAC, 2022). A *P. lingam* izolátumok vizsgálata során Fajemisin és mtsai. (2022b) megfigyelték, hogy a boszkalid nagyon hatékonyan gátolta a micélium növekedését. Az általuk vizsgált legmagasabb koncentráció (10 µg/mL) mind a 41 izolátum micéliumnövekedését teljes mértékben gátolta, így eredményeik alapján a csehországi populációk esetében a rezisztencia kialakulását nem feltételezték. Peng és mtsai. (2020) a fluopiramot hatékonynak találták a magok csávázására.

Kaczmarek és mtsai. (2009) vizsgálatai megerősítették, hogy a két repcét megfertőző *Plenodomus*-faj különbözik a fungicidekkel szembeni érzékenységüket tekintve. Ebből arra következtettek, hogy a kórokozók populációjának összetétele és a populációban jelenlévő kórokozók aránya meghatározhatja, hogy milyen gombaölőszerral végezzük a kezelést, valamint befolyásolhatja annak időzítését is.

2.9.3. Biológiai védekezés

A kémiai növényvédelem humánegészségügyi, valamint a környezetvédelmet érintő következményei miatt egyre inkább kulcsfontosságú szerepet töltenek be a mikroorganizmusok a fitopatogén kórokozók elleni védelemben.

Ahogy számos esetben, így a plenodómuszos betegség kórokozói esetében is védekezhetünk biológiai szervezetekkel. Csávázásra és permetezésre is alkalmas az *Oomycetes*

osztályba tartozó *Pythium oligandrum* M1-es törzse (EFSA, 2020; Bělonožníková és mtsai., 2022). A *Pythium oligandrum* aktiválja a növény védekező mechanizmusát, ezáltal biztosítja a fokozott védelmet a növénypatogén kórokozókkal szemben (Benhamou és mtsai., 2012; Gerbore és mtsai., 2014). A rizoszférában a *Pythium oligandrum* az auxin prekursoraként funkcionáló triptamin termelésén keresztül elősegíti a mellékgyökerek képződését, ezáltal a növény gyökérrendszerének fejlődésében, a gyökértömeg növelésében is szerepe van (Le Floch és mtsai., 2003; Benhamou és mtsai., 2012). A gyökerek még alacsony koncentráció esetén is rendkívül érzékenyen reagálnak az auxinra, így az alacsony koncentrációban, de rendszeresen történő auxin bioszintézisnek is kulcsfontosságú szerepe lehet a növény fiziológiájára nézve (Le Floch és mtsai., 2003).

Cholerton (2015) kutatásai alapján a *Bacillus amyloliquefaciens* MBI 600-as törzsének alkalmazása is potenciálisan megfelelő védelmet nyújt a repce számára a *P. lingam* fertőzésének korai fázisában. A mikroorganizmus több hatáshelyen fejti ki a hatását (FRAC kód: BM02), a vele szembeni rezisztencia kialakulása ezidáig nem ismert (FRAC, 2022). A *Bacillus amyloliquefaciens* törzsek a gyökéren keresztül több növényfajt is képesek kolonizálni, ezáltal antagonisták aktivitásuknak köszönhetően képesek megvédeni a növényeket a fitopatogén gombákkal szemben, valamint kijuttatásuk esetén a környezetükre sincsenek negatív hatással (Zhao és mtsai., 2014). A gyökerekbe jutva serkentik a növények növekedését (Turner és Backman, 1991), antimikrobiális peptidekkel, valamint lítikus enzimekkel rendelkeznek, továbbá képesek indukálni a szisztémikus szerzett rezisztencia mechanizmusát (Samaras és mtsai., 2018).

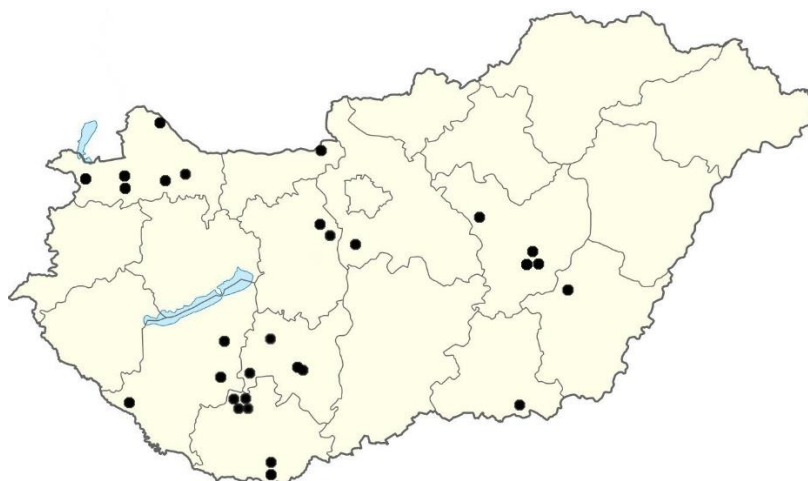
Lipková és mtsai. (2021) vizsgálata alapján az egyik legtöbbet kutatott növényi növekedésszabályozást elősegítő *Pseudomonas simiae* WCS417 baktériumnak is szerepe lehet a *P. lingam* elnyomásában, azonban ennek bizonyítására további szabadföldi kísérletek szükségesek.

Shah és mtsai. (2020) repcéről származó *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumokat vizsgáltak. A vizsgálat során a *P. biglobosus* izolátumok egy részében egy, a mikovírusok közé tartozó kétszálú RNS quadrivírus jelenlétét figyelték meg. A mikovírus eltávolítását követően vírussal fertőzött és vírust nem tartalmazó *P. biglobosus* vonalakat hoztak létre. Ezen vonalak növekedésének és virulenciájának összehasonlításával megfigyelték, hogy a vírusfertőzés hipervirulenciát és szisztémikus szerzett rezisztenciát képes előidézni a *P. lingam*-mal szemben a repce növényekben, miután vírussal fertőzött *P. biglobosus* izolátumokkal inokulálták őket. Eredményeik alapján a növényeket hipovirulens *P. biglobosus* izolátumokkal mesterségesen inokulálva hatékonyan csökkenthető lenne a *P. lingam* által előidézett veszteség a tenyészidőszak során.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgálat helye és ideje

A plenodómuszos betegség tüneteit mutató repce leveleket és szárazakat 2017 és 2021 között, az ország 29 településének közeléből, 10 vármegyéből gyűjtöttük (1. ábra). A növényi minták demonstrációs, illetve kísérleti parcellákból és üzemi táblákról származtak. A vizsgálatokat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában és üvegházában végeztük.



1. ábra 2017 és 2021 között gyűjtött minták származási helye

3.2. A vizsgálat anyaga

3.2.1. Növények és izolátumok

Az öt év során összesen 502 db, jellegzetes tünetet mutató növényi részt gyűjtöttünk (1. táblázat).

1. táblázat A gyűjtött növényi részek száma évenkénti bontásban

Év	Levélminták száma (db)	Szármenták száma (db)
2017	0	26
2018	122	40
2019	53	36
2020	27	27
2021	150	21

Amennyiben lehetőségünk nyílt rá, a mintákat ismert repcehibridekről ('Allberich KWS', 'Alvaro KWS', 'Exception', 'Factor KWS', 'Gordon KWS', 'Hybrirock', 'Marc KWS', 'PX113', 'Shrek', 'Umberto KWS') gyűjtöttük.

Az öt év alatt 308 alkalommal izoláltunk *Plenodomus*-fajt a tüneteket mutató növényi részekről (2. táblázat). A molekuláris jellemzéshez kiválasztott izolátumokat a 4. mellékletben ismertetem.

2. táblázat Az izolátumok adatai: név, származása (hibrid, növényi rész, gyűjtés időpontja és helyszíne)

Izolátum neve	Hibrid	Begyűjtött növényi rész	Gyűjtés időpontja	Gyűjtés helyszíne
L1, L2	'Allberich KWS'	szár	2017. 06. 23.	Nagylózs
L3	'Gordon KWS'			
L4, L5	'Hybrirock'	szár	2017. 07. 04.	Nagylózs
L6, L7	'Factor KWS'			
L8, L9	'Alvaro KWS'			
L10, L11	'Marc KWS'			
L12, L13	'Umberto KWS'			
L14 – L18	'Marc KWS'	levél	2018. 04. 07.	Kétpó
L19 – L23	'Gordon KWS'			
L24 – L29	'Hybrirock'	levél	2018. 04. 13.	Vadosfa
L30 – L32	'Marc KWS'	levél	2018. 04. 13.	Osli
L33 – L35	'Hybrirock'	levél	2018. 04. 13.	Bősárkány
L36, L37	'Marc KWS'	szár	2018. 06. 27.	Szalánta
L38, L39	'Umberto KWS'			
L40 – L42	'Alvaro KWS'			
L43 – L45	'Gordon KWS'	szár	2018. 06. 28.	Tordas
L46 – L50	'Hybrirock'			
L51, L52	'Marc KWS'			
L53, L54	'Alvaro KWS'			
L55 – L60	'Umberto KWS'	levél	2019. 03. 30.	Kuncsorba
L61	'PX113'	levél	2019. 03. 30.	Törökszentmiklós
L62, L63	Ismeretlen	levél	2019. 04. 22.	Dombóvár

L64, L65	Ismeretlen	szár	2019. 04. 20.	Baranyaszentgyörgy
L66 – L74	Ismeretlen	szár	2019. 07. 19.	Harkány
L75 – L95	'Shrek'	szár	2019. 07. 19.	Felsőnána
L96 – L109	Ismeretlen	levél	2019. 09. 19.	Martonvásár
L110 – L127	'Exception'	levél	2020. 02. 23	Baranyajenő
L128 – L135, L145, L148, L149, L152	'Shrek'	szár	2020. 07. 01.	Felsőnána
L136 – L144, L146, L147, L150, L151, L153	Ismeretlen	szár	2020. 07. 02.	Jászboldogháza
L154 – L168	Ismeretlen	levél	2021. 01. 31.	Kiskunlacháza
L169 – L196	Ismeretlen	levél	2021. 04. 25.	Meződ
L197 – L199	Ismeretlen	levél	2021. 04. 25.	Palé
L200 – L207	Ismeretlen	levél	2021. 05. 05.	Gyirmót
L208 – L225	Ismeretlen	levél	2021. 05. 08.	Esztergom
L226 – L237	Ismeretlen	levél	2021. 05. 16.	Sántos
L238 – L252	Ismeretlen	levél	2021. 05. 17.	Gyomaendrőd
L253 – L264	Ismeretlen	levél	2021. 05. 11.	Püski
L265 – L273	Ismeretlen	levél	2021. 05. 30.	Igal
L274 – L280	Ismeretlen	levél	2021. 05. 30.	Tamási
L281 – L284	Ismeretlen	levél	2021. 05. 28.	Kiszombor
L285 – L308	'Umberto KWS'	szár	2021. 07. 12.	Gyékényes

3.2.2. Indítószekvenciák

A molekuláris vizsgálatok során elsősorban külföldi referált folyóiratokban publikált primereket használtunk, azonban az *rpb2* régió vizsgálatához saját primereket terveztünk. A primerek elhelyezkedésének ábrázolása a nemzetközi adatbázisból (NCBI, National Center for Biotechnology Information) származó *Plenodomus* izolátumok szekvenciái alapján készült (5. melléklet). A „multilocus”-os elemzéshez alkalmazott genomi régiók felszaporításához alkalmazott primereket a 3.2.2.4 – 3.2.2.8. pontokban részletezem.

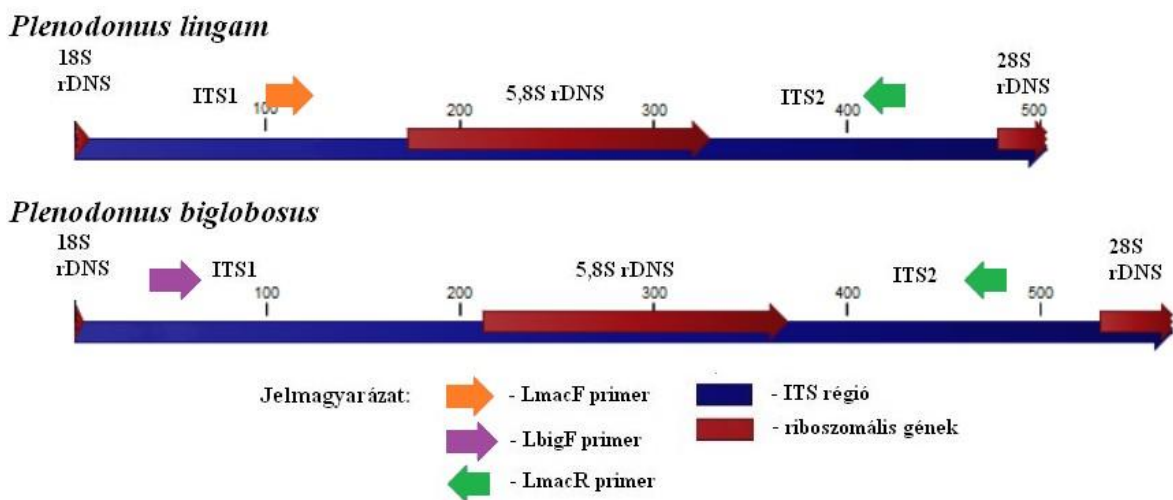
3.2.2.1. Fajszerintű azonosítás az ITS régió rövid szakasza alapján

Valamennyi izolált kórokozót azonosítottuk az ITS régió egy szakasza alapján, melyhez Liu és mtsai. (2006) által tervezett LmacF, LbigF, valamint LmacR specifikus primereket használtuk fel a multiplex PCR során. Az LmacF és az LbigF fajspecifikus szenz primerek, míg az LmacR a *P. lingam* 'brassicae' és a *P. biglobosus* 'brassicae' örökítőanyagához is kötődő antiszensz primer (2. ábra). Ezek a primerek a *P. lingam* és a *P. biglobosus* rDNS-ében lévő ITS1 régió egy részét, az 5,8S rDNS gént és az ITS2 régió egy részét amplifikálják. A *P. lingam* esetében a primerekkel együtt 331 bp, míg a *P. biglobosus* esetében 444 bp hosszúságú szakasz szaporodik fel. Vizsgálataink során ezt a szakaszt az izolátumok fajszerintű azonosítására használtuk fel.

LmacF: 5'-CTTGCCCAACCAATTGGATCCCCTA-3'

LbigF: 5'-ATCAGGGGATTGGTGTCAGCAGTTGA-3'

LmacR: 5'-GCAAATGTGCTGCGCTCCAGG-3'



2. ábra A *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* ITS régiójának egy része és az LmacF, LbigF, LmacR primerek elhelyezkedése

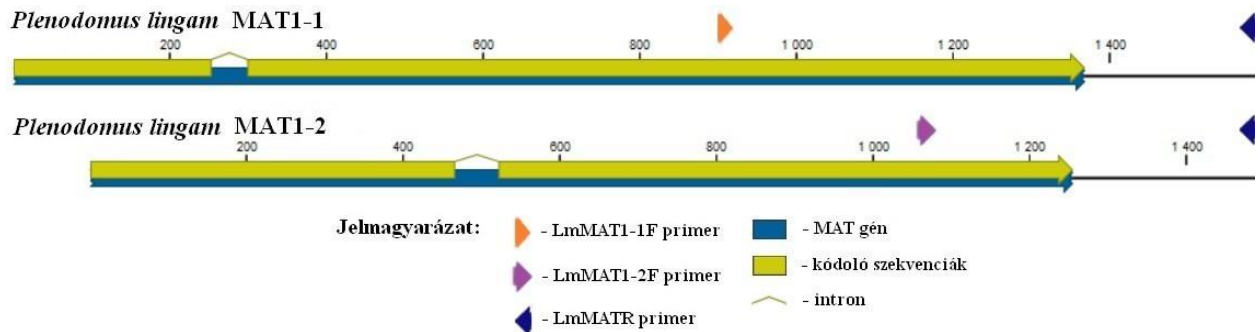
3.2.2.2. Párosodási típusok vizsgálata

A *P. lingam* párosodási típusait („mating types”) multiplex PCR-rel vizsgáltuk, melyhez az LmMAT1-1F, az LmMAT1-2F és az LmMATR primereket használtuk fel (Cozijnsen és Howlett, 2003). Az LmMAT1-1F és az LmMAT1-2F a *P. lingam* párosodási típusait tekintve specifikus szenz primerek, míg az LmMATR a *P. lingam* mindkét párosodási típusához kötődő antiszensz primer (3. ábra). MAT1-1 típus esetén a primerekkel együtt 686 bp, míg MAT1-2 típus esetén 445 bp hosszúságú ampikon keletkezik.

LmMAT1-1F: 5'-CTCGATGCAATGTACTTGG-3'

LmMAT1-2F: 5'-AGCCGGAGGTGAAGTTGAAGCCG-3'

LmMATR: 5'-TGGCGAATTAAGGGATTGCTG-3'



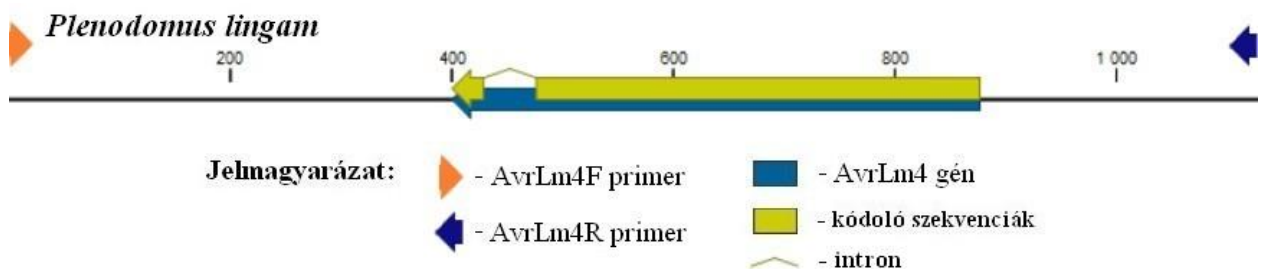
3. ábra A *Plenodomus lingam* mating type fehérjéjét kódoló szekvenciái a MAT1-1 és a MAT1-2 típus esetén, valamint az LmMAT1-1F, LmMAT1-2F, LMATR primerek elhelyezkedése

3.2.2.3. *AvrLm4* gén vizsgálata

Az *AvrLm4* gén vizsgálatához az *AvrLm4F* szensz és az *AvrLm4R* antiszensz primereket használtuk fel (4. ábra) (Van de Wouw és Howlett, 2012). A primerekkel együtt 1127 bp hosszúságú termék keletkezik a *P. lingam* esetében.

AvrLm4F: 5'-AGAAGGGTAAGGGGCAAGTC-3'

AvrLm4R: 5'-GAAGAACCCTGCTAGATAGGTAAGC-3'



4. ábra A *Plenodomus lingam* *AvrLm4* fehérjéjét kódoló szekvenciája és az *AvrLm4F*, *AvrLm4R* primerek elhelyezkedése

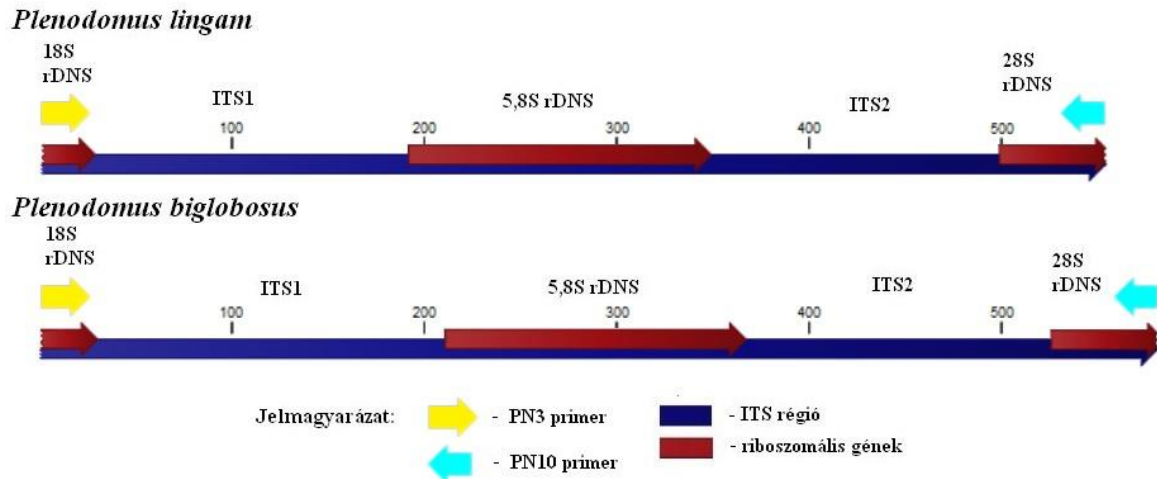
3.2.2.4. Az ITS régió teljes szakaszának vizsgálata

Az ITS régió teljes szakaszának vizsgálatához a PN3 – PN10 primerpárt alkalmaztuk (Mitrović és mtsai., 2016). Ezek a primerek a 18S rDNS gén egy részét, az ITS1 régiót, az 5,8S rDNS gént, az ITS2 régiót és a 28S rDNS gén egy részét sokszorozzák (5. ábra). A *P. lingam* esetében primerekkel együtt 554 bp, míg a *P. biglobosus* esetében 582 bp hosszúságú termék

keletkezik. A „multilocus”-os vizsgálathoz a felszaporított termékek nukleotid sorrendjének ITS1-5,8S-ITS2 szakaszát használtuk fel.

PN3: 5'-CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC-3'

PN10: 5'-TCCGCTTATTGATATGCTTAAG-3'



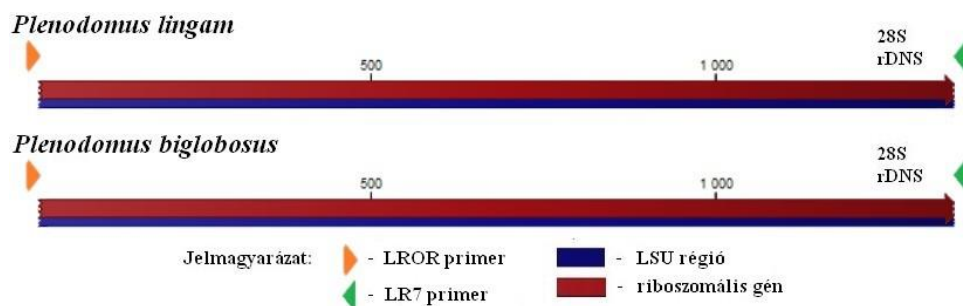
5. ábra A *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* 18S-28S régiójának egy része és a PN3, PN10 primerek elhelyezkedése

3.2.2.5. LSU régió vizsgálata

Az LSU régió vizsgálatához az LROR szensz és az LR7 antiszensz primereket alkalmaztuk (Vilgalys és Hester, 1990; Rehner és Samuels, 1994). Ezen primerek a 28S rDNS génhez kötődnek (6. ábra). A termék hossza a *P. lingam* esetében a primerekkel együtt 1364 bp, míg a *P. biglobosus* esetében 1363 bp hosszúságú (Chen és mtsai., 2015). Ezt a régiót a rokonsági viszonyok feltárása során vizsgáltuk.

LROR: 5'-GTACCCGCTGAACTTAAGC-3'

LR7: 5'-TACTACCACCAAGATCT-3'



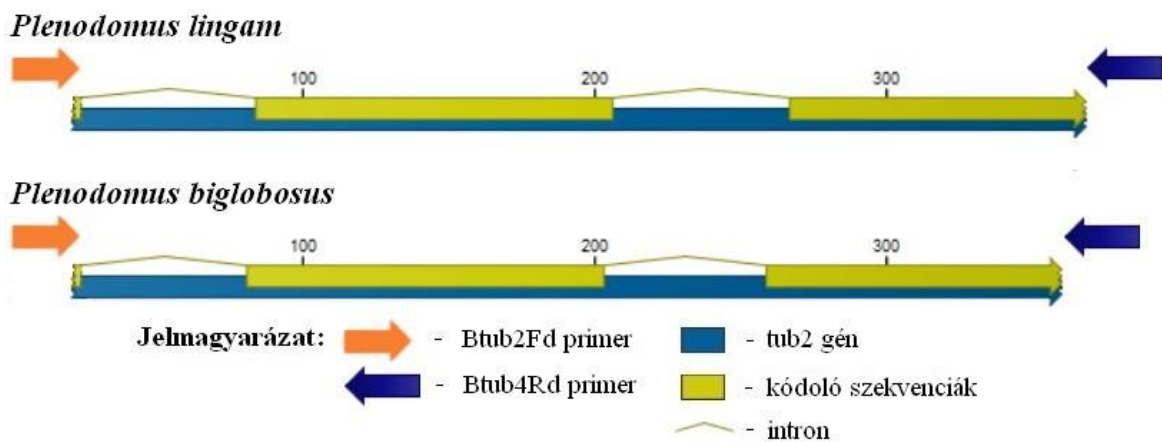
6. ábra A *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* LSU régiójának egy része és az LROR, LR7 primerek elhelyezkedése

3.2.2.6. *Tub2* gén vizsgálata

A *tub2* gén egy részének felszaporításához a Btub2Fd szensz és a Btub4Rd antiszensz primereket alkalmaztuk (7. ábra) (Woudenberg és mtsai., 2009). A felszaporított termék hossza a primerekkel együtt a *P. lingam* esetében 394 bp, míg a *P. biglobosus* esetében 386 bp hosszúságú (Chen és mtsai., 2015).

Btub2Fd: 5'-GTBCACCTYCARACCGGYCARTG-3'

Btub4Rd: 5'-CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC-3'



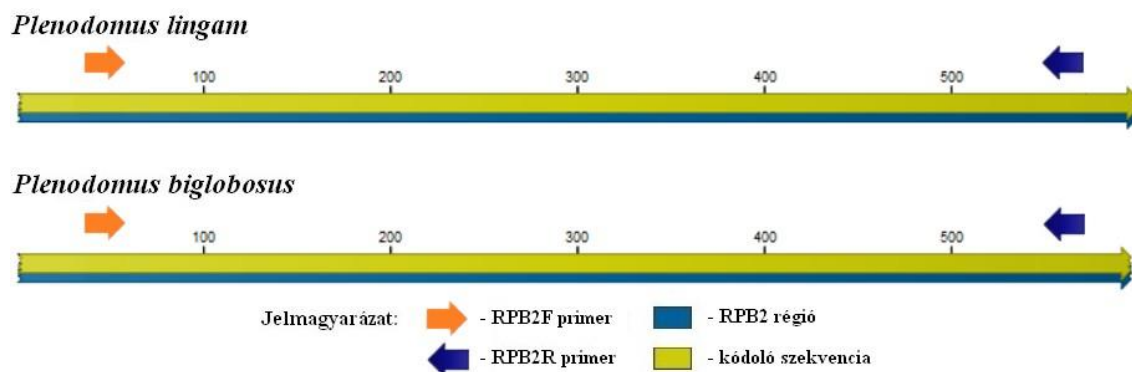
7. ábra A *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* β -tubulin-2 fehérjéjét kódoló szekvenciáinak egy része és a Btub2Fd, Btub4Rd primerek elhelyezkedése

3.2.2.7. *Rpb2* régió vizsgálata

Az *rpb2* régió egy szakaszának vizsgálatához a *P. lingam* *rpb2* régió (DQ470894; KT389669; KY064047; XM_003841144), valamint a *P. biglobosus* *rpb2* régió (KY064037; MT683512) szekvenciáinak felhasználásával az OligoAnalyzer 3.1 online szoftver (Integrated DNA Technologies Inc.) segítségével saját primereket terveztünk (RPB2F szensz és RPB2R antiszensz), melyeket a vizsgálat során felhasználtunk. A primerek az *rpb2* régióhoz kötődnek (8. ábra) és mindkét faj esetében a primerekkel együtt 535 bp hosszúságú szakasz amplifikálódik.

RPB2F: 5'-AGGCTTGTGGTTTGGTCAAGA-3'

RPB2R: 5'-ATCATAGCRGTCTCTTCCTCCT-3'



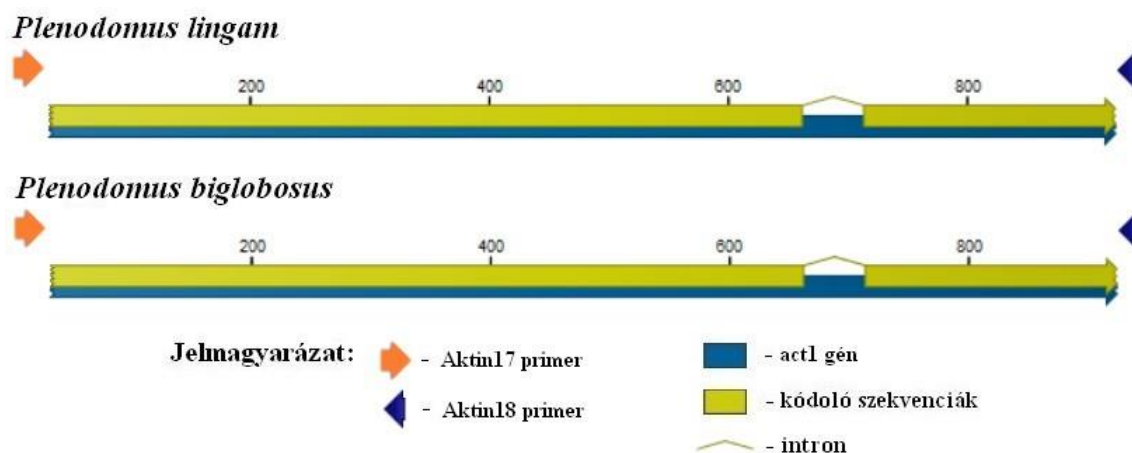
8. ábra A *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* rpb2 fehérjéjé kódoló szekvenciájának egy része és az RPB2F, RPB2R primerek elhelyezkedése

3.2.2.8. *Act1* gén vizsgálata

Az *act1* gén vizsgálatához az Aktin17 szensz és az Aktin18 antiszensz primereket alkalmaztuk (9. ábra) (Voigt és mtsai., 2005). Ezen primerek alkalmazásával a *P. lingam* és a *P. biglobosus* esetében is a primerekkel együtt 943 bp hosszúságú szakasz szaporodik fel.

Aktin17: 5'-TGGGACGATATGGANAANATCTGGCA-3'

Aktin18: 5'-TTAGAAGCACTTNCGGTG-3'



9. ábra A *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* aktin fehérjéjé kódoló szekvenciájának egy része és az Aktin17, Aktin18 primerek elhelyezkedése

3.2.3. Táptalaj, vegyszerek, enzim, kit

A kórokozókat burgonya-dextróz agar (PDA, Biolab, Magyarország) táptalajon izoláltuk és tartottuk fenn. Az össznukleinsav-kivonáshoz cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB, Duchefa Biochemie, Hollandia) tartalmú puffert, a tisztításhoz izoamil-alkohol tartalmú kloroformot (1:24), a nukleinsav extrakciójához 2-propanolt, a PCR reakciókhoz Dream Taq Green PCR Master Mix 2x-t (Thermo Scientific, Litvánia) használtunk. A gélelektroforézishez a

termékek várható hossza alapján GeneRuler 1 kb plus és GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific, Litvánia) markereket választottunk. A szekvenciák meghatározása előtt a PCR-termékeket High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche, Németország) tisztítottuk.

3.2.4. Fungicid hatóanyagok

Az izolátumok fungicid érzékenységének vizsgálatára öt általánosan alkalmazott hatóanyagot választottunk ki, melyeket a Merck Kft.-től, tiszta hatóanyag formájában szereztünk be. Az SDHI fungicidek közül a boszkalidra és a fluopiramra, a QoI fungicidek közül az azoxistrobinra és a piraklostrobinra, a DMI fungicidek közül pedig a tebukonazolra esett a választásunk. A hatóanyagok közül mindegyik jelenleg is használatos őszi káposztarepce kultúrában (Internet5). A PubChem adatbázis alapján ezen hatóanyagok vízben nem, vagy csupán nagyon gyengén oldódnak (Internet6), emiatt az adatbázis alapján a hatóanyagtól függően izopropanolt (a boszkalid, a piraklostrobin és a tebukonazol esetében), vagy metanolt (a fluopiram és az azoxistrobin esetében) használtunk oldószerként.

3.2.5. Eszközök

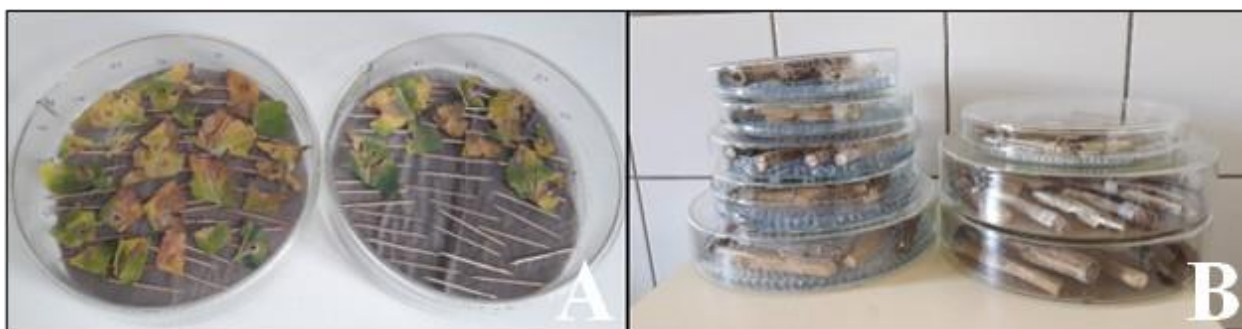
A vizsgálatainkhoz az általános laboratóriumi üveg- és fémeszközökön kívül 85 mm átmérőjű, steril műanyag Petri-csészéket használtunk. Thermo Scientific MSC 1.2 lamináris fülkében végeztük el a kórokozók izolálását és a tenyészetek létrehozását. Az izolátumokat Sanyo MLR-351 fitotronban, 24 °C-on tároltuk. A növényi részek vizsgálatához Leica MZ6 sztereomikroszkópot, a konídiumok vizsgálatához pedig Nikon Eclipse 50i citoplaszt mikroszkópot használtuk. QImaging MicroPublisher 5.0 RTV kamerával készítettük a mikroszkópos felvételeket. A PCR-eket GeneAmp PCR System 9700 típusú PCR készülékben (Applied Biosystems) végeztük el.

3.3. A vizsgálat módszere

3.3.1. A növényi részek gyűjtése és tárolása

A tüneteket mutató leveleket és szárazakat feliratozott papírzacskókba gyűjtöttük és még aznap az egyetem laboratóriumába szállítottuk.

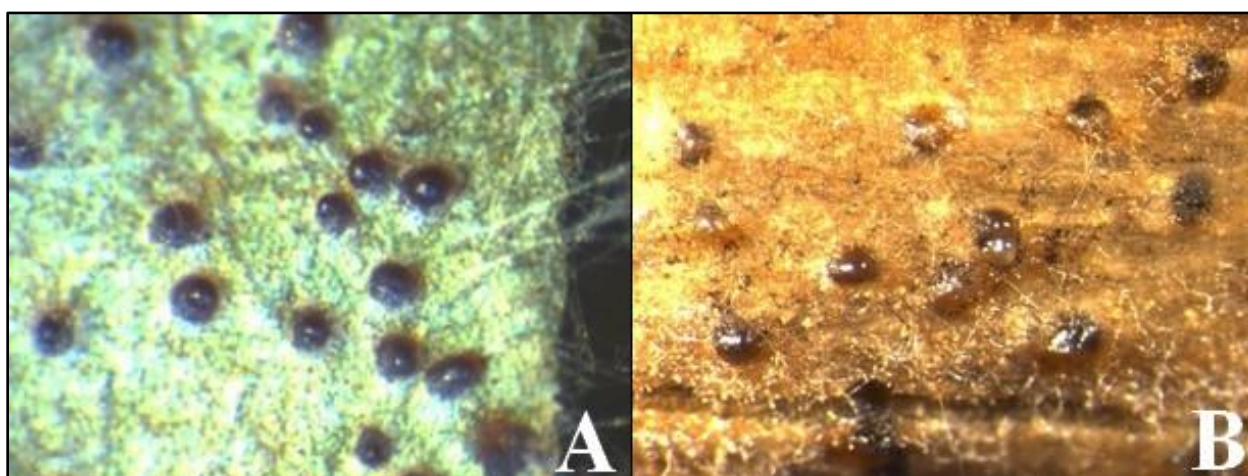
Helytakarékoság miatt a továbbiakban kizárólag azokkal a levél-, és szárdarabokkal dolgoztunk, amelyeken a plenodómuszos betegség ivartalan termőteste, piknídiumok képződtek. A felhasznált növényi részeket a konídiumok előtörésének céljából maximum 3 napig nedves kamrában, természetes megvilágítás mellett, szobahőmérsékleten inkubáltuk (10. ábra).



10. ábra Fertőzött repcelevelek (A) és szárak (B) inkubálása nedves kamrában (Fotók: Bagi)

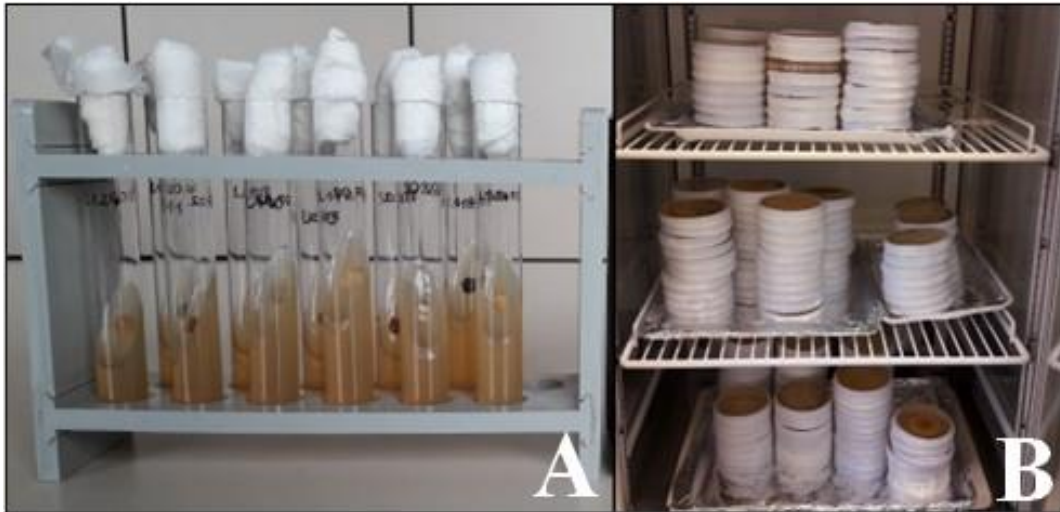
3.3.2. A kórokozók izolálása táptalajon, a tenyészetek fenntartása

A nedves kamrákban elhelyezett levél-, (11/A ábra) és szárdarabokon (11/B ábra) lévő piknídiumokból sok esetben piknokonídiumok tömege tört elő. Ezeket Goh (1999) módszerét használva láng felett kihúzott üvegkapillárisal sztereomikroszkóp alatt leemeltük, majd steril vízbe helyeztük. Ha az inkubáció során nem jelent meg konídiummassza a piknídiumok szájnnyílásánál, akkor a piknídiumokat a levél szövetéből kiemeltük, steril vízbe helyeztük, óvatosan ronsoltuk. A konídiumszuszpenziót minden esetben vortexeltük, majd lamináris fülke alatt PDA táptalajon szélesztettük. A Petri-csészéket 24 ± 1 °C-on, sötétben inkubáltuk, majd a nyers tenyészetekből 3 nap után a csírázó konídiumok hifacsúcsának átoltásával tiszta tenyészeteket hoztunk létre.



11. ábra Tömeges piknídiumképződés és sporuláció repcelevélen (A) (Fotó: Jáki) és száron (B) (Fotó: Bagi)

Az izolátumokat hosszabb távon kémcsövekben, ferde agaron (12/A ábra), valamint agarlemezekken (12/B ábra) tartottuk fenn.



12. ábra Az izolátumok fenntartása ferde agaron (A) és agarlemezeken (B) (Fotók: Bagi)

3.3.3. Morfológiai és tenyészbélyegek jellemzése és értékelése

A két kórokozó piknidiumai morfológiai bélyegeik alapján rendkívül hasonlóak (Shoemaker és Brun, 2001; Ghanbarnia és mtsai., 2011), szabad szemmel nem különíthetők el, emiatt először sztereo-, majd citoplaszt mikroszkóp alatt vizsgáltuk őket. A konídiumokat méretükből adódóan kizárólag citoplaszt mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A piknidiumból előtört konídiummasszát steril üvegapilláris segítségével leemeltük, majd a citoplaszt mikroszkópos megfigyeléshez tárgylemezre helyeztük. A konídiumok vizsgálatával egyidejűleg a későbbi molekuláris vizsgálatokhoz, valamint az izolátumok fajszerű azonosításához konídiumszuszpenziót is készítettünk. Ezen esetekben a vizsgált konídiumok és a konídiumszuszpenzió ugyanabból a levélfoltból származott. A konídiumok tulajdonságainak értékelése az izolátumok molekuláris módszerrel történő fajszerű azonosítása után történt, mert a konídiumok szemmel látható tulajdonságai alapján a két kórokozó nem különíthető el egymástól. A random módon kiválasztott izolátumok esetében (L7, L17, L18, L26, L34, L39, L43) mintánként 50-50 konídium szélességét és hosszúságát μm pontossággal mértük le, valamint a konídiumok alakját és színét is megvizsgáltuk.

Az izolátumok tenyészbélyegeinek vizsgálata során megfigyeltük a tenyészetek alakját, színét, szélét, mintázottságát, a piknidiumok képződését, a színanyag termelődését, valamint a képződött légmicélium mennyiségét. Azon izolátumok esetében, amelyeknél a konídiumok méretét lemértük (L7, L17, L18, L26, L34, L39, L43), feljegyeztük a tenyészetek átmérőjének napi átlagos növekedését ($\text{mm} / 24 \text{ h}$) is. A tenyészetek tulajdonságait a leoltást követő 28. napon figyeltük meg. Az izolátumokat $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, sötétben tároltuk.

3.3.4. Patogenitási teszt

Az izolátumok megbetegítőképességének igazolására a Koch-posztulátumok alapján patogenitási tesztet végeztünk. A vizsgálathoz csávázatlan vetőmagból neveltünk növényeket (13. ábra). Egyes esetekben a mesterséges fertőzéshez a növényekről eltávolított leveleket használtuk fel, melyeket a főér színi oldalán fertőztünk meg, míg más esetekben a 3-5 leveles cserepes repce növényeket használtuk fel, amelyeket azok szárán fertőztünk meg. A kórokozók tenyészetekben a vizsgálati időszak alatt nem sporuláltak, így a konídiumok hiánya miatt tiszta tenyészetekből származó micéliummal inokuláltuk a növényi részeket, melyeken előzőleg steril lándzsátúvel sebést ejtettünk. Az inokulált leveleket nedves kamrákba steril üveggolyókra helyeztük, a nedves kamrák aljára a $95 \pm 3\%$ -os relatív páratartalom biztosítása érdekében steril desztillált vizet töltöttünk. A levélgyeleteket vízzel megtöltött mikrocentrifuga csövekbe helyeztük, hogy a levelek elhervadását késleltessük. A cserepes növények szárainak fertőzése esetén az inokulációs pontot parafilmmel lefedtük. A kontroll növények szárait és a kontroll leveleket steril PDA korongokkal inokuláltuk. A fertőzött növényeket és a fertőzött leveleket tartalmazó nedves kamrákat a tünetek megjelenéséig szobahőmérsékleten 24 ± 2 °C-on, természetes megvilágítás mellett inkubáltuk. A patogenitási teszt eredményét 10 nap elteltével értékeltük, majd a Koch-posztulátumokat követve a tüneteket mutató növényi szövetekből PDA táptalajon visszaizoláltuk a kórokozókat és ezáltal bizonyítottuk azok megbetegítőképességét.



13. ábra Repce növények nevelése az üvegházban (Fotó: Kecskeméti)

3.3.5. Az izolátumok molekuláris vizsgálatai

3.3.5.1. Örökítőanyag kivonása CTAB módszerrel

Az össznukleinsav kinyeréséhez 15-20 napos tiszta tenyészeteket használtunk. Lamináris fülke alatt a gomba micéliumának kb. 1 cm^2 területű részét leemeltük a táptalaj felületéről és steril

dörzsmozsárban kvarchomokkal homogenáltuk. Ezután Maniatis és mtsai. (1983) módszerét követve 800 µl CTAB puffer (2% CTAB; 1,4 mol (M) nátrium-klorid (NaCl); 20 millimol (mM) etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA); 100 mM Tris-HCl pH: 8; 0,2% 2-merkaptó-etanol (2-ME)) hozzáadása után tovább dörzsöltük. Ezután az elegyet mikrocentrifuga csövekbe töltöttük és 30 percen keresztül 65 °C-on inkubáltuk. A nukleinsav kitisztítása céljából kétszer izoamil-alkoholos kloroformot (1:24) adtunk hozzá, jól összeráztuk, majd 10 percen keresztül centrifugáltuk. A felső fázist tiszta mikrocentrifuga csöbe átpipettáztuk, majd hozzáadtunk 600 µl izopropanolt, ezzel extraháltuk a nukleinsavakat. Ezután szintén centrifugálás következett, leöntöttük a felülúszót, a pelletet pedig 70%-os etanollal mostuk. A pelletet kb. 10-15 percig vákuumkoncentrátorban száradni hagytuk. Ezután 40 µl 10 µg/ml RNase-t tartalmazó TE-oldatba oldottuk vissza. A nukleinsavakat -20 °C-on tároltuk.

3.3.5.2. PCR vizsgálat

A vizsgálatok során 50 µl végtérfogatra mértünk össze 4 µl DNS-t, primerenként 2 µl-t (20 pmol/µl), 20 µl Dream Taq Green PCR Master Mix 2x-t (Thermo Scientific, Litvánia) steril desztillált vízzel kiegészítve, a gyártó előírása szerint. A különböző régiók felszaporításához alkalmazott PCR-ek körülményeit a 3. táblázat foglalja össze. A PCR-termékekből 1%-os agaróz gélen 5 µl-t 1x-es TBE puffer felhasználásával futtattunk meg. Az agaróz gél Eco Safe Nucleic Acid Straining Solution festéket (Thermo Scientific, Litvánia) tartalmazott. A PCR-termékeket UV fényvel tettük láthatóvá, majd lefényképeztük őket.

3. táblázat A PCR-ek paraméterei a vizsgált szakaszok szerint

Vizsgált szakasz	Elődenaturáció	Ciklusok száma	PCR ciklus			Végső elongáció
			Denaturáció	Anelláció	Elongáció	
ITS régiók egyes részei + 5,8S rDNS gén (Liu és mtsai., 2006)	95 °C 3 perc	30	95 °C 15 mp	70 °C 30 mp	72 °C 60 mp	72 °C 10 perc
MAT gén fragmentuma (Cozijnsen és Howlett, 2003)	94 °C 2 perc	35	94 °C 30 mp	60 °C 30 mp	72 °C 60 mp	72 °C 10 perc

<i>AvrLm4</i> gén (Van de Wouw és Howlett, 2012)	95 °C 3 perc	35	95 °C 30 mp	59 °C 30 mp	72 °C 40 mp	72 °C 10 perc
18S – 28S régió (Mitrović és mtsai., 2016)	94 °C 2 perc	37	94 °C 30 mp	58 °C 30 mp	72 °C 60 mp	72 °C 10 perc
LSU régió (Chen és mtsai., 2015)	95 °C 5 perc	35	95 °C 45 mp	48 °C 45 mp	72 °C 2 perc	72°C 10 perc
<i>tub2</i> gén fragmentuma (Chen és mtsai., 2015)	95 °C 5 perc	35	95 °C 30 mp	52 °C 30 mp	72 °C 80 mp	72 °C 10 perc
<i>rpb2</i> régió egy szakasza	95 °C 3 perc	35	95 °C 30 mp	58 °C 30 mp	72 °C 45 mp	72 °C 10 perc
<i>act1</i> gén egy szakasza (Voigt és mtsai., 2005)	95 °C 5 perc	30	95 °C 30 mp	52 °C 60 mp	72 °C 60 mp	72 °C 5 perc

3.3.5.3. A PCR-termékek nukleotid szekvenciájának meghatározása és analízise

A gélelektroforézist követően a PCR-termékeket a High Pure PCR Product Purification Kittel (Roche) a gyártó utasításait követve tisztítottuk meg. A tisztított termékek koncentrációját a NanoDrop One/One C Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific) spektrofotométerrel ellenőriztük. A kórokozók összehasonlító vizsgálatához felhasznált izolátumok esetén (L7, L17, L18, L26, L34, L39, L43) az *LmacF*, *LbigF*, *LmacR* primerekkel a fragmentumokat mindkét irányból szekvenáltattuk. A párosodási típus vizsgálatakor keletkezett termékeket a PCR-hez használt indítoszekvenciákkal szintén mindkét irányból szekvenáltattuk. A „multilocus”-os törzsfák elkészítéséhez a 18S-28S fragmentumot a PN10 primer felhasználásával antiszensz irányból, míg az LSU régió, *tub2* gén és az *rpb2* régió fragmentumait mindkét irányból a PCR-hez felhasznált primerekkel szekvenáltattuk. Az *act1* gén vizsgálata során is a PCR-hez felhasznált primerekkel

mindkét irányból történt szekvenáltatás. A szekvenciák meghatározását a BaseClear B.V. (Leiden, Hollandia) cég egy ABI Prism automatikus szekvenátorral végezte el. A szekvenciák ellenőrzésére, esetleges szerkesztésére és a nemzetközi adatbázisból származó szekvenciákkal való összehasonlítására az NCBI adatbázis Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programcsomagját használtuk fel (Altschul és mtsai., 1990). A szekvenciákat a CLC Sequence Viewer Viewer 8 (CLC Bio) program segítségével szerkesztettük, szükség esetén a kromatogramok alapján javítottuk őket, majd összehasonlítottuk más országokból származó izolátumok szekvenciáival.

3.3.5.4. A filogenetikai törzsfák elkészítése és analízise

A részletes filogenetikai analízishez 26 hazai *P. lingam* és 17 hazai *P. biglobosus* izolátumot használtunk fel (4. táblázat). A kapott nukleotid szekvenciák az NCBI adatbázisba feltöltésre kerültek.

4. táblázat A filogenetikai analízis során felhasznált saját izolátumainkhoz tartozó génszakaszok szekvenciáinak génbanki azonosító kódjai

Izolátum	Génbanki azonosító				
	teljes ITS1-5,8S-ITS2 régió	LSU régió egy szakasza	<i>tub2</i> gén egy szakasza	<i>rpb2</i> régió egy szakasza	<i>act1</i> gén egy szakasza
L7	OM098459	OM102999	OM291849	OM273759	OM273802
L11	OM098460	OM103000	OM291850	OM273760	OM273803
L26	OM098461	OM103001	OM291851	OM273761	OM273804
L30	OM098462	OM103002	OM291852	OM273762	OM273805
L34	OM098463	OM103003	OM291853	OM273763	OM273806
L37	OM098464	OM103004	OM273742	OM291875	OM273785
L40	OM098465	OM103005	OM291854	OM273764	OM273807
L55	OM098466	OM103006	OM273743	OM291876	OM273786
L59	OM098467	OM103007	OM273744	OM291877	OM273787
L61	OM098468	OM103008	OM291855	OM273765	OM273808
L63	OM098469	OM103009	OM291856	OM273766	OM273809
L71	OM098470	OM103010	OM273745	OM291878	OM273788
L74	OM098471	OM103011	OM273746	OM291879	OM273789
L105	OM098472	OM103012	OM273747	OM291880	OM273790

L108	OM098473	OM103013	OM291857	OM273767	OM273810
L110	OM098474	OM103014	OM291858	OM273768	OM273811
L112	OM098475	OM103015	OM273748	OM291881	OM273791
L128	OM098476	OM103016	OM273749	OM291882	OM273792
L131	OM098477	OM103017	OM291859	OM273769	OM273812
L144	OM098478	OM103018	OM273750	OM291883	OM273793
L150	OM098479	OM103019	OM273751	OM291884	OM273794
L155	OM098480	OM103020	OM273752	OM291885	OM273795
L166	OM098481	OM103021	OM291860	OM273770	OM273813
L174	OM098482	OM103022	OM273753	OM291886	OM273796
L183	OM098483	OM103023	OM291861	OM273771	OM273814
L197	OM098484	OM103024	OM291862	OM273772	OM273815
L198	OM098485	OM103025	OM291863	OM273773	OM273816
L201	OM098486	OM103026	OM291864	OM273774	OM273817
L206	OM098487	OM103027	OM273754	OM291887	OM273797
L214	OM098488	OM103028	OM291865	OM273775	OM273818
L217	OM098489	OM103029	OM291866	OM273776	OM273819
L228	OM098490	OM103030	OM291867	OM273777	OM273820
L233	OM098491	OM103031	OM291868	OM273778	OM273821
L238	OM098492	OM103032	OM291869	OM273779	OM273822
L245	OM098493	OM103033	OM291870	OM273780	OM273823
L257	OM098494	OM103034	OM273755	OM291888	OM273798
L258	OM098495	OM103035	OM291871	OM273781	OM273824
L265	OM098496	OM103036	OM291872	OM273782	OM273825
L277	OM098497	OM103037	OM291873	OM273783	OM273826
L281	OM098498	OM103038	OM273756	OM291889	OM273799
L283	OM098499	OM103039	OM291874	OM273784	OM273827
L294	OM098500	OM103040	OM273757	OM291890	OM273800
L306	OM098501	OM103041	OM273758	OM291891	OM273801

A szekvenciák analiziséhez és a filogenetikai kapcsolatok vizsgálatához a MEGA11 programcsomagot választottuk (Tamura és mtsai., 2021). A törzsfákat a Neighbor-Joining és a Maximum Composite Likelihood (MCL) becslésekkel készítettük. A törzsfák méretarányosan készültek, az ágak hosszát a szubsztitúciók száma jelöli. Minden elemzés esetén a törzsfá

megbízhatóságát 1000×-es ismétlésben bootstrap módszerrel ellenőriztük. Csoporton kívülként az *act1* génszakasz alapján készült törzsfá kivételével minden esetben a *Leptosphaeria doliolum* CBS 505.75 izolátumot választottuk, a törzsfákat ettől az izolátumtól ágaztattuk el. Ezen izolátum esetén nem állt rendelkezésünkre az *act1* gén vizsgált szakaszának szekvenciája, így ehhez a filogenetikai analízishez a *Leptosphaeria lindquistii* AY748979 izolátumát használtuk fel csoporton kívülként.

Az izolátumaink szubkládjának meghatározásához Mendes-Pereira és mtsai. (2003) vizsgálatához hasonlóan az ITS régiókat és az 5,8S rDNS gént használtuk fel. Ezeket a *P. lingam* CBS 275.63 vonalának (JF740234), a *P. biglobosus* 'brassicae' UBIP01000001 genomjának, a *P. lingam* 'brassicae' (AJ550885, AJ550887), *P. lingam* 'lepidii' (AJ550890), a *P. biglobosus* 'thlaspi' (AJ550891), a *P. biglobosus* 'australensis' (AJ550867), a *P. biglobosus* 'occiaustralensis' (AM410082), a *P. biglobosus* 'americensis' (MG321243) és a *P. biglobosus* 'brassicae' (DQ133890) ugyanazon szakaszának szekvenciájával hasonlítottuk össze.

A „multilocus”-os analízishez a *P. lingam* 'brassicae' esetében a CBS 275.63, a *P. biglobosus* 'brassicae' esetében az UBIP01000001 izolátumot használtuk fel, mert egyedül ezen izolátumok esetében publikálták a szekvencia adatokat az összes általunk vizsgált régióból.

3.3.6. A fungicid hatóanyagok tesztelése a kórokozók micéliumának növekedésére

A hatóanyagok tesztelésére sorozathígításos, mérgezett agarlemezes módszert alkalmaztunk (14. ábra). Ez a módszer alkalmas a hatóanyagok micéliumnövekedésre gyakorolt hatásának vizsgálatára, valamint az esetleges hatékonyságcsökkenés kialakulásának megállapítására. A boszkalid, a fluopiram, az azoxistrobin, a piraklostrobin és a tebukonazol hatását 2, 10, 20 és 30 mg/L-es koncentrációban (5. táblázat), négy ismétlésben, 5 izolátum (L279, L280, L291, L295, L308) esetében vizsgáltuk.

A gyártó utasításait követve PDA (Biolab Magyarország) táptalajt készítettünk. 39 g PDA-hoz 1 liter desztillált vizet töltöttünk, majd autoklávban 121 °C-on 30 percig sterilizáltuk.

Ezután a PDA táptalajhoz hatóanyagoként törzsolatot készítettünk. A hatóanyagokat 0,0001 g pontosságú precíziós mérlegen mikrocentrifuga csövekbe mértük ki, majd a feloldáshoz szükséges oldószer mennyiségét pipettával adtuk hozzá. 250 ml steril, meleg folyékony halmazállapotú PDA táptalajjal hatóanyagoként négy Erlenmeyer lombikot töltöttünk fel (14/A ábra), majd kézmeleg állapotában a hatóanyagot tartalmazó törzsolatot 2, 10, 20 és 30 mg/L-es koncentrációban hozzámértük (14/B, C ábra). A mérgezett táptalajt 85 mm átmérőjű műanyag Petri-csészékbe öntöttük (20 ml / Petri-csésze) (14/D ábra), a mérgezett agarlemezek közepére 16-18 napos tiszta tenyészetekből 5 mm átmérőjű micéliumkorongokat helyeztünk.



14. ábra Méregzett agarlemezek készítése: táptalaj kimérése lombikokba (A), törzsoldat hozzáadagolása (B, C), táptalaj kiöntése Petri-csészékbe (D) (Fotók: Petróczy)

5. táblázat A hatóanyagok feloldódása oldószerben, a vizsgált elegyek koncentrációi, valamint az adott koncentrációhoz szükséges törzsoldat összetevői

Hatóanyag	Hatóanyag oldódása oldószerben (g/L)	Vizsgált elegy koncentrációja (mg/L)	Törzsoldat	
			Hatóanyag mennyisége (mg)	Oldószer mennyisége (μL)
boszkalid	10 g boszkalid / 1 liter izopropanol (Internet7)	2 mg / 1 liter PDA	2 mg	200 μl
		10 mg / 1 liter PDA	10 mg	1000 μl
		20 mg / 1 liter PDA	20 mg	2000 μl
		30 mg / 1 liter PDA	30 mg	3000 μl
fluopiram	250 g fluopiram / 1 liter metanol (Internet8)	2 mg / 1 liter PDA	2 mg	8 μl
		10 mg / 1 liter PDA	10 mg	40 μl
		20 mg / 1 liter PDA	20 mg	80 μl
		30 mg / 1 liter PDA	30 mg	120 μl
azoxistrobin	20 g azoxistrobin / 1 liter metanol (Internet9)	2 mg / 1 liter PDA	2 mg	100 μl
		10 mg / 1 liter PDA	10 mg	500 μl
		20 mg / 1 liter PDA	20 mg	1000 μl

		30 mg / 1 liter PDA	30 mg	1500 µl
piraklostrobin	30 g piraklostrobin / 1 liter izopropanol (Internet10)	2 mg / 1 liter PDA	2 mg	66,67 µl
		10 mg / 1 liter PDA	10 mg	333,33 µl
		20 mg / 1 liter PDA	20 mg	666,67 µl
		30 mg / 1 liter PDA	30 mg	1000 µl
tebukonazol	100 g tebukonazol / 1 liter izopropanol (Internet11)	2 mg / 1 liter PDA	2 mg	20 µl
		10 mg / 1 liter PDA	10 mg	100 µl
		20 mg / 1 liter PDA	20 mg	200 µl
		30 mg / 1 liter PDA	30 mg	300 µl

A hatóanyagok gátló hatását kétféle kontrollhoz hasonlítottuk. Az oldószert és a hatóanyagot nem tartalmazó kontroll mellett, annak kizárására, hogy az alkalmazott oldószerek befolyásolják a kórokozók növekedését, elkészítettük az oldószert tartalmazó kontrollt is. A Petri-csészéket feliratoztuk, parafilmmel lezártuk, majd 24 ± 1 °C-on, termosztátban inkubáltuk.

A tenyészetek növekedését a leoltás utáni 10. napig kísértük figyelemmel. A tenyészetek átmérőjét a 3., 7. és 10. napon vonalzóval mértük meg mm pontossággal, mérésenként kétszer, egymásra merőlegesen. A továbbiakban a két érték átlagával dolgoztunk. A tenyészetek változását fényképekkel dokumentáltuk, majd a kapott adatokat Microsoft Excel programmal értékeltük és ábráztuk.

3.3.7. A vizsgálatok során alkalmazott statisztikai módszerek

Statisztikai kiértékelést a konídiumok méreténél, valamint a hatóanyagok *in vitro* vizsgálatnál alkalmaztunk. Vizsgálataink során az összehasonlításokhoz Microsoft Excel és IBM SPSS 10 statisztikai programot alkalmaztunk.

A konídiumok méreteinél két kvantitatív tulajdonság figyelembevétele alapján (hosszúság és szélesség) kívántuk kimutatni az izolátumok közötti különbségeket. Az összehasonlításra egytényezős, többváltozós varianciaanalízist (MANOVA, Multivariate analysis of variance modellt) alkalmaztunk.

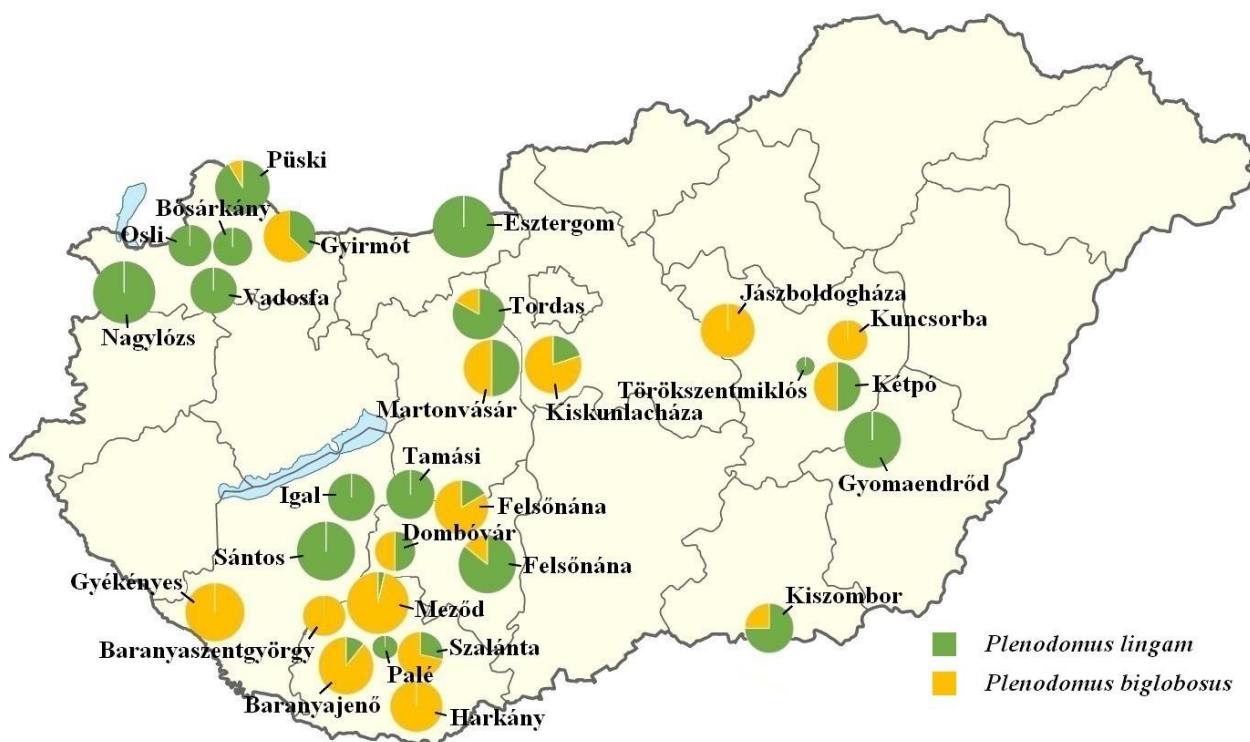
4. EREDMÉNYEK

4.1 A *Plenodomus*-fajok előfordulása őszi káposztarepcén

Az izolált kórokozók fajszintű meghatározását – a morfológiai vizsgálatokat követően, molekuláris biológiai alapon – elvégezve megállapítottuk, hogy a 308 izolátum közül 158 db (51,3%) a *P. lingam*-hoz, 150 db (48,7%) a *P. biglobosus*-hoz tartozott. Az izolátumok fajszintű azonosításának eredményét a 4. mellékletben szemléltetem.

4.1.1. A kórokozók elterjedtsége

A vizsgált 29 mintavételi helyszín közül 24 helyszínről izoláltuk a *P. lingam*, míg 18 helyszínről a *P. biglobosus* kórokozót legalább egy esetben (6. melléklet). Az egyes mintavételi helyszíneken a kórokozókat különböző arányokban izoláltuk (15. ábra).

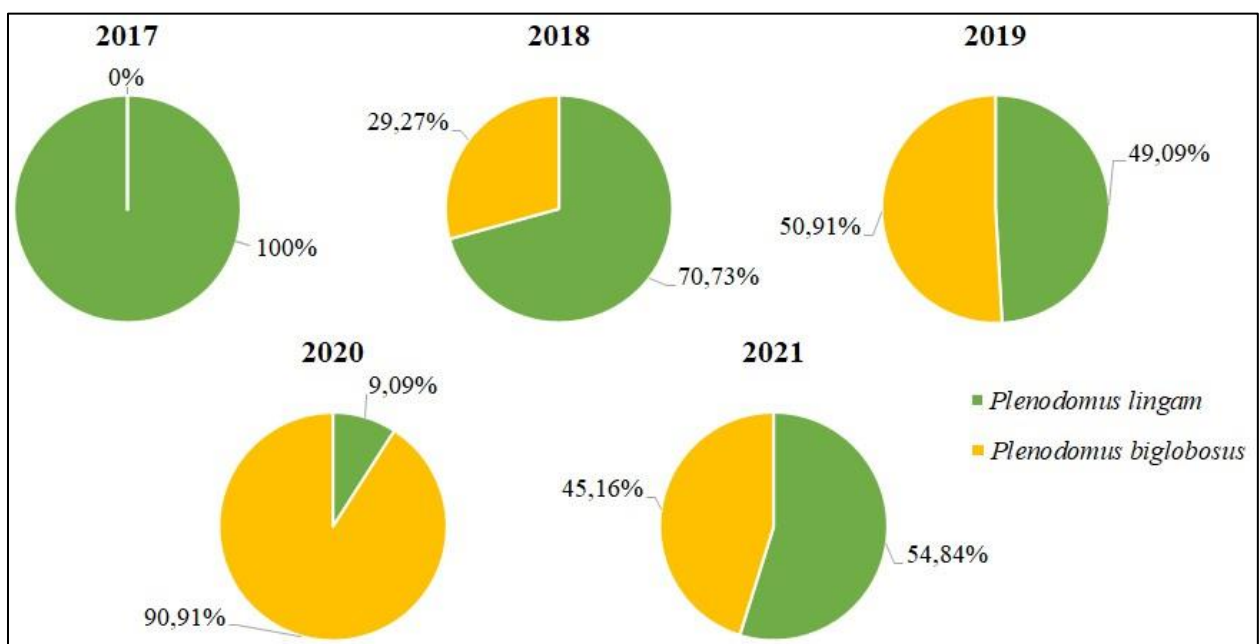


15. ábra A *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* izolátumok súlyozott aránya mintavételi pontonként

Az izolátumokat gyűjtési idő és adott évi származási helyszínek száma szerint a 6. táblázatban foglaltam össze. 2017-ben kizárólag *P. lingam* kórokozót izoláltunk (13 db), míg 2020-ban az izolátumok több, mint 90%-a (40 db) a *P. biglobosus* fajhoz tartozott (16. ábra).

6. táblázat A 2017 és 2021 közötti gyűjtési helyszínek és az adott fajhoz tartozó izolátumok darabszáma

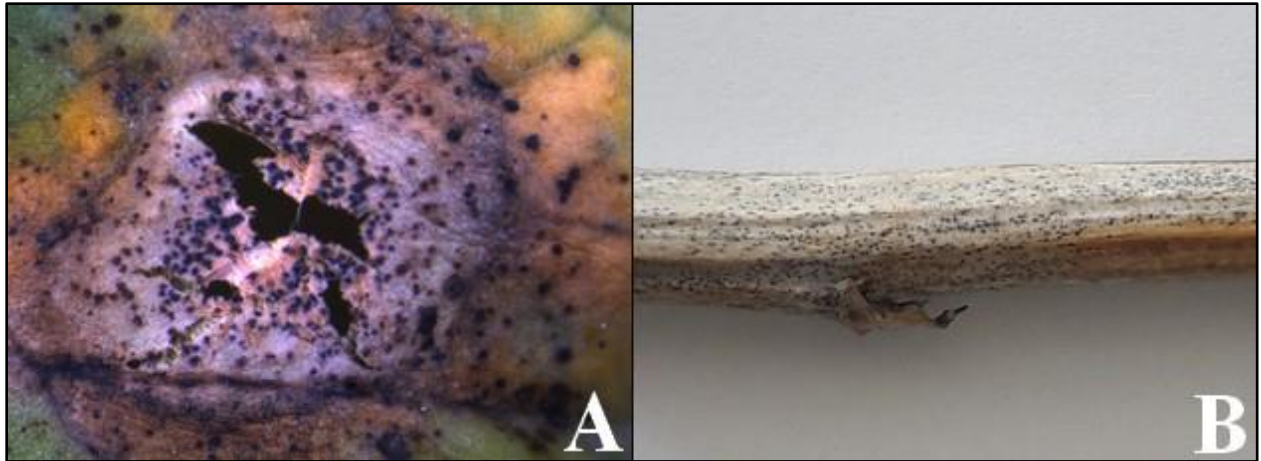
Gyűjtés éve	Gyűjtési helyszínek (db)	<i>Plenodomus lingam</i> (db)	<i>Plenodomus biglobosus</i> (db)
2017	1	13	0
2018	6	29	12
2019	7	27	28
2020	3	4	40
2021	12	85	70



16. ábra A *Plenodomus* izolátumok faji megoszlása 2017 és 2021 között

4.2. *Plenodomus*-fajok okozta tünetek őszi káposztarepcén

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* által okozott levéltünetek sötét szegéllyel körülölelt, több milliméteres, kerekded foltok, melyek közepén kivilágosodnak és gyakran kitöredeznek (17/A ábra). A száron barna, nekrotikus, később kifehéredő foltok jelennek meg (17/B ábra). A *P. lingam* főként a szár alapi részénél, a *P. biglobosus* a felsőbb régióban okoz elhaló foltokat (17/B ábra). A két faj által okozott tünetek rendkívül hasonlóak, emiatt a levél-, és szártüneteik alapján szemrevételezéssel nem különíthetők el egymástól. Mind a levélen és a száron található nekrotizálódó foltokban tömegesen jelennek meg a piknídiumok (17/A és 17/B ábra). A meleg és a magas páratartalom hatására a *Plenodomus*-fajok piknídiumaiból konídiummassza áramlik ki, melynek színe a világosbarnától a bordóig változhat.

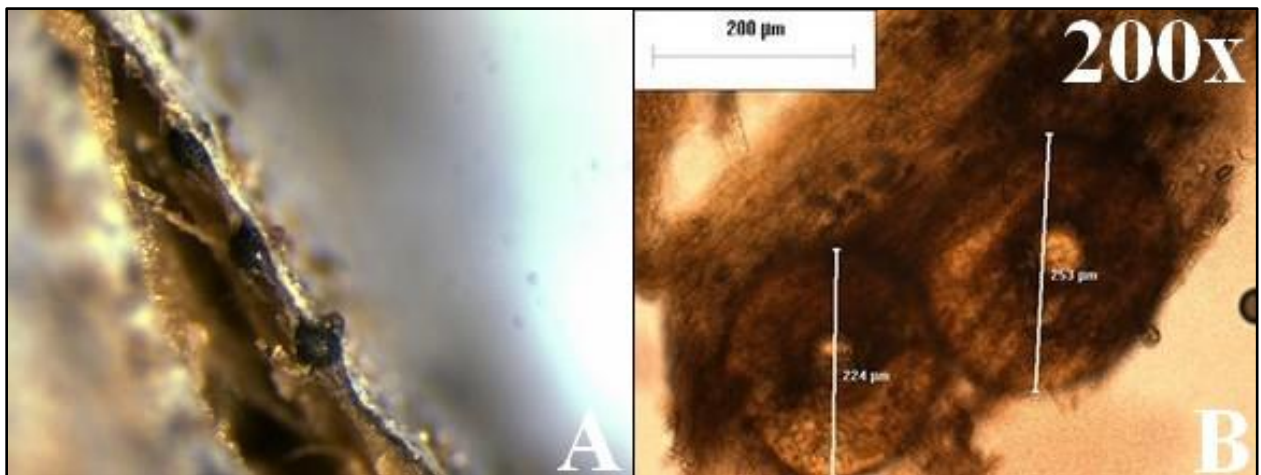


17. ábra *Plenodomus*-faj által okozott tünet levélen (A) és száron (B) (Fotók: Bagi)

4.2.1. *Plenodomus*-fajok morfológiai- és tenyészbélyegei

A piknídiumok jellemzői

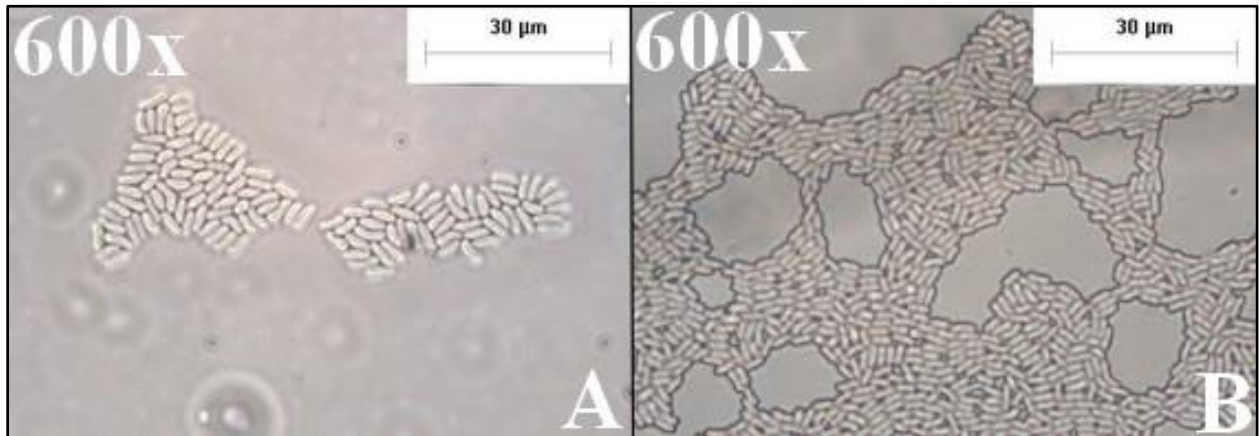
A levéllemezeken kialakuló foltokban, valamint a fertőzött száron lévő nekروزisokban mindkét kórokozó esetében a növény szövetébe ágyazódott, fekete színű, kerekded, 200-300 μm közötti átmérőjű piknídiumokat figyeltünk meg (18/A és 18/B ábra).



18. ábra *Plenodomus* sp. piknídiumai sztereomikroszkóp alatt (A), valamint citoplaszt mikroszkóp alatt (B) (Fotók: Petróczy és Bagi)

A konídiumok jellemzői

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* konídiumai színtelenek, henger alakúak, egysejtűek, mindkét végük tompa (19. ábra). A két kórokozót a konídiumok morfológiai tulajdonságai alapján nem lehet elkülöníteni egymástól.



19. ábra *Plenodomus*-fajok konídiumai: *P. lingam* - L63-as izolátum (A), *P. biglobosus* - L99-es izolátum (B) (Fotók: Jáki)

A konídiumok méreteinek statisztikai elemzése során a hibatagok normalitását a Shapiro-Wilk teszt alapján fogadtuk el, mert a szélesség esetében a hiba valószínűsége (p) 0,461; a hosszúság esetében $p=0,745$. A szóráshomogenitást Levene-próbával ellenőriztük, mely a szélesség esetében $F(6;343)=0,568$; $p=0,756$; a hosszúság esetében $F(6;343)=1,198$; $p=0,306$ volt.

A vizsgált izolátumok konídiumai nem különböztek szignifikánsan sem a szélesség, sem a hosszúság tekintetében (Wilk's-lambda = 0,96; $p=0,330$), így a konídiumméret alapján nem lehet megbízhatóan azonosítani az izolátumokat fajszinten.

Az izolátumok molekuláris módszerrel történő fajszintű azonosítását követően lehetővé vált a korábban dokumentált konídiumméretek visszakövetése és azonosítása izolátum szinten. A vizsgált *P. lingam* konídiumok átlagosan $1,553 \times 3,795$ μm -es nagyságúak, a vizsgált *P. biglobosus* konídiumok átlagosan $1,563 \times 2,673$ μm -es nagyságúak voltak (7. táblázat).

7. táblázat *Plenodomus* izolátumok konídiumainak átlagos mérete és a tenyészetek átlagos növekedése PDA táptalajon

Kórokozó	Izolátum	A konídium átlagos mérete (μm)	A tenyészet átlagos növekedése (mm/nap)
<i>P. lingam</i>	L7	$(1,39) - 1,55 - (1,73) \times (3,37) - 3,86 - (4,5)$	1,96
	L18	$(1,40) - 1,56 - (1,74) \times (3) - 3,73 - (4,5)$	2,50
	L26	$(1,34) - 1,55 - (1,72) \times (3) - 3,76 - (4,41)$	1,68
	L34	$(1,38) - 1,55 - (1,72) \times (3,14) - 3,83 - (4,47)$	2,21
<i>P. biglobosus</i>	L17	$(1,39) - 1,57 - (1,74) \times (3) - 3,73 - (4,2)$	2,71
	L39	$(1,38) - 1,57 - (1,8) \times (3) - 3,75 - (4,28)$	2,64
	L43	$(1,3) - 1,55 - (1,71) \times (3,27) - 3,78 - (4,48)$	2,67

Tenyészbélyegek

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* fajra jellemző tenészbélyegek a legtöbb esetben a leoltást követő 28. napon már jól elkülönülnek egymástól, azonban fajon belül is megfigyelhető változékonyság az izolátumok között.

A P. lingam tenészbélyegei

A *P. lingam* konídiumai PDA táptalajon megfigyeléseink során közel 2-3 nap elteltével indultak csírázásnak. A kórokozó tenyészetei leggyakrabban szabálytalan kör alakúak, növekvő szegélyük ép, hullámos, vagy csipkézett. Az izolátumokat a tenyészetek főbb morfológiai jellemzői – a tenyészetek színe, mintázottsága, a színanyag termelődése, valamint a légmicélium képződése – alapján (20. ábra) négy csoportba (A, B, C, D) soroltuk.

Az „A” csoportba tartozó tenyészetek (L4, L5, L7 - L13, L29 - L32, L48, L53, L54, L272, L275, L276) közös jellemzője, hogy színük a világosszürkétől a sötétszürkéig változik, fonáki oldaluk színe egységesen sötétszürke vagy barna. Mintázottságukat tekintve egyneműek, a tenyészet szélénél a táptalaj barnásra színeződik, csak gyér légmicéliumot képeznek.

A „B” csoportba tartozó izolátumok tenészetek (L1, L2, L3, L6, L15, L16, L18, L21, L25 - L27, L28, L33, L61, L63, L75 - L80, L84 - L96, L132, L200, L221, L223, L269, L271) színi oldala szintén a világosszürkétől a sötétszürkéig változik, fonáki oldalukon a leoltási ponttól kiindulva nagyobb arányban sötétszürke vagy barna, azonban a színi és a fonáki oldal szegélyénél

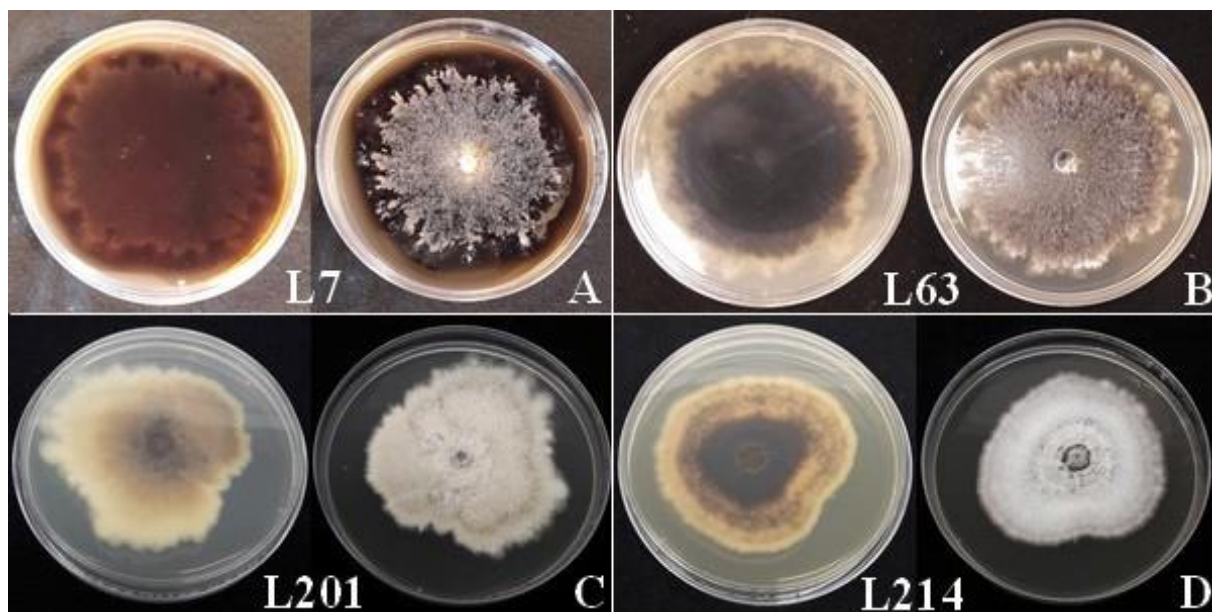
világos sáv figyelhető meg. A táptalajon elszíneződést nem okoz, légmicélium gyakorlatilag nem képződik. A tenyészetek széle csipkézett.

A „C” csoportba tartozó tenyészetek (L23, L24, L36, L40, L45 - L47, L51, L52, L98, L101, L106 - L110, L131, L197 - L199, L201, L204, L211 - L213, L215 - L218, L220, L222, L224, L227, L228, L233, L234, L238, L239, L242, L243 - L245, L248, L254, L282, L283) színe a fehértől a világosszürkéig változik. A tenyészetek fonáki oldalát vizsgálva a tenyészet a leoltási pont körül szürkésbarna, vagy középbarna, széle felé kivilágosodó. Színi oldaluk egynemű, fonáki oldalukon a sötét és a világos árnyalatok átmenete jelenik meg. Színanyag termelődése nem történik, a színi oldalukon nagy mennyiségű légmicélium képződik.

A „D” csoportba soroltuk azoknak az izolátumoknak (L49, L50, L118, L160, L166, L167, L183, L208 - L210, L214, L219, L225, L226, L230, L232, L235 - L237, L240, L246, L247, L255, L256, L258 - L264, L266, L267, L273, L274, L277 - L280, L284) a tenyészeit, melyek színe fehértől a világosszürkéig változik, fonáki oldalukon a leoltási pont körül több cm átmérőjű körben sötétszürke vagy barna. A tenyészetek a szélük felé kivilágosodnak, a fonáki oldalon a sötét és a világos részek közel egyenlő arányúak, vagy a fonáki oldal nagyobb része világos. Színi oldaluk ugyan egynemű, de fonáki oldalukon kontrasztos sávok mintázottságot láthatunk. A tenyészetek széle ép. Színanyag-termelődés nem jelentkezik, a légmicélium a tenyészetek felszínét egységes fehér bevonatként borítja.

Egyes tenyészetek esetében (L34, L35, L229, L231, L241, L249, L250 - L253, L265, L268, L270) a „B” és a „D” csoport közötti átmenet figyelhető meg. Színük a fehértől a világosszürkéig változik, fonáki oldalukon színük nagyobb arányban sötétszürke, vagy barna, szélük felé kivilágosodó. Színi oldaluk egynemű, fonáki oldalukon kontrasztos sávok mintázottság látható.

A vizsgált *P. lingam* tenyészetek átlagosan 2,09 mm-t növekedtek naponta (7. táblázat).



20. ábra *Plenodomus lingam* 28 napos tenyészei PDA táptalajon (Fotók: Bagi és Csik)

A P. biglobosus tenyészbélyegei

A P. biglobosus konídiumai a *P. lingam* konídiumainál rövidebb idő alatt, már egy nap elteltével csírázásnak indultak. Tenyészei jellemzően kör alakúak, szélük határozatlan, piknidiumokat nem képez. Legjellemzőbb tulajdonságuk, hogy a legtöbb esetben sárgás-barnásra színezik a PDA táptalajt, azonban vannak izolátumok, melyek nem mutatják ezt a tulajdonságot. A tenyészetek színe, mintázottsága, valamint a légmicélium képződése alapján ebben az esetben is négy csoportot (A, B, C, D) különítettünk el (21. ábra).

Az „A” csoportba csak néhány izolátumot soroltunk a tenyészetek morfológiája alapján: L14, L17, L19, L20, L22. A telepek színi oldala világosszürkés-fehéres, a leoltási pontnál sárgás árnyalatú, fonáki oldalát közepén sötét szürkés-barna elszíneződés jellemzi. Széle felé sárgás színű, kivilágosodó. Mintázottságát tekintve színi oldala inkább egynemű, fonáki oldalának középső része sötétbarna. A színi és a fonáki oldalon egyaránt elszórtan sötét színű micéliumtömörülések jelennek meg. A színi oldalon a laza szerkezetű légmicélium képződése intenzív.

A „B” csoportba (L37 - L39, L41 - L44, L55 - L59, L60, L62, L64 - L74, L81, L117, L123, L138 - L140, L151, L154, L155, L159, L161, L169 - L171, L179, L180, L184, L188 - L191, L193 - L195, L202, L203, L205 - L207, L257, L281 L285 - L287, L289 - L296) tartozott az izolátumok legnagyobb része. Az izolátumok színi oldala szürkés, az izolátumok fonáki oldalának közepén nagyobb arányban sötét szürkés-barna elszíneződés figyelhető meg. Széle felé sárgás színű, kivilágosodó. Színi oldaluk egynemű, fonáki oldaluk sötétbarna a leoltási pont körül, majd a

tenyészet széle felé világosbarnává, majd sárgásbarnává válik. Az egységes bevonatot alkotó fehér légmicélium a tenyészet széle felé tömörebb állagú.

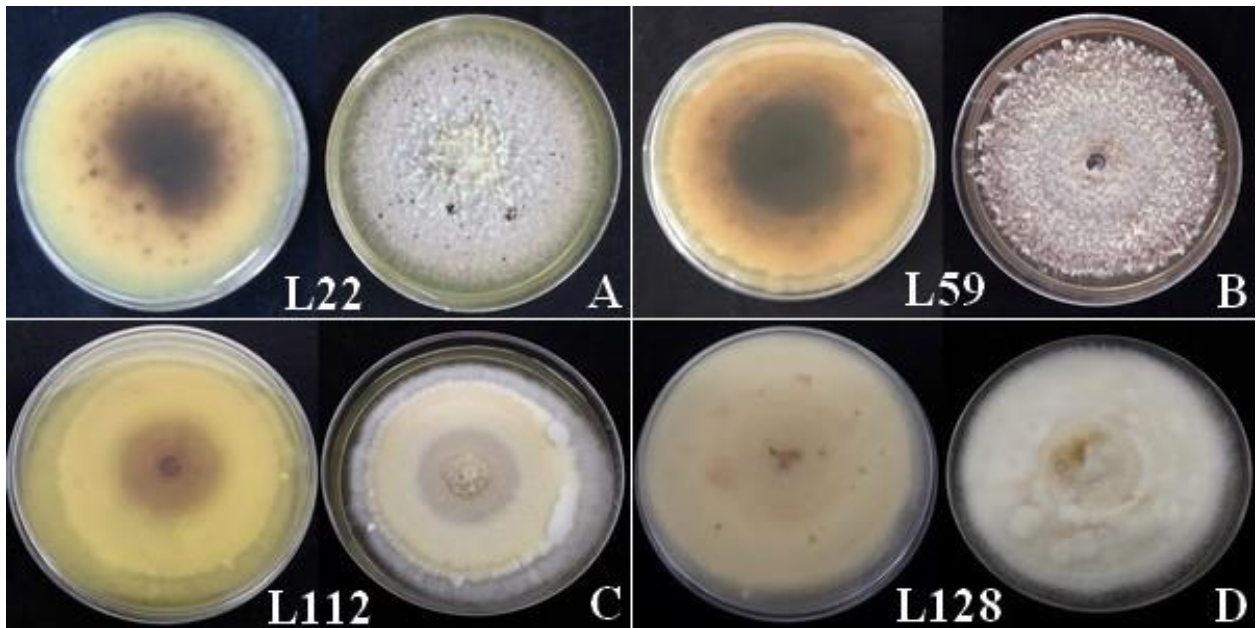
A „C” csoport tagjainak (L82, L83, L111 - L115, L124 - L126, L145, L147 - L150, L157, L162 - L165, L168, L178) színi oldala a tenyészet közepe felé ugyan barnás, azonban a tenyészet nagy része egységes sárga színű, növekvő széle pedig fehér. Az izolátumok fonáki oldala a leoltási pont környékén sötét szürkés-barna, széle felé sárga, kivilágosodó. A tenyészeteket sávossá mintázottság jellemzi. Színi oldalukon megfigyelhető, hogy a *P. lingam*-hoz képest több légmicéliumot hoz létre, amely a tenyészet közepén tömör, sárgás színű, a tenyészet széle felé pedig lazább, fehér.

A „D” csoportba tartozó tenyészetek (L97, L99, L100, L102 - L105, L119, L120, L122, L128 - L130, L133 - L135, L141 - L143, L146, L153, L172 - L174, L176, L181, L186, L187, L192) a korábban bemutatottaktól eltérő, atipikus tenyészbélyegeket mutatnak. Azonban ezen izolátumok esetében is megerősítettük a PCR során, hogy az a *P. biglobosus* fajhoz tartoznak. A „D” csoport izolátumai a PDA táptalajt nem színezik el, színük egységes törtefehér vagy enyhén krémszínű. Mintázottságukat tekintve elszórtan világosbarnás foltok jelennek meg, színi oldalukon nagy mennyiségű dús, gyapjas légmicélium képződik.

Egyes tenyészetek esetében (L116, L121, L127, L144, L152, L156, L158, L177, L182, L185, L301 - L304) a „B” és „C” csoport közötti átmenet figyelhető meg. Ezen tenyészetekre jellemző, hogy színi oldaluk a tenyészet közepe felé barnás, a tenyészet nagy része sárga színű, széle felé fehér. Fonáki oldaluk közepén nagyobb arányban sötét szürkés-barna színű. Széle felé sárgás, kivilágosodó. Ezen tenyészetek esetén sávossá mintázottság jellemző.

Egyes izolátumok tenyészetei (L136, L137, L175, L196, L288, L297 - L300, L305 - L308) a „B” és a „D” csoport közötti átmenetbe sorolhatók. Az izolátumok színi oldala szürkés, az izolátumok fonáki oldalának közepénél nagyobb arányban sötét szürkés-barna elszíneződés jelenik meg. Széle felé sárgás színű, kivilágosodó. Színi oldaluk mintázottságukat tekintve egynemű, fonáki oldalukon a sötét és a világos árnyalatok átmenete jellemző.

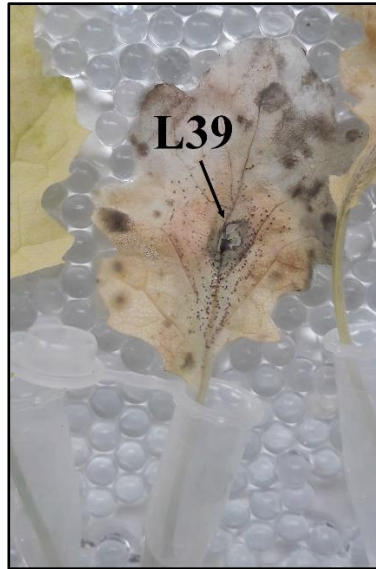
A vizsgált *P. biglobosus* tenyészetek átlagosan 2,67 mm-t növekedtek naponta (7. táblázat).



21. ábra *Plenodomus biglobosus* 28 napos tenyészei PDA táptalajon (Fotók: Bagi és Jáki)

4.3. Patogenitási teszt

A mesterségesen fertőzött növényeket és a leválasztott leveleket a fertőzést követő 10. napig figyeltük meg. A fiatal növények esetében a fertőzési pontnál 2-3 nap után a kórokozókra jellemző tünetek, barnulás és az edénnyalábok elhalása jelent meg. A 10. nap után az inokulált növényeken és az inokulált leválasztott leveleken a nekrosis kiterjedését figyeltünk meg. Néhány levélen piknidiumok alakultak ki (22. ábra). A steril PDA koronggal inokulált kontroll növények és levelek a 10. napig tünetmentesek maradtak. Az inokulált növényeken és leveleken megjelenő sötétbarna foltokból a kórokozót újra izolálni tudtuk, ezáltal teljesítettük a Koch-posztulátumokat. Az izolátumok ezután is ugyanazon tenyészbélyegekkkel rendelkeztek, mint a mesterséges fertőzés előtt.

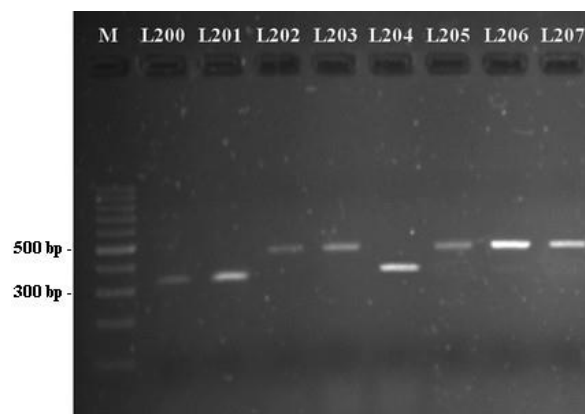


22. ábra Az L39-es *Plenodomus biglobosus* által okozott nekrotikus lézió és pikenídiumok az inokulált repce levélen 10 napos inkubálás után (Fotó: Bagi)

4.4. *Plenodomus* izolátumok molekuláris vizsgálata

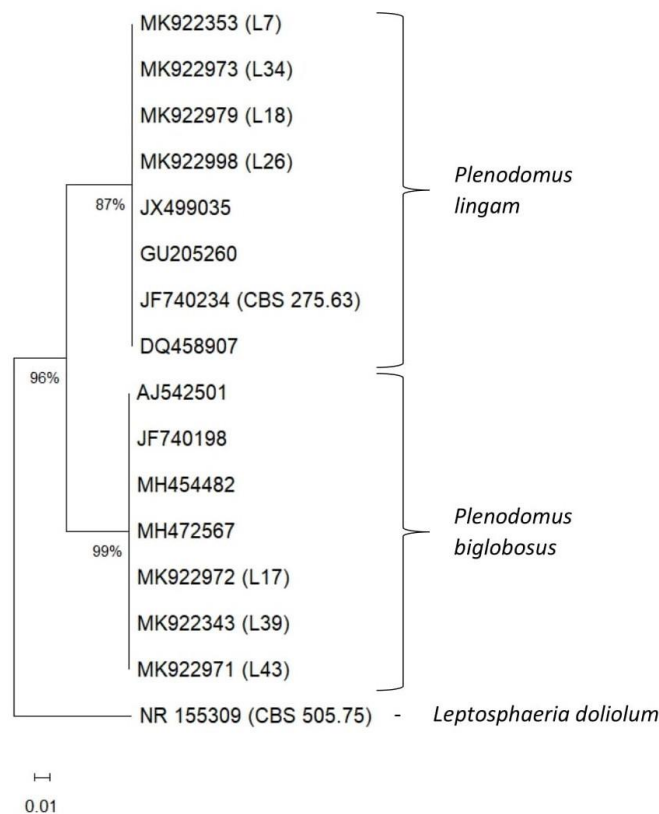
4.4.1. *Plenodomus* izolátumok fajszintű elkülönítése

A 308 izolátumot sikeresen határoztunk meg fajszinten az ITS régiók és az 5,8S rDNS gén molekuláris vizsgálata alapján fajspecifikus primerek alkalmazásával PCR-rel. A *P. lingam* és a *P. biglobosus* kórokozók a keletkező PCR-termék hosszúsága alapján egyértelműen elkülöníthetők. A *P. lingam* esetében 331 bp hosszúságú, míg a *P. biglobosus* esetében 444 bp hosszúságú szakasz keletkezett (23. ábra). Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy a vizsgált 308 izolátum közül 158 a *P. lingam*, míg 150 a *P. biglobosus* fajhoz tartozott.



23. ábra A Gyirmótról (Győr) származó *P. lingam* (L200, L201, L204) és *P. biglobosus* (L202, L203, L205, L206, L207) izolátumok fajszintű azonosítása az ITS régiók és az 5,8S rDNS gén alapján

Az összehasonlító vizsgálatokhoz a *P. lingam* izolátumok közül 4-et, míg a *P. biglobosus* izolátumok közül 3-at választottunk ki, melyeket az NCBI adatbázisból származó külföldi izolátumok szekvenciáival hasonlítottuk össze. Ehhez a *P. lingam* esetében 289 bp, míg a *P. biglobosus* esetében 327 bp hosszúságú szakaszt használtunk fel (7. melléklet), melyek a nemzetközi adatbázisba feltöltésre kerültek. Az összehasonlítás eredményeként megállapítható, hogy a *L. doliolum*-tól – mint a csoporton kívüli (outgroup) taxon szekvenciájától – ágaztatott törzsfán a *P. lingam* és a *P. biglobosus* izolátumok 100%-os megbízhatósággal elkülönülnek egymástól (24. ábra). A saját *P. lingam* izolátumainkat (L7, L18, L26, L34) a referencia izolátumhoz (JF740234) hasonlítva 100%-os azonosságot, míg a saját *P. biglobosus* izolátumainkat (L17, L39, L43) a referencia izolátumhoz (AJ542501) hasonlítva 99,7-100%-os hasonlóságot figyeltünk meg a BLAST analízis alapján.

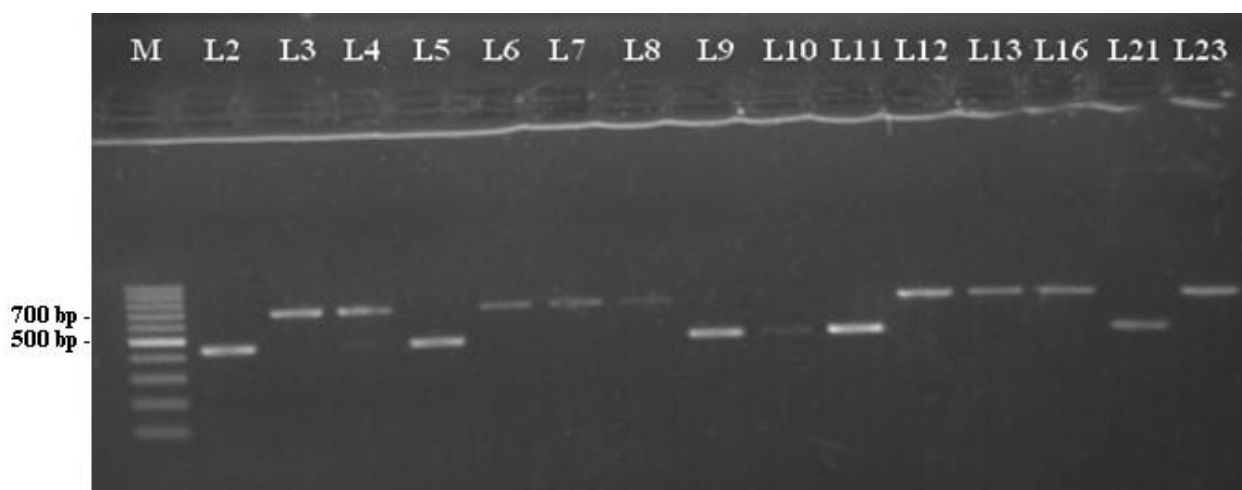


24. ábra Saját és a nemzetközi adatbázisból származó *P. lingam* izolátumok 289 bp hosszúságú, valamint a *P. biglobosus* izolátumok 327 bp hosszúságú részleges ITS1 régió, 5,8S rDNS gén, valamint részleges ITS2 régió szekvenciáinak felhasználásával a Neighbor-Joining statisztikai becslés alapján készített filogenetikai törzsfa

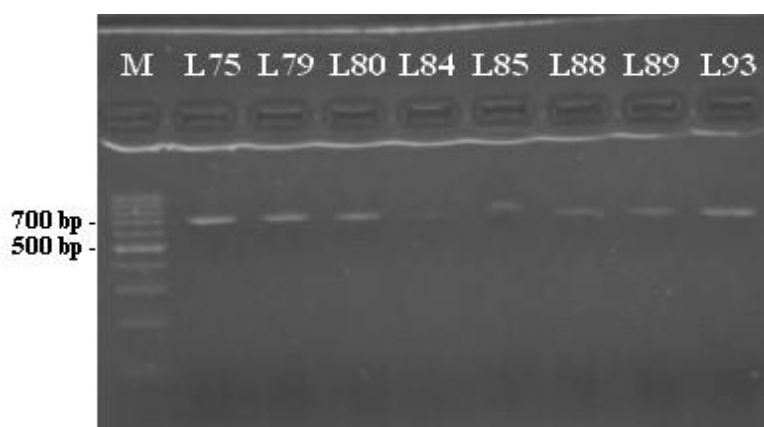
Megjegyzés: A törzsfát 1000 ismétléses „bootstrap” támogatottság mellett MEGA11 programmal készítettük el. A statisztikai támogatottság értékei az elágazások mellett láthatók. Csoporton kívüli taxonként a *Leptosphaeria doliolum*-ot (CBS 505.75) választottuk.

4.4.2. *Plenodomus lingam* párosodási típusainak vizsgálata

Elsőként igazoltuk hazánkban a *P. lingam* esetében mind a MAT1-1, mind a MAT1-2 párosodási típus jelenlétét molekuláris módszerrel. A MAT1-1 típus esetén 656 bp hosszúságú, míg a MAT1-2 típus esetén 445 bp hosszúságú szakasz keletkezik a PCR során. A vizsgált 23 izolátum közül (4. melléklet) 17 esetben (L3, L4, L6, L7, L8, L12, L13, L16, L23, L75, L79, L80, L84, L85, L88, L89, L93) mutattuk ki a MAT1-1, míg 6 esetben (L2, L5, L9, L10, L11, L21) a MAT1-2 párosodási típust. A kapott szekvenciákat az NCBI adatbázisba feltöltöttük. A szekvenciák génbanki azonosító kódjait a 8. mellékletben szemléltetem. A Nagylózsáról (L2 – L13), valamint a Kétpóról (L16, L21, L23) származó izolátumok között mindkét párosodási típus jelenlétét megfigyeltünk (25. ábra), míg a felsőnáni izolátumok (L75, L79, L80, L84, L85, L88, L89, L93) mind a MAT1-1 párosodási típushoz tartoztak (26. ábra). Ebből megállapítható, hogy a *P. lingam* esetén Magyarországon is adott az ivaros szaporodás lehetősége.



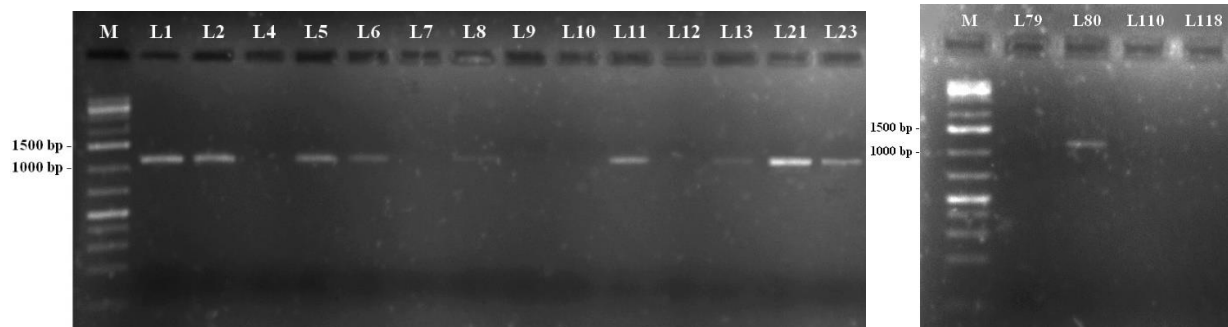
25. ábra Nagylózsáról és Kétpóról származó *P. lingam* izolátumok párosodási típusainak meghatározása PCR-rel



26. ábra Felsőnána-ról származó *P. lingam* izolátumok párosodási típusainak meghatározása PCR-rel

4.4.3. *Plenodomus* izolátumok *AvrLm4* génjének vizsgálata

Az *AvrLm4* gént a *P. lingam* (27. ábra), valamint a *P. biglobosus* izolátumok egy részénél (L81, L82, L97, L104, L136) vizsgáltuk a PCR során (4. melléklet). Az izolátumok különböző hibridekről származtak. A *P. lingam* esetében a célszekvencia mérete a primerekkel együtt 1127 bp volt, a vizsgált *P. biglobosus* izolátumok közül amplitikon egyik esetén sem keletkezett.



27. ábra *P. lingam* izolátumok *AvrLm4* génjének vizsgálata PCR-rel

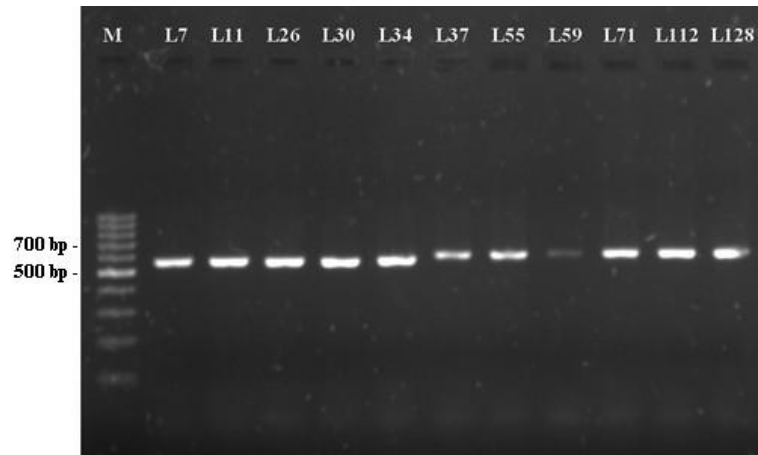
A gazdanövényeket, valamint a vizsgált *P. lingam* izolátumokat a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat *AvrLm4* gén előfordulása különböző gazdanövényekről származó *P. lingam* izolátumok genetikai állományában

Gazdanövény	Vizsgált izolátumok	
	<i>AvrLm4</i> gént tartalmazott	<i>AvrLm4</i> gént nem tartalmazott
'Allberich KWS'	L1, L2	-
'Hybrirock'	L5	L4
'Factor KWS'	L6	L7
'Alvaro KWS'	L8	L9
'Marc KWS'	L11	L10
'Umberto KWS'	L13	L12
'Gordon KWS'	L21, L23	-
'Shrek'	L80	L79
'Exception'	-	L110, L118

4.4.4. *Plenodomus* izolátumok 18S-28S szakaszának vizsgálata

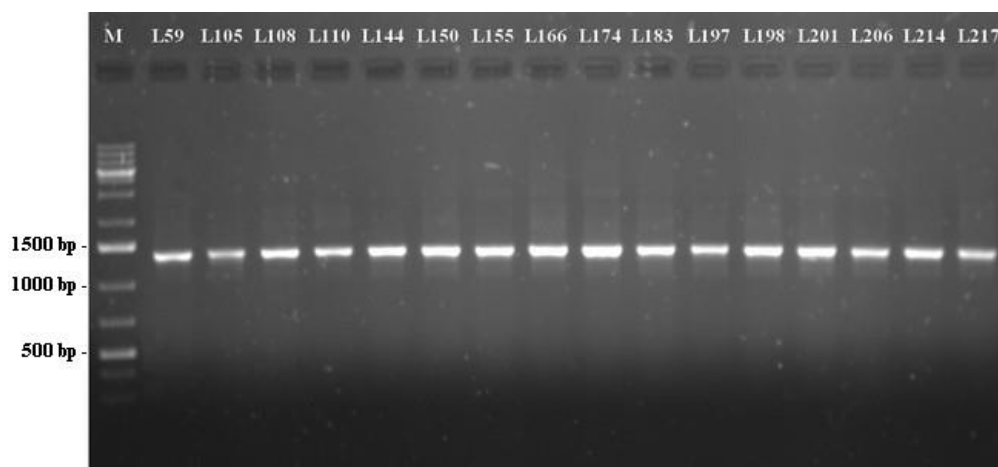
A 308 izolátum közül 43 esetében (4. melléklet) sikeresen amplifikáltuk a 18S-28S régiót: a *P. lingam* esetén 554 bp, míg a *P. biglobosus* esetén 582 bp hosszúságú szakasz szaporodott fel, mely alapján a két kórokozó elkülöníthető egymástól (28. ábra).



28. ábra A 18S-28S szakasz vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált *P. lingam* (L7, L11, L26, L30, L34) és *P. biglobosus* (L37, L55, L59, L71, L112, L128) izolátumok esetén

4.4.5. *Plenodomus* izolátumok LSU régiójának vizsgálata

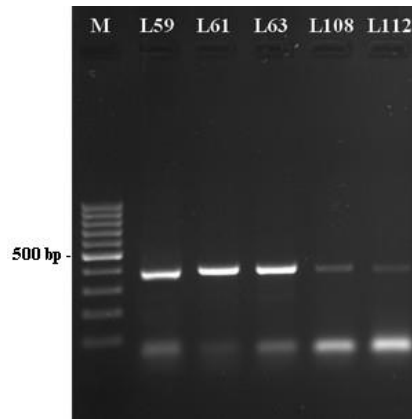
A 18S-28S szakasz vizsgálata során kiválasztott izolátumok LSU régióját vizsgálva, a PCR-ek során a *P. lingam* esetében 1364 bp, a *P. biglobosus* esetében 1363 bp hosszúságú termék keletkezett, mely a gélelektroforézis során a termék hossza alapján egymástól nem különíthető el (29. ábra).



29. ábra Az LSU régió egy részének vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált *P. lingam* (L108, L110, L166, L183, L197, L198, L201, L214, L217) és *P. biglobosus* (L59, L105, L144, L150, L174, L206) izolátumok esetén

4.4.6. *Plenodomus* izolátumok *tub2* génjének vizsgálata

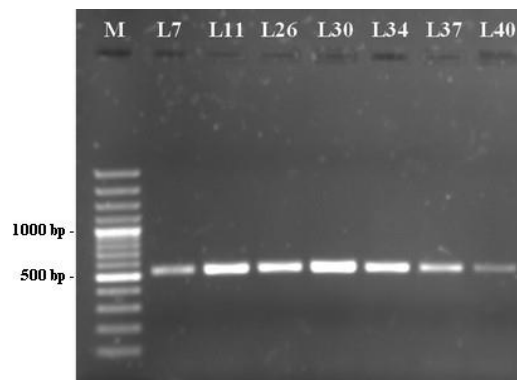
A 18S-28S szakasz, valamint az LSU régió során vizsgált izolátumok esetén a *tub2* gén egy szakaszát is megvizsgáltuk. A PCR során a *P. lingam* esetén 394 bp, a *P. biglobosus* esetén 386 bp hosszúságú termék keletkezett (30. ábra).



30. ábra A *tub2* gén szakaszának vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált *P. lingam* (L61, L63, L108) és *P. biglobosus* (L59, L112) izolátumok esetén

4.4.7. *Plenodomus* izolátumok *rpb2* régiójának vizsgálata

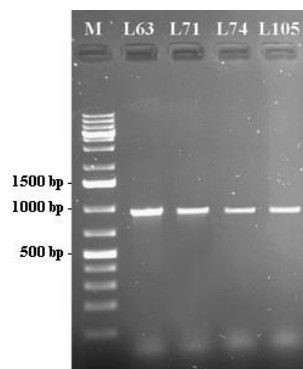
A 18S-28S szakasz, az LSU régió, valamint a *tub2* gén vizsgálata során felhasznált 43 izolátum esetén az *rpb2* régió egy szakaszát is PCR-rel felszaporítottuk. Mindkét kórokozó esetén 535 bp hosszúságú szakasz amplifikálódott (31. ábra).



31. ábra Az *rpb2* régió egy szakaszának vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált *P. lingam* (L7, L11, L26, L34, L40) és *P. biglobosus* (L37) izolátumok esetén

4.4.8. *Plenodomus* izolátumok *act1* génjének vizsgálata

A kiválasztott 43 izolátum esetén az előző négy szakaszon kívül egy ötödik szakaszt, az *act1* gén egy szakaszát is amplifikáltuk PCR során. Mindkét kórokozó esetén 943 bp hosszúságú a primerek által kijelölt célszekvencia (32. ábra).



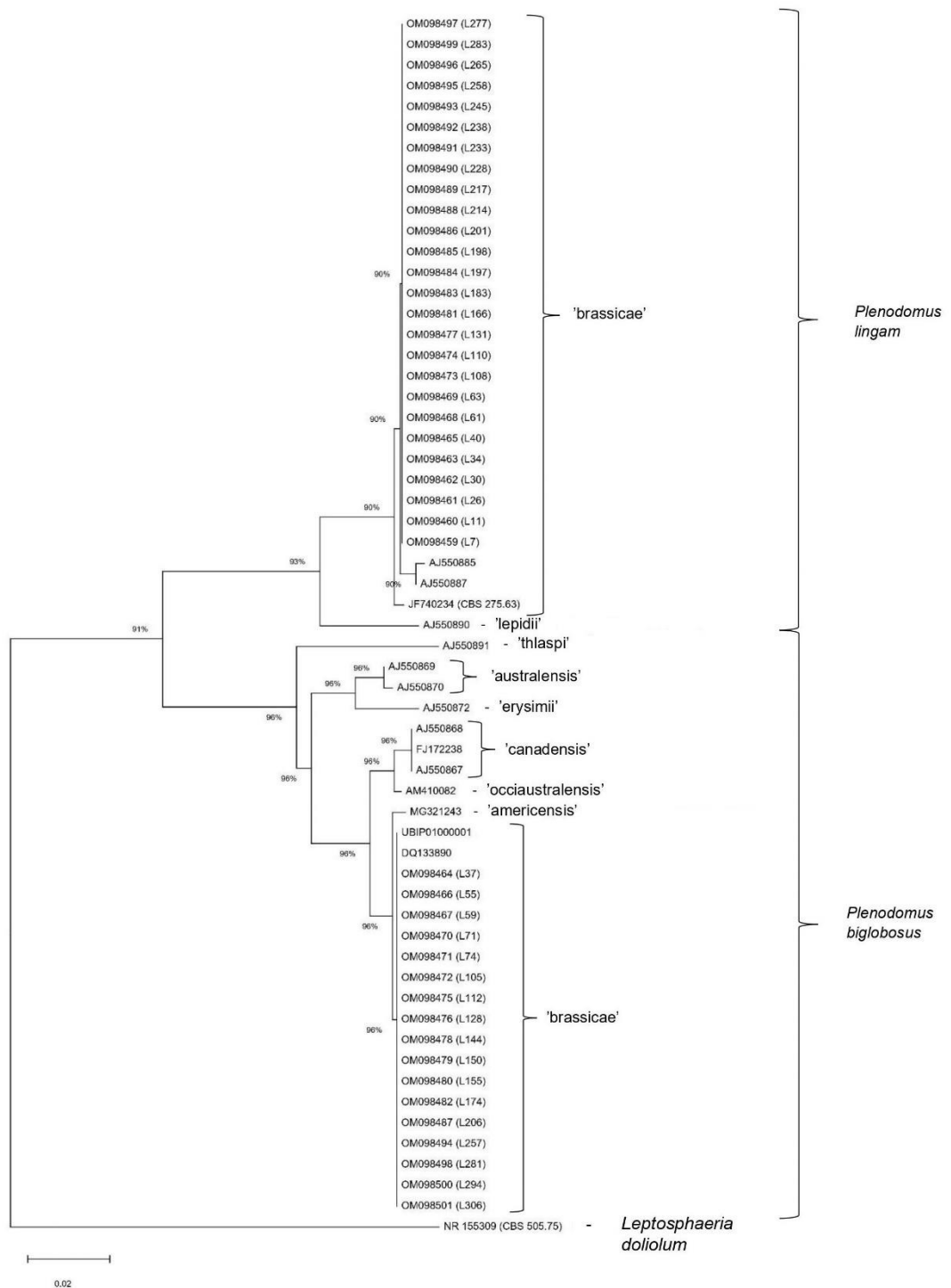
32. ábra Az *act1* gén egy szakaszának vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált *P. lingam* (L63) és *P. biglobosus* (L71, L74, L105) izolátumok esetén

4.5. Filogenetikai analízis

A vizsgált 43 izolátum (4. melléklet) filogenetikai analíziséhez a következő szakaszok nukleotid sorrendjét választottuk ki: teljes ITS1-5,8S-ITS2 szekvencia (a *P. lingam* esetén 468 bp, a *P. biglobosus* esetén 496 bp), az LSU régió egy szakasza (a *P. lingam* esetén 877-881 bp, a *P. biglobosus* esetén 874-881 bp), a *tub2* gén egy szakasza (a *P. lingam* esetén 343-345 bp, a *P. biglobosus* esetén 336-337 bp), az *rpb2* régió egy szakasza (a *P. lingam* esetén 492 bp, a *P. biglobosus* esetén 492-493 bp), valamint az *act1* gén egy szakasza (a *P. lingam* esetén 898-899 bp, a *P. biglobosus* esetén 899 bp). A szakaszok szekvenciái tudomásunk szerint az első szekvencia adatok Magyarországról.

4.5.1. Filogenetikai törzsfá az ITS1-5,8S-ITS2 régió alapján

Az ITS1-5,8S-ITS2 régió alapján a *P. lingam* és a *P. biglobosus* külön ágon helyezkedik el, valamint emellett az egyes szubkládok is jól azonosíthatóan elkülönülnek egymástól 1000 ismétléses „bootstrap” támogatottság mellett. Az általunk vizsgált izolátumok ITS1-5,8S-ITS2 szekvenciái teljes mértékben megegyeztek mind a 26 *P. lingam* izolátum esetén az Egyesült Királyságból származó izolátum ugyanazon szakaszának szekvenciájával (JF740234 a CBS275.63 teljes genomból). Ehhez hasonlóan mind a 17 *P. biglobosus* izolátum ITS1-5,8S-ITS2 szekvenciái is 100%-ban megegyeztek a referencia izolátum szekvenciájával (UBIP01000001) (33. ábra). Az elemzés alapján egyértelmű, hogy mind a 43 *Plenodomus* izolátum a *P. lingam* ‘brassicae’, illetve a *P. biglobosus* ‘brassicae’ szubkládhoz tartozik.



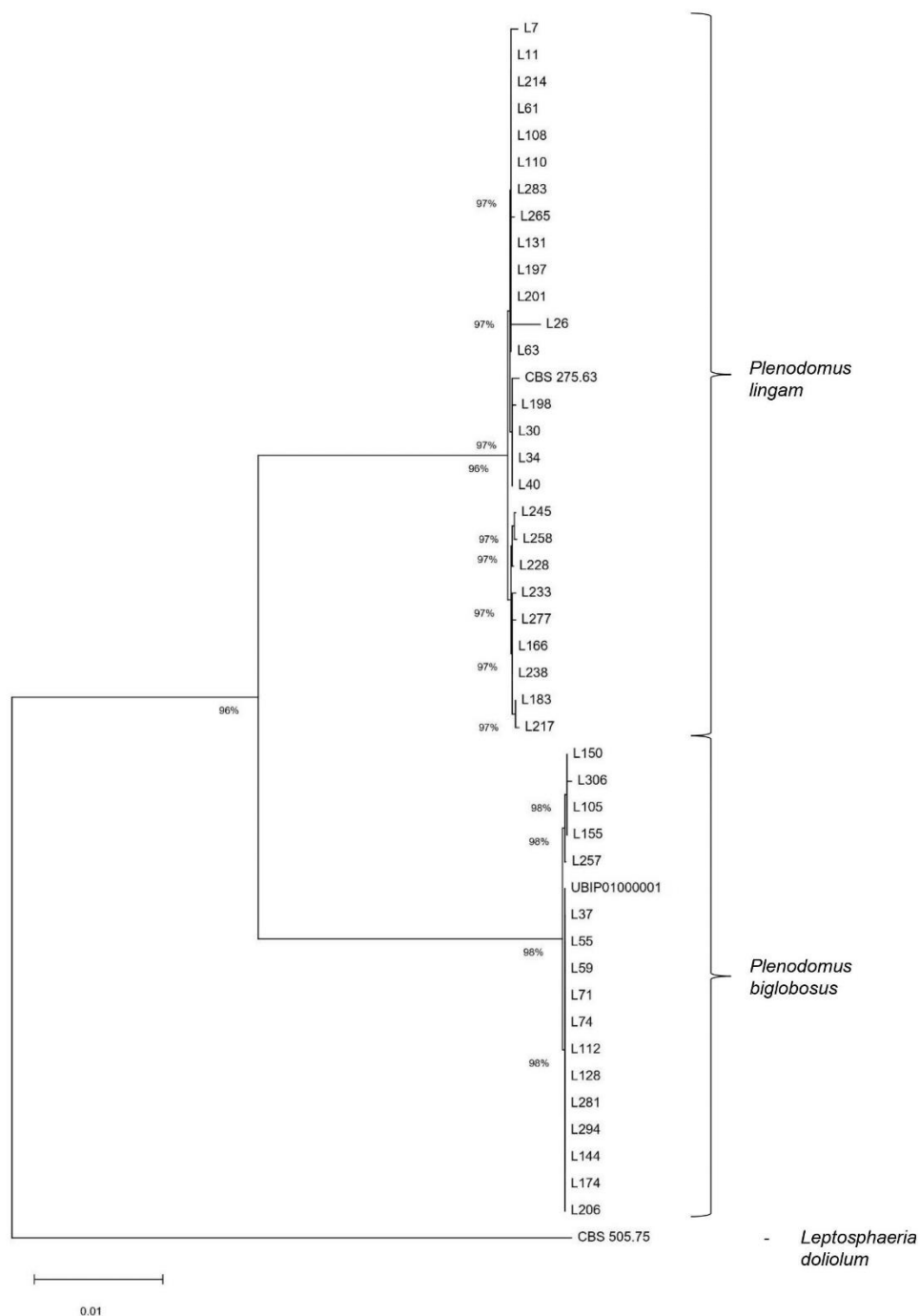
33. ábra Az általunk vizsgált 26 *P. lingam* és a 17 *P. biglobosus* izolátum, valamint az NCBI adatbázisból származó izolátumok ITS1-5,8S-ITS2 szekvenciáinak felhasználásával a Neighbor-Joining statisztikai becslés alapján készített filogenetikai törzsfá

Megjegyzés: A törzsfát 1000 ismétléses „bootstrap” támogatottság mellett MEGA11 programmal készítettük el. A statisztikai támogatottság értékei az elágazások mellett láthatók. A törzsfát a csoporton kívülként a *Leptosphaeria doliolum* (CBS 505.75) szekvenciájával gyökereztettük.

4.5.2. A két kórokozó filogenetikai analízise „multilocus”-os törzsfá alapján

A *P. lingam* izolátumok szekvenciái: a *tub2* gén vizsgált szakasza 99,42-100%-ban, az LSU vizsgált szakasza 99,43-100%-ban, az *rpb2* régió vizsgált szakasza 98,37-100%-ban megegyezett a referencia izolátum ugyanazon szekvenciáival (CBS 275.63). A *P. biglobosus* izolátumok szekvenciái: a *tub2* gén vizsgált szakasza 99,7-100%-ban, az LSU régió vizsgált szakasza 99,09-100%-ban, az *rpb2* régió vizsgált szakasza 100%-ban megegyezett a referencia izolátum ugyanazon szekvenciáival (UBIP01000001) (34. ábra). Tudomásunk szerint Magyarországon a *P. lingam* és a *P. biglobosus* esetén, ezen szakaszokat ezidáig nem vizsgálták.

A *P. lingam* ‘brassicae’, a *P. biglobosus* ‘brassicae’, valamint a csoporton kívülként alkalmazott *Leptosphaeria doliolum* izolátum négy lókusznak kombinációjaként létrehozott adatbázis összesen 46 izolátumból áll. A törzsfán (34. ábra) a vizsgált *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumok a referencia izolátumokhoz képest 96%-os bootstrap támogatottság mellett egymástól elkülönülten helyezkednek el. Fajon belüli jelentős variabilitást nem figyeltünk meg. Az izolátumok közötti alacsony genetikai diverzitás a vizsgálat során nem meglepő, mert az izolátumok az ITS1-5,8S-ITS2 régió alapján ugyanazon szubkládokhoz tartoznak (33. ábra).

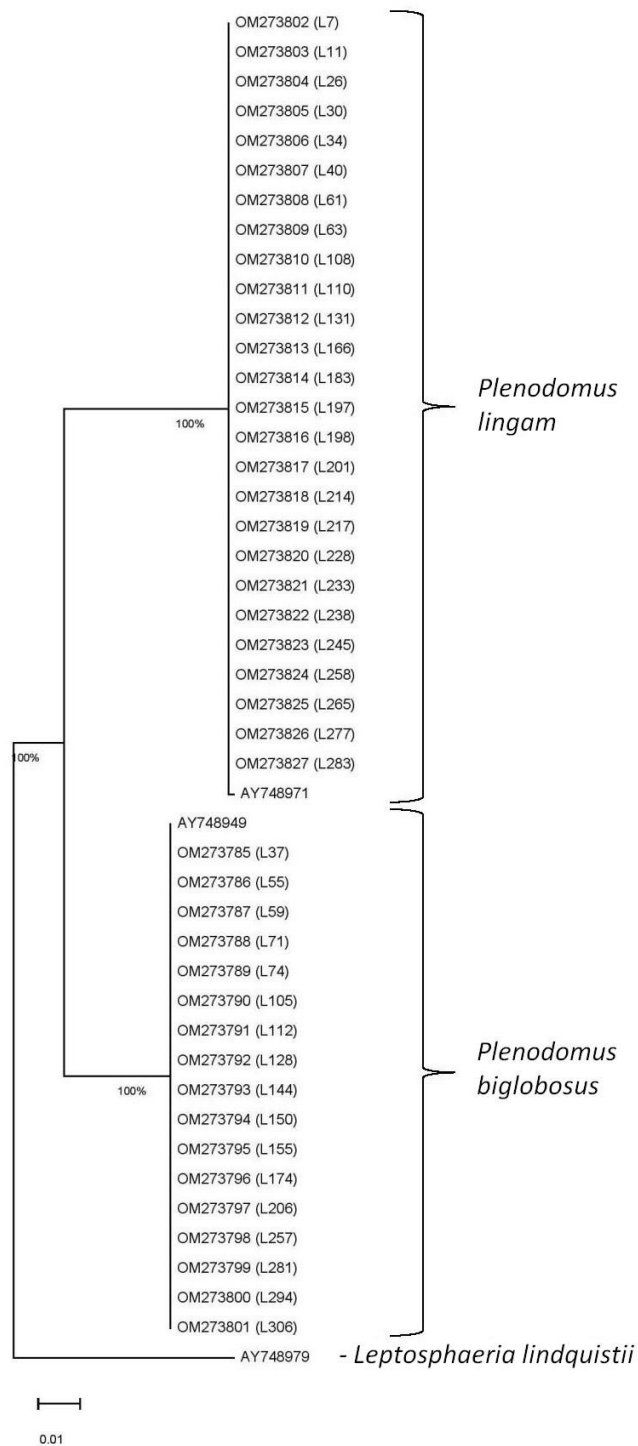


34. ábra A 26 *P. lingam* és a 17 *P. biglobosus tub2* gén egy szakaszából, az ITS1-5,8S-ITS2 régióból, az LSU régió egy szakaszából, az *rpb2* gén egy szakaszából, valamint a referencia izolátumok szekvenciáiból a Neighbor-Joining statisztikai becslés alapján készített filogenetikai törzsfa

Megjegyzés: A több, mint 95%-os bootstrap támogatottság értékei az elágazások mellett láthatók. A törzsfát a csoporton kívülként a *Leptosphaeria doliolum* (CBS 505.75) szekvenciájával gyökerezítettük.

4.5.3. Filogenetikai törzsfá az *act1* gén egy szakasza alapján

A CBS 275.63-as *P. lingam*, az UBIP01000001-es *P. biglobosus*, valamint a CBS 505.75-ös *Leptosphaeria doliolum* izolátumok esetén az NCBI adatbázisból nem állt rendelkezésünkre az *act1* gén általunk vizsgált régiójának nukleotid szekvenciája, emiatt az *act1* gén esetén külön törzsfát készítettünk (35. ábra). A törzsfát a „multilocus”-os vizsgálat során is alkalmazott 26 *P. lingam* és 17 *P. biglobosus* izolátum, az AY748971 azonosítóval nyilvántartott *P. lingam*, valamint az AY748949 hivatkozási számmal rendelkező *P. biglobosus* referencia izolátum szekvenciáit felhasználva készítettük el. Csoporton kívülként az AY748979-es *Leptosphaeria lindquistii* izolátumot választottuk, a törzsfát innen ágaztattuk el. A saját *P. lingam* izolátumaink vizsgált szakasza 99,78-99,89%-ban, míg a *P. biglobosus* izolátumaink vizsgált szakasza 99,89-100%-ban megegyezett a referencia izolátumok azonos szakaszával.



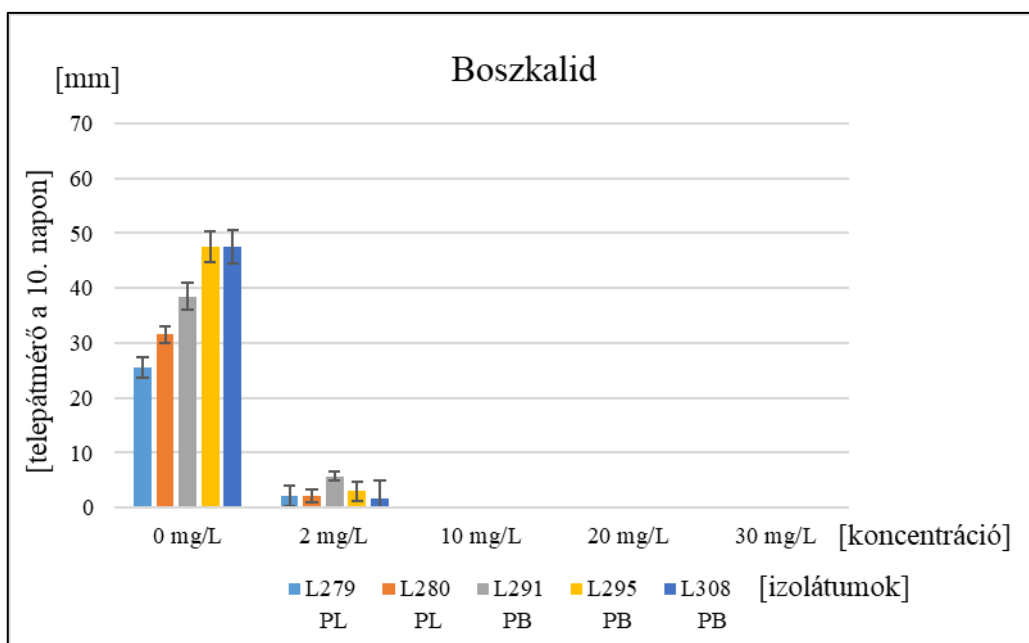
35. ábra Az általunk vizsgált 26 *P. lingam* és a 17 *P. biglobosus* izolátum, valamint az NCBI adatbázisból származó izolátumok *act1* génszakaszának felhasználásával a Neighbor-Joining statisztikai becslés alapján készített filogenetikai törzsfá

Megjegyzés: A törzsfát 1000 ismétléses „bootstrap” támogatottság mellett MEGA11 programmal készítettük el. A statisztikai támogatottság értékei az elágazások mellett láthatók. A törzsfát csoporton kívülként a *Leptosphaeria lindquistii* (AY748979) szekvenciájával gyökerezítettük.

4.6. Fungicid hatóanyagok *in vitro* tesztelése a *Plenodomus* izolátumok micéliumának növekedésére

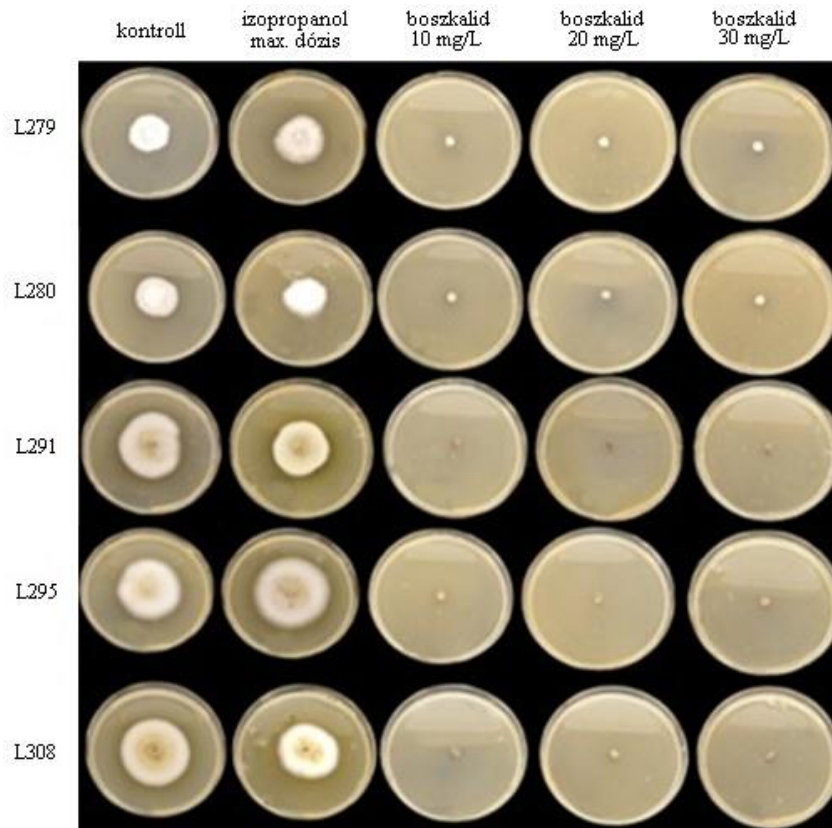
4.6.1. Boszkalid

Az SDHI fungicidek közé tartozó boszkalid hatékonyan gátolta a vizsgált *Plenodomus* izolátumok fejlődését mérgezett agarlemezekon (36. ábra). A 10, 20, 30 mg/L-es koncentrációkban mindkét faj esetén hatékonyan gátolta a hatóanyag a micélium növekedését (37. ábra). A legkisebb, 2 mg/L-es koncentrációban mind a két kórokozó tenyészetei a 10 nap alatt kis mértékben növekedésnek indultak. A kontrollhoz viszonyítva a 10. napon a *P. lingam* telepek átmérője átlagosan 92,3%-kal, a *P. biglobosus* telepek átmérője átlagosan 92,2%-kal kisebb volt a 2 mg/L-es koncentráció esetén.



36. ábra A boszkalid hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon

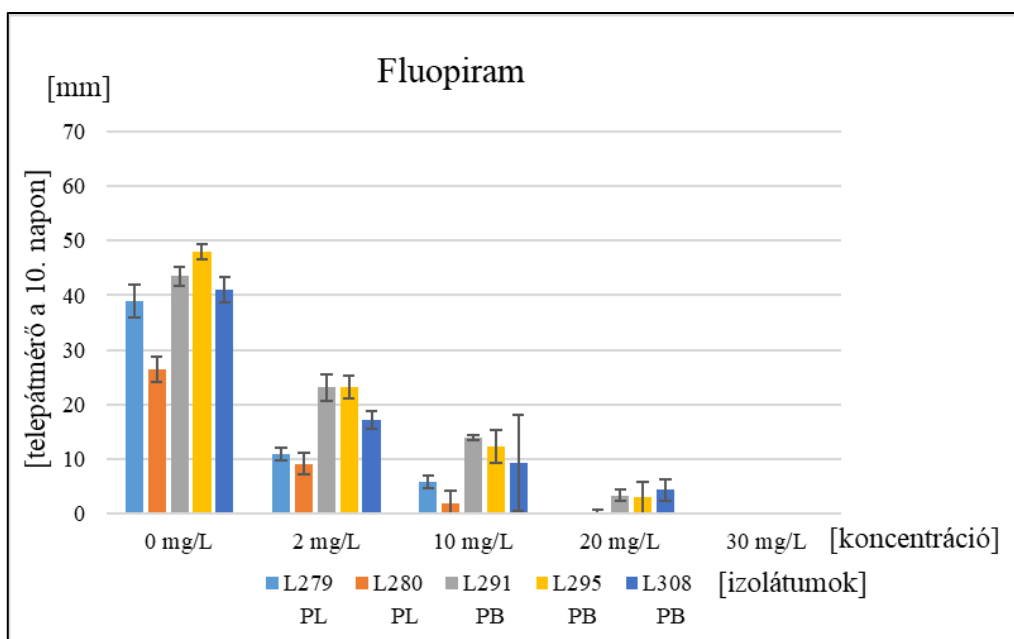
Az oldószerként alkalmazott izopropanol a legmagasabb alkalmazott koncentrációban (3000 µl/L) sem befolyásolta a *Plenodomus* izolátumok fejlődését (37. ábra). A növekedés üteme megegyezett a kontrollal, így a gátló hatás kizárólag a boszkalid hatóanyag tulajdonítható.



37. ábra A *Plenodomus* izolátumok növekedése izopropanol, illetve boszkalid tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik)

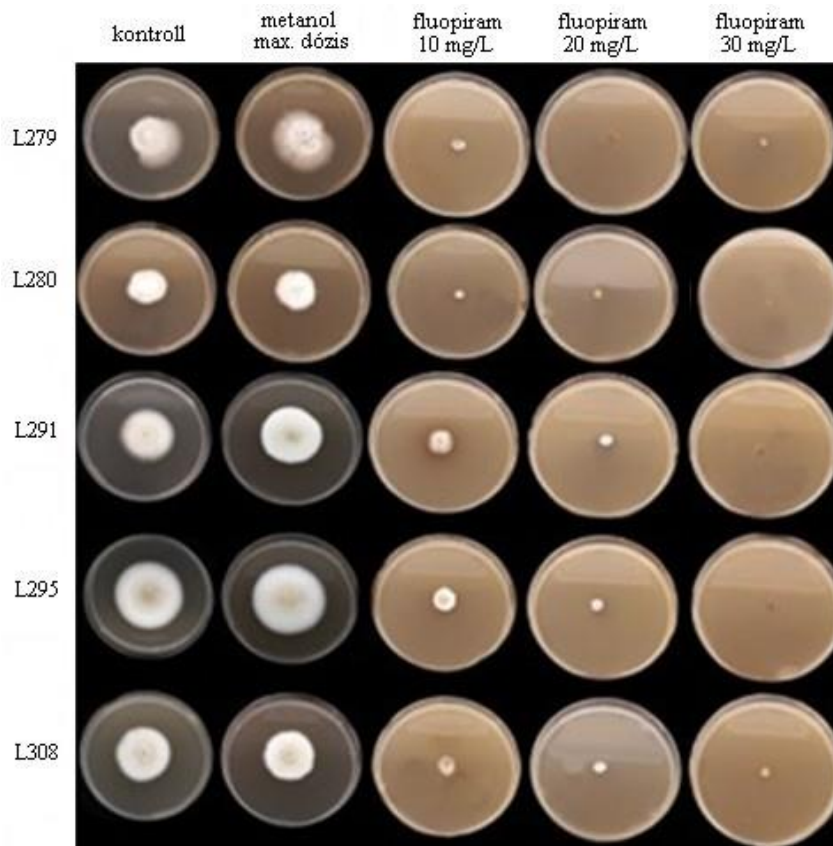
4.6.2. Fluopiram

A szintén az SDHI fungicidek közé tartozó fluopiram hatékonysága fajonként és koncentrációként is eltérő volt (38. és 39. ábra). A legmagasabb, 30 mg/L-es koncentrációban minden izolátum esetén fungicid hatást figyeltünk meg. Az alacsonyabb, 20 mg/L-es koncentrációban a vizsgált *P. lingam* izolátumoknál a 10 nap alatt átlagosan csupán minimális micéliumnövekedés volt érzékelhető, a vizsgált *P. biglobosus* izolátumok azonban a 10. nap végére nagyobb telepátmérővel rendelkeztek. Ezen koncentráció esetén a *P. lingam* tenyészetek átmérője a kontrollhoz képest átlagosan 99,6%-kal, míg a *P. biglobosus* tenyészetek átmérője 91,9%-kal volt kisebb. A 10 mg/L-es és a 2 mg/L-es koncentráció esetében is megfigyelhető a két kórokozó közötti különbség, viszont a magasabb koncentrációktól eltérően a 10 mg/L-es és a 2 mg/L-es koncentrációt alkalmazva a *P. lingam* tenyészetek is jelentősebb mértékben indultak növekedésnek. A 10 mg/L-es koncentráció esetén a *P. lingam* tenyészetek átmérője a kontroll 12,1%-át, a *P. biglobosus* tenyészetek átmérője a kontroll 26,8%-át érte el a 10. napon. A 2 mg/L-es koncentráció esetén a *P. lingam* tenyészetek 30,5%-os, míg a *P. biglobosus* tenyészetek 47,9%-os növekedést értek el átlagosan a kontroll tenyészetekhez képest.



38. ábra A fluopiram hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon

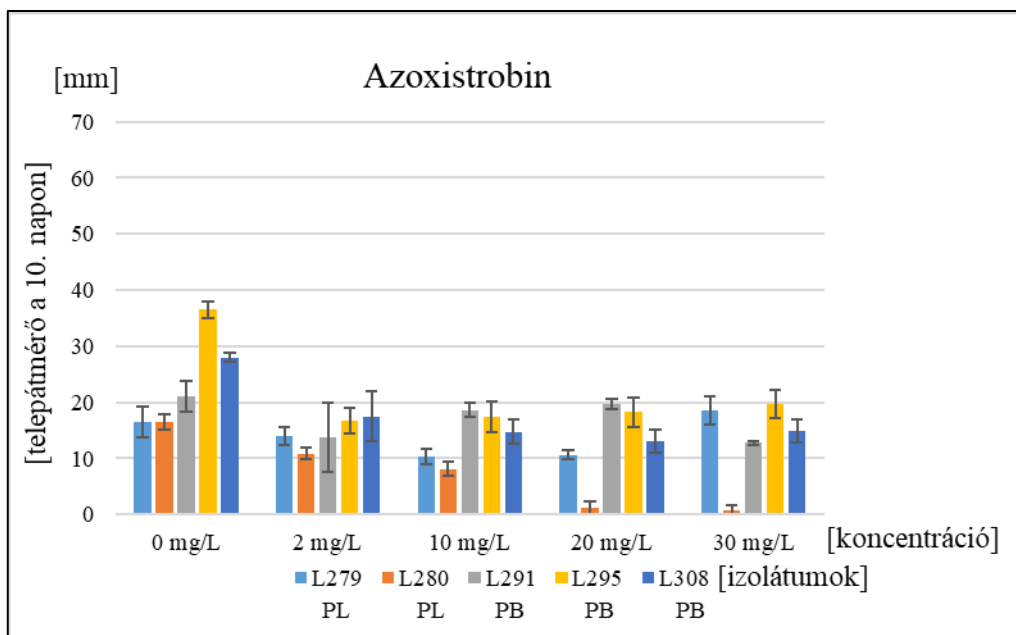
A fluopiram oldószereként használt metanol a legmagasabb alkalmazott dózisban (1500 μ l/L) sem befolyásolta *Plenodomus* izolátumok fejlődését (39. ábra). A növekedés üteme megegyezett a hatóanyagot és oldószert nem tartalmazó kontrollal, így a sorozathígítás során tapasztalt gátló hatás kizárólag a fluopiram hatóanyagnak tulajdonítható.



39. ábra A *Plenodomus* izolátumok növekedése metanol, illetve fluopiram tartalmú mérgezett agarlemezekken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik)

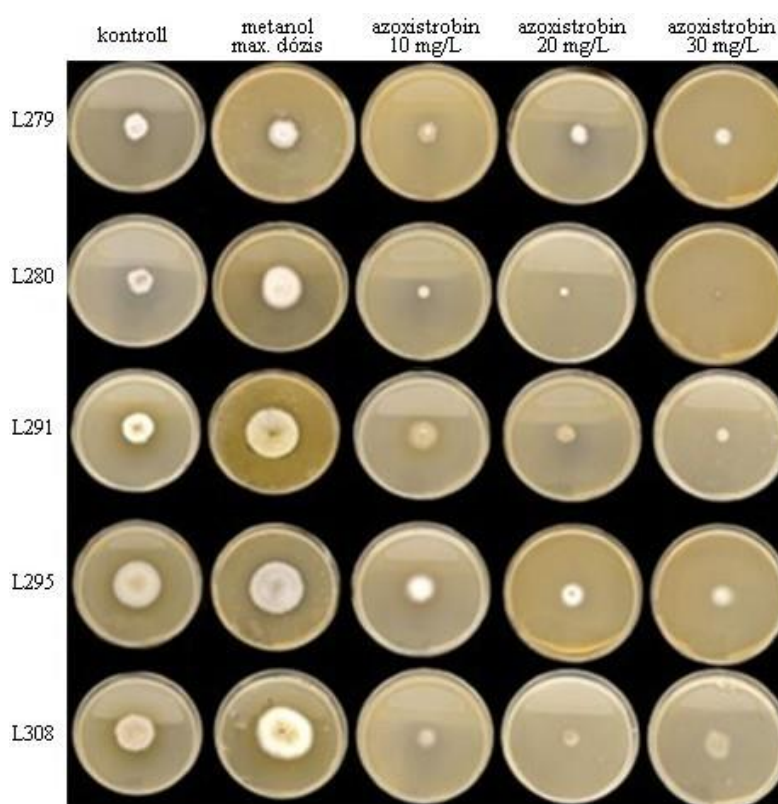
4.6.3. Azoxistrobin

A QoI fungicidek közé tartozó azoxistrobin hatóanyag az izolátumok többségére (az L280-as *P. lingam* izolátum kivételével) egyik vizsgált koncentrációban sem bizonyult gombaölő hatásúnak, csupán gyenge fungisztikus hatást figyeltünk meg (40. és 41. ábra). A két kórokozó esetében a koncentráció tekintetében számottevő különbséget nem tapasztaltunk. A *P. lingam* izolátumok telepátmérője a mérgezett agarlemezekken átlagosan a kontroll 56,16%-át, míg a *P. biglobosus* izolátumok a kontroll tenyészetek átmérőjének 57,6%-át érték el. Az öt izolátum közül egyedül a L280-as *P. lingam* izolátum mutatkozott érzékenynek az azoxistrobin 20 mg/L-es és 30 mg/L-es koncentrációjával szemben. A 20 mg/L-es koncentráció esetében 93,18%-kal, míg a 30 mg/L-es koncentráció esetében 96,21%-kal maradt el a kórokozó növekedése a kontrollhoz képest.



40. ábra Az azoxistrobin hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon

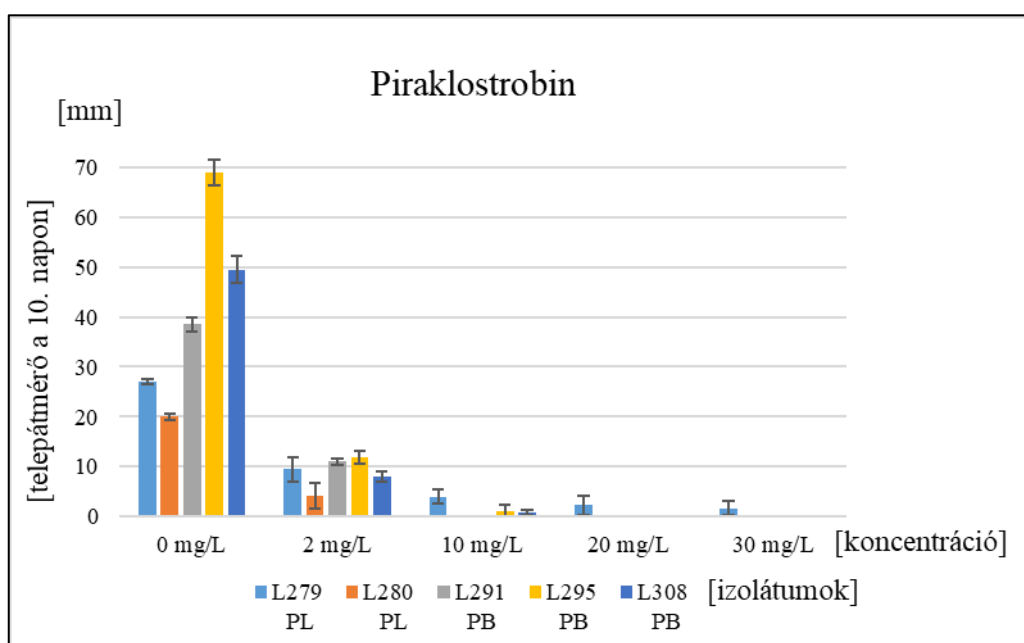
Az oldószerként alkalmazott metanol a méréseink alapján az azoxistrobin esetén sem befolyásolta az izolátumok növekedését a táptalajon (41. ábra).



41. ábra A *Plenodomus* izolátumok növekedése metanol, illetve azoxistrobin tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik)

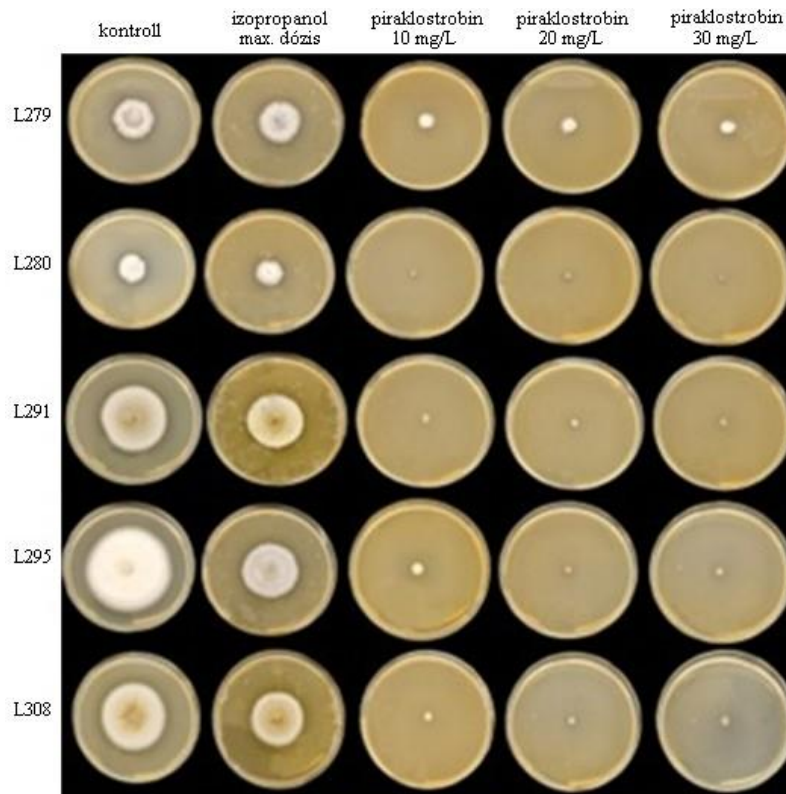
4.6.4. Piraklostrobin

A szintén a QoI fungicidek közé tartozó piraklostrobin hatóanyaggal végzett sorozathígítási vizsgálat során a 10, 20, 30 mg/L-es koncentrációban az összes vizsgált *P. biglobosus*, valamint az L280-as *P. lingam* izolátum esetén is gombaölő hatást figyeltünk meg (42. és 43. ábra). Az L279-es *P. lingam* izolátum a legmagasabb, 30 mg/L-es koncentrációt alkalmazva is növekedésnek indult a mérgezett agarlemezekeken, bár a tenyészetek átmérője a kontrollhoz képest 93,98%-kal kisebb volt. A 2 mg/L-es koncentráció esetében a *P. lingam* izolátumok a kontroll tenyészetek méretéhez képest 71,01%-kal, míg a *P. biglobosus* izolátumok 80,33%-kal kisebb telepátmérőt értek el.



42. ábra A piraklostrobin hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon

Az oldószerként alkalmazott izopropanol a legmagasabb alkalmazott koncentrációban (3000 µl/L) sem befolyásolta a *Plenodomus* izolátumok fejlődését (43. ábra), így a gátló hatás kizárólag a piraklostrobin hatóanyagnak tulajdonítható.

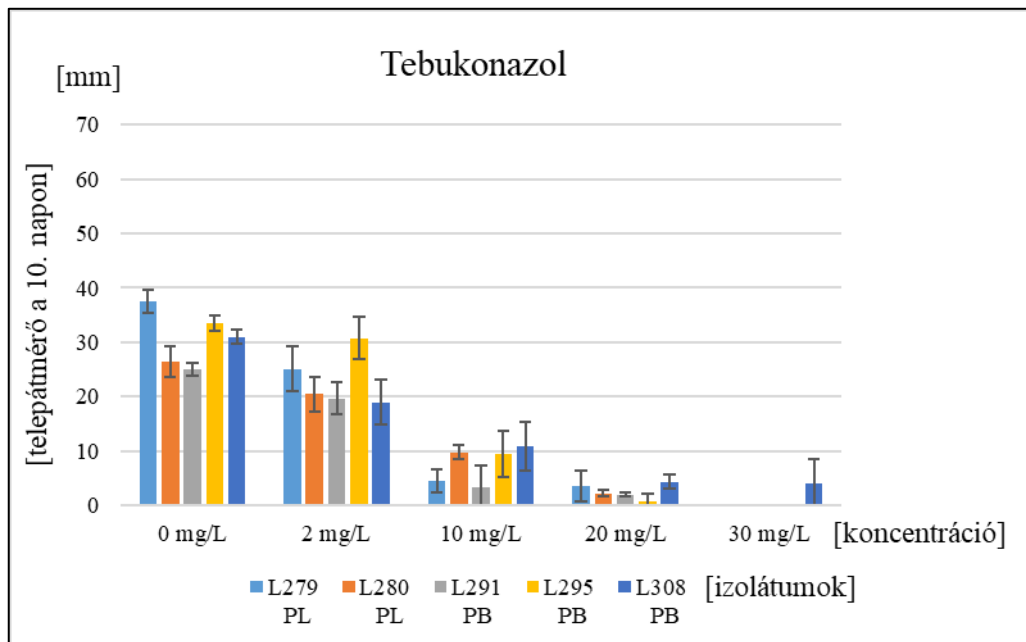


43. ábra A *Plenodomus* izolátumok növekedése izopropanol, illetve piraklostrobin tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik)

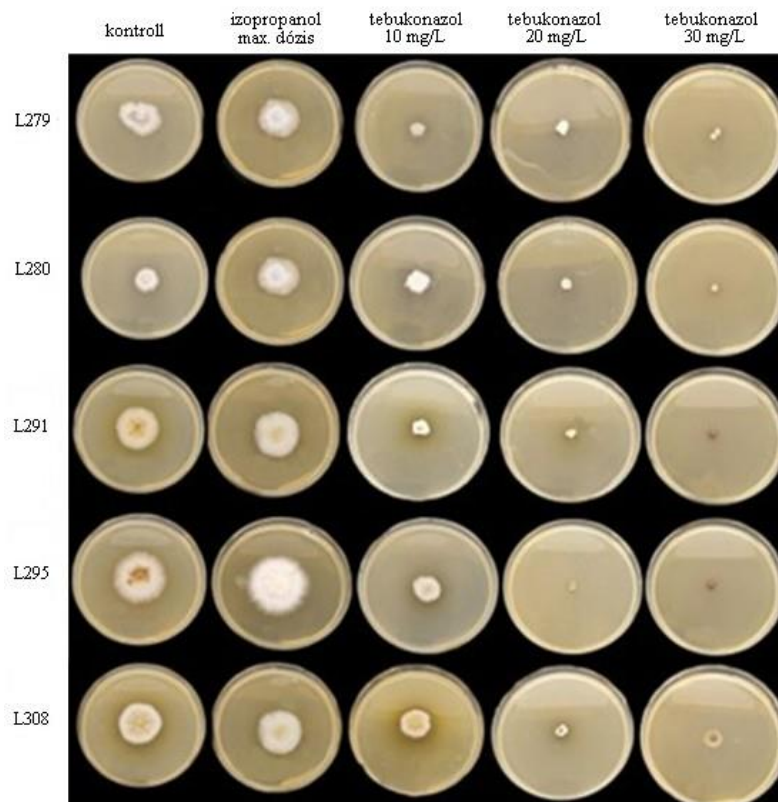
4.6.5. Tebukonazol

A DMI hatástani csoportba tartozó tebukonazol esetében izolátumonként és koncentrációként is eltérő hatékonyságot figyeltünk meg (44. és 45. ábra). A 30 mg/L-es koncentrációban az L279-es és az L280-as *P. lingam* izolátum, az L291-es, valamint az L295-ös *P. biglobosus* izolátum micéliumának növekedését teljes mértékben gátolta a hatóanyag. Az L308-as *P. biglobosus* izolátum még a legmagasabb vizsgált hatóanyagtartalom esetén is növekedésnek indult, azonban a tenyészet mérete a kontrollhoz képest 87,1%-kal kisebb telepátmérőt ért el. A 20 mg/L-es koncentráció esetén a tenyészetek mérete mindkét fajnál közel azonos volt. A *P. lingam* tenyészetek mérete átlagosan 91,02%-kal, míg a *P. biglobosus* tenyészetek mérete 92,04%-kal maradt el a kontrollhoz tenyészetekhez képest. A 10 mg/L-es koncentrációnál a két faj telepátmérőjének átlagai között 4,27%-os különbséget tapasztaltunk. A *P. lingam* tenyészetek átlagosan 77,73%-kal, míg a *P. biglobosus* tenyészetek átlagosan 73,46%-kal maradtak el a kontrolltól. A 2 mg/L-es koncentráció esetén a *P. lingam* izolátumok tenyészetének mérete 28,71%-kal, a *P. biglobosus* tenyészetek mérete 22,5%-kal volt kisebb a kontroll tenyészetek méretéhez képest.

Az oldószerként alkalmazott izopropanol ebben az esetben sem volt hatással a *Plenodomus* izolátumok fejlődésére (45. ábra).



44. ábra A tebukonazol hatékonysága a *Plenodomus* izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon



45. ábra A *Plenodomus* izolátumok növekedése izopropanol, illetve tebukonazol tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik)

4.7. Új tudományos eredmények

- A *Plenodomus biglobosus* első hazai azonosítását (Bagi és mtsai., 2020) követően bizonyítottuk annak országos elterjedését és megállapítottuk, hogy a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* együttesen okozzák az őszi káposztarepcén megjelenő levélfoltosságot és szárrákot.
- Elsőként jellemeztük a hazai *Plenodomus biglobosus* populáció tenyészbélyegeinek változékonyságát.
- Magyarországon elsőként közöltünk szekvencia adatot a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* kórokozók kapcsán: az ITS régió, az LSU régió, a *tub2* gén, az *rpb2* régió és az *act1* gén egyes szakaszairól.
- Elsőként bizonyítottuk Magyarországon a *Plenodomus lingam* ivaros szaporodásának lehetőségét, valamint elsőként közöltünk hazánkból szekvencia adatokat a párosodási típusokat meghatározó gén egyes szakaszairól.
- Hazánkban elsőként végeztünk a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* izolátumok esetében fungicid hatóanyagokkal szembeni *in vitro* érzékenységi vizsgálatokat, melynek során az azoxistrobin esetén csupán fungisztatikus, míg a boszkalid, fluopiram, piraklostrobin és a tebukonazol esetén jelentős fungicid hatást tapasztaltunk.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Egy új kórokozó elterjedtsége

Egy új kórokozó megjelenése vagy egy populáció genetikai összetételének megváltozása megkérdőjelezheti a korábban alkalmazott növényvédelmi stratégiák hatékonyságát. A *P. biglobosus*-t 2018-ban gyűjtött mintákból izolálva 2020-ban írtuk le először Magyarországon őszi káposztarepcén (Bagi és mtsai., 2020). Ha egy országban új kórokozó jelenik meg, akkor következő lépésként a terjedésének feltérképezése segítséget nyújthat a növényvédelmi technológiák és a növénynemesítési stratégiák újragondolásában (Huang és mtsai., 2014). A repce plenodómuszos betegségét okozó *Plenodomus*-fajok elterjedtségével kapcsolatban kevés információ áll rendelkezésre Közép-Európában, így célul tűztük ki, hogy azonosítsuk és jellemezzük a hazai repcetermesztésben előforduló *Plenodomus*-fajokat.

Vizsgálataink során tízből kilenc vármegyében igazoltuk az új kórokozó, a *Plenodomus biglobosus* jelenlétét. Az egyes évek mintaelemszáma eltérő, melynek okai elsősorban a szélsőséges csapadékeloszlásban keresendők. A 2019-es év száraz időjárása egyáltalán nem kedvezett a kórfolyamatnak és a fertőzés kialakulásának. Eddigi eredményeink arra engednek következtetni, hogy a *P. biglobosus* vélhetően az egész országban széles körben elterjedt, azonban ennek teljeskörű bizonyításához a kimaradt vármegyékből is további nagy elemszámú mintavétel lenne szükséges. A kórokozók jelenléte és az általuk megbetegített növények gyakorisága alapján azonban egyértelműen kijelenthető, hogy a *Plenodomus biglobosus* sokkal elterjedtebb Magyarországon, mint azt korábban sejtettük.

Tünetek, morfológiai- és tenyészbélyegek

A *P. lingam*-ra és a *P. biglobosus*-ra jellemző tünetekről a szakirodalomban nemcsak egymással megegyező, hanem egymásnak ellentmondó leírások is találhatók. Egyes irodalmi adatok alapján a két kórokozó tipikus tünetei rendkívül hasonlóak (Brun és mtsai., 1997), míg mások megfigyelései szerint azok egymástól akár szemrevételezéssel is elkülöníthetők. Habár Johnson és Lewis (1994) a *P. lingam*-hoz képest a *P. biglobosus* által okozott levélfoltokat általánosságban kisebbnek és a bennük lévő piknidiumokat gyengébben sporulálónak találták, ezeket a tulajdonságokat a levélfoltok kora is befolyásolhatja, emiatt ez a módszer megbízhatatlannak bizonyult. Az általunk megfigyelt levéltünetek (17/A ábra) megegyeznek a Karolewski és mtsai. (2007) által leírtakkal és egyben megállapítható, hogy a két kórokozót a levéltünetek alapján nem lehet megbízhatóan elkülöníteni egymástól. A vizsgálatok során a szárazon megfigyelt tünetek (17/B ábra) megegyeztek a Liu és mtsai. (2014) által leírtakkal.

A *P. lingam* inkább a szár gyökérműkhöz közeli régiójában, míg a *P. biglobosus* inkább a szár felsőbb részén okoz hasonló, nekrotizálódó foltokat (Sprague és mtsai., 2007). Mintagyűjtésünk kezdeti szakaszában a növényeknek csupán a talajhoz közeli szárrészét mintáztuk, amely eredményeképp eleinte kizárólag a *P. lingam* kórokozót sikerült izolálnunk.

A *P. biglobosus* bekerülésének időpontját eredményeink alapján megbecsülni nem lehetséges, de széleskörű elterjedtsége arra utal, hogy évek, sőt akár évtizedek óta jelen lehet az országban. A két kórokozó többnyire együtt jelenik meg a gazdanövényeken, valamint rendkívül hasonló tüneteket okoznak, ennek következményeképp lehetséges, hogy hosszú időn át nem derülhetett fény hazánkban a *P. biglobosus* jelenlétére.

A kórokozók morfológiai bélyegei bizonyos tulajdonságokban hasonlóak. A píknióiumokat és a konióiumokat tekintve a megfigyeléseink megegyeznek Shoemaker és Brun (2001), valamint Ghanbarnia és mtsai. (2011) által leírtakkal. Ahogy a 21. ábrán is látható, a *P. lingam* és a *P. biglobosus* konióiumai nagyon hasonlóak, 600×-os nagyításon sem különíthetők el méretük, vagy alakjuk alapján. Vizsgálatunk során a korábban dokumentált konióiumméretek visszakövetése és azonosítása izolátum szinten csupán a molekuláris módszerrel történő fajszintű azonosítást követően vált lehetővé.

A fentiekben ismertetett tulajdonságokhoz képest a tenyészbélyegek alapján történő meghatározás megbízhatóbbnak bizonyult. A *P. lingam* tenyészbélyegei PDA táptalajon megegyeztek Mitrović és mtsai. (2016) által leírtakkal (20. ábra), akik öt nap után szabálytalan kör alakú, csipkézett szélű tenyészeteket figyeltek meg. A *P. biglobosus* esetében sárgás-barnás pigmentekről számoltak be a 15 napos tenyészetek micéliumánál. A sárga színű színanyag termelődése és kiválása vizsgálataink során azonban nemcsak a tenyészetekben (21. ábra), hanem sok esetben a tenyészetek körül, a PDA táptalajban is megfigyelhető volt. Calvert és mtsai. (1949) vizsgálataik során különböző izolátumokat írtak le, amelyek tenyészetei a píknióiumok létrehozásában különböztek. Vizsgálataink során a tenyészetekben píknióiumok képződését nem tapasztaltuk. Egyes izolátumoknál a többitől eltérő, atipikus tenyészbélyegeket figyeltünk meg, melyek a multiplex PCR alapján szintén a *P. biglobosus* fajhoz tartoztak. A szakirodalom alapján a két kórokozó egymástól való elkülönítése és fajszintű meghatározása nagy biztonsággal kizárólag molekuláris módszerekkel lehetséges (Rouxel és mtsai. 2004), melyet eredményeinkkel mi is alátámasztottuk.

Molekuláris vizsgálatok

A Liu és mtsai. (2006) által kidolgozott molekuláris azonosítási módszer megbízhatóan működött a hazai *Plenodomus* izolátumok fajsztintú elkülönítésére is. A szakirodalmi adatoknak megfelelően, a *P. lingam* izolátumok esetében 331 bp, míg a *P. biglobosus* esetében 444 bp hosszúságú termék keletkezett. A multiplex PCR során alkalmazott primerek (LmacF, LbigF, LmacR) megbízhatóan bizonyultak, így sikeresen adaptáltuk Liu és mtsai. (2006) módszerét a hazai izolátumokra. A PCR-termékek szekvenciáját 4 *P. lingam* és 3 *P. biglobosus* izolátum esetében meghatároztattuk, majd elemeztük, így egyértelműen igazoltuk az új *P. biglobosus* faj megjelenését Magyarországon.

Elsőként mutattuk ki hazánkban a *P. lingam* mindkét párosodási típusának jelenlétét, így bizonyítottuk a *P. lingam* ivaros szaporodásának lehetőségét Magyarországon Cozijnsen és Howlett (2003) módszerét alkalmazva. A *P. biglobosus* izolátumok esetében az alkalmazott primerekkel nem keletkeztek termékek a PCR során, így a kórokozó párosodási típusainak további vizsgálatához új primerek tervezése szükséges. Az ivaros úton történő szaporodás fő célja a növénypatogén gombák esetében is, hogy a faj fennmaradása szempontjából előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező utód jöjjön létre (Hörandl, 2009). Az ivaros szaporodás lehetővé teszi a kórokozó számára a gyorsabb alkalmazkodóképességet a gazdaszervezethez (Parlevliet, 2002), hogy képes legyen áttörni annak kvalitatív rezisztenciáját (McDonald és Linde, 2002), vagy lehetőséget nyújt a peszticidekkel szembeni ellenálló képesség kialakítására (Kema és mtsai., 2018).

A *P. lingam* és a *P. biglobosus* közeli rokonságban álló, heterotallikus fajok, azonban a két faj közötti (interspecifikus) keresztezések Shoemaker és Brun (2001) megfigyelései alapján sikertelenek voltak.

Az *AvrLm4* gén vizsgálata során sikeresen adaptáltuk Van de Wouw és Howlett (2012) módszerét a hazai izolátumokra. A vizsgált *P. lingam* izolátumok esetén 1127 bp hosszúságú termék keletkezett a PCR eredményeképp. Az *AvrLm4* génnel rendelkező *P. lingam* izolátumok különböző hibridek fertőzött növényi részeiről származtak, amiből arra következtethetünk, hogy a hibridek ellenállóképessége nem nyújt megfelelő védelmet az *AvrLm4* génnel rendelkező *P. lingam* izolátumokkal szemben. A *P. lingam* populáció genetikai összetétele folyamatosan változik. Ennek következményeképp a kórokozó egyes izolátumai képesek megfertőzni a rezisztens hibrideket, ahogy ezt már korábban megfigyelték Franciaországban (Brun és mtsai., 2000), Ausztráliában (Sprague és mtsai., 2007) és Kanadában is (Zhang és mtsai., 2017).

Filogenetikai analízis

A növényi kórokozók genetikai variabilitásának feltérképezése és nyomon követése hozzájárulhat jobb növényvédelmi stratégiák kialakításához (Huang és mtsai., 2014). Molekuláris vizsgálataink során a teljes ITS1-5,8S-ITS2 szakasz vizsgálatához Mitrović és mtsai. (2016) protokollját követtük, amely Liu és mtsai. (2006) által fejlesztett módszer mellett megbízhatóan működik a *P. lingam* és a *P. biglobosus* fajsztípus meghatározására, egymástól való elkülönítésére. Mitrović és mtsai. (2016) a riboszomális DNS 18S-28S szakaszát vizsgálták. Az általuk használt primerekkel a hazai *P. lingam* izolátumok esetén is 554 bp, míg a hazai *P. biglobosus* izolátumok esetén 582 bp hosszúságú termék keletkezett (28. ábra). A riboszomális DNS ITS régióinak vizsgálata nemcsak a két kórokozó fajsztípus elkülönítésére, hanem az egyes fajokon belüli szubkládok meghatározására, valamint azok filogenetikai analízisére is alkalmas (Zou és mtsai., 2019). A két *Plenodomus*-fajt illetően nem állt rendelkezésünkre információ arról, hogy milyen szubkládok terjedtek el hazánkban, emiatt Zou és mtsai. (2019) nyomán az ITS régiókat a vizsgált izolátumok szubklád szinten történő azonosításához, valamint azok filogenetikai analíziséhez is felhasználtuk.

A hazai *P. lingam* izolátumok molekuláris szintű elemzése után egyértelművé vált, hogy a vizsgált izolátumok kivétel nélkül a 'brassicae' szubkládhoz tartoznak (33. ábra), a tenyészetek morfológiai változatosságának ellenére egymással szoros rokonsági viszonyt mutatnak. A 'brassicae' szubklád, amely számos *Brassica*-fajt képes megfertőzni (Mendes-Pereira és mtsai., 2003), világszerte elterjedt, míg a *P. lingam* 'lepidii' szubkládot ezidáig kizárólag *Lepidium* fajokról Kanadában izolálták (Mendes-Pereira és mtsai., 2003).

Hasonlóképp, valamennyi vizsgált *P. biglobosus* izolátumunk a *P. biglobosus* 'brassicae' szubkládhoz tartozott (33. ábra). A 'brassicae' szubklád, amely a *Brassica* nemzetség fajait fertőzi (Mendes-Pereira és mtsai., 2003), a legszélesebb körben elterjedt az összes *P. biglobosus* szubklád közül (Liu és mtsai., 2014). A *P. biglobosus* 'canadensis' áll a legközelebbi rokoni kapcsolatban a *P. biglobosus* 'brassicae'-vel. Ezt a szubkládot ezidáig őszi káposztarepcéről és kínai mustárról izolálták (Van de Wouw és mtsai., 2008; Dilmaghani és mtsai., 2009). Egyes nézetek szerint az Egyesült Királyságban a *P. biglobosus* 'canadensis' megjelenése felelős a *P. biglobosus* jelentőségének növekedéséért (King és West, 2022), amelynek megjelenése a jövőben Magyarországon sem zárható ki. A *P. biglobosus* 'australensis' (Voigt és mtsai., 2005), 'occiaustralensis' (Vincenot és mtsai., 2008), valamint 'americensis' (Zou és mtsai., 2019) szubkládok szintén megfertőzhetik a *Brassica*-fajokat, ezáltal az őszi káposztarepcét is, míg más

szubkládokat (Mendes-Pereira és mtsai., 2003), – a *Thlaspi arvense*-ről izolált 'thlaspi'-t és az *Erysimum*-fajról ismert 'erysimii'-t – ezidáig káposztafélékről nem izolálták.

Ahogy más kórokozók esetében is, úgy a *Plenodomus*-fajok taxonómiai vizsgálatai során is különböző genomi régiókat vizsgálnak a fajok és a szubkládok filogenetikai kapcsolatainak felderítésére (Zou és mtsai., 2019). A növénypatogén gombák körében legáltalánosabban vizsgált régió a riboszomális DNS ITS régiója (Capote és mtsai., 2012), amelyet mi is bevontunk a vizsgálatainkba a hazai *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumok esetében. Wijayawardene és mtsai. (2014) többek között az LSU és az *rpb2* régió szekvenciáit használták a *Dothideomycetes* osztályba tartozó 415 taxon filogenetikai analiziséhez. Az LSU régióra vonatkozóan Chen és mtsai. (2015) módszerét sikeresen adaptáltuk a hazai *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumokra. Az *rpb2* régió vizsgálatához saját primereket terveztünk, melyek megbízhatóan működtek a *P. lingam* és a *P. biglobosus* esetén. De Gruyter és mtsai. (2012) a *Leptosphaeria doliolum* filogenetikai vizsgálatához többek között nemcsak az LSU és az ITS, hanem a β -tubulin régiót is felhasználták. Hozzájuk hasonlóan a „multilocus”-os analizishez Chen és mtsai. (2015) módszerét követve a *tub2* gént mi is vizsgáltuk.

A vizsgált *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumok a négy genomi régió alapján a törzsfán megbízhatóan elkülönültek egymástól (34. ábra). Az azonos régiók szekvenciái a két faj között is nagymértékben hasonlóak voltak egymáshoz, fajon belül pedig alig mutattak változékonyságot. Egy kórokozó populációjának genetikai összetételében megjelenő hasonlóság feltételezhetően jelentheti a környezethez való alkalmazkodási képességének csökkenését, amely fontos információt nyújthat a fungicid-rezisztencia kialakulásának kockázatáról.

Az azonos fajhoz tartozó izolátumok alacsony variabilitását az *act1* gén vizsgálata során kapott eredményeink is alátámasztják, melyeket egy különálló törzsfán ábrázoltunk (35. ábra). Voigt és mtsai. (2005) a *P. lingam* és a *P. biglobosus*, valamint egyéb, *Dothideomycetes* osztályba tartozó fajok közötti filogenetikai kapcsolatot vizsgálták többek között az aktin gén szekvenciáinak felhasználásával. Az általuk alkalmazott módszert sikeresen adaptáltuk a hazai *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumokra.

Fungicid hatóanyagok tesztelése

A *P. biglobosus* kórokozó kapcsán elsőként végeztünk hazánkban fungicid hatóanyagokkal *in vitro* vizsgálatokat. Ezen vizsgálatok alapját képezhetik egy szélesebb körű monitoringnak, amely a növényvédelmi technológia optimalizálására irányul. Az izolátumok fungicid érzékenységének megfigyelésére a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal által is használt és elfogadott mérgezett agarlemez vizsgálati módszert alkalmaztuk (Aponyiné és mtsai., 2004).

Aponyiné és mtsai. (2004) szerint ez a módszer alkalmas a fungicid micéliumnövekedést, valamint konídiumcsírázást befolyásoló hatásának elbírálására: ún. screening vizsgálatra, valamint *in vitro* tenyésztető kórokozók fungicid érzékenységi (rezisztencia) szintjének elbírálására. A módszer alapja, hogy a vizsgálandó készítménnyel, vagy hatóanyaggal mérgezett agarlemezt készítünk, melyen a micéliumnövekedést és a konídiumok csírázását figyeljük meg. Vizsgálataink során tiszta hatóanyagokkal dolgoztunk, ezáltal kizárva az egyéb adjuvánsok hatását. Píknídium képződést nem tapasztaltunk táptalajon, így kizárólag a micélium növekedését értékeltük.

Az SDHI csoportba tartozó boszkalid hatóanyag tesztelésénél kapott eredményeink egybevágóak Fajemisin és mtsai. (2022b) eredményeivel. Fajemisin és mtsai. (2022b) 41 *P. lingam* izolátum esetén tesztelték a hatóanyagot. Vizsgálatuk során a legmagasabb koncentráció 10 µg/mL volt, ennél a koncentrációnál mind a 41 izolátum micéliumnövekedése teljes mértékben gátolt volt. Eredményeik alapján a csehországi izolátumok esetében a rezisztencia kialakulását nem feltételezték. A saját vizsgálataink során hasonlót tapasztaltunk mind a *P. lingam*, mind a *P. biglobosus* esetén. Az általunk tesztelt izolátumoknál csupán a legalacsonyabb, 2 mg/L-es (=2 µg/mL) koncentráció esetén tapasztaltunk micéliumnövekedést.

Az általunk vizsgált öt hatóanyagot azonos koncentrációkban teszteltük, melyek közül a legkiegyenlítettebb hatása a boszkalidnak volt. 10, 20 és 30 mg/L-es koncentrációban is fungicid hatással rendelkezett, a micélium növekedése teljes mértékben gátolt volt a csehországi (Fajemisin és mtsai., 2022b) megfigyelésekhez hasonlóan valamennyi izolátumunk esetén. Eredményeink alapján mind a *P. lingam*, mind a *P. biglobosus* érzékenynek bizonyult a boszkaliddal szemben, azonban ennek alátámasztására szélesebb körű monitoring lenne szükséges.

A szintén SDHI csoportba tartozó fluopiram *P. lingam* kórokozóra gyakorolt hatásáról kevés információ áll rendelkezésünkre a szakirodalom alapján. Van de Wouw és mtsai. (2021) ezen hatóanyagot tartalmazó készítménnyel végeztek vizsgálatot, melynek során egyes *P. lingam* izolátumok esetében az érzékenység csökkenését figyelték meg. Ezzel szemben az általunk vizsgált *P. lingam* izolátumok érzékenynek tekinthetők a fluopiram hatóanyagra, mert még 2 mg/L-es koncentrációban is átlagosan 69,47%-os csökkenést figyeltünk meg a kontroll tenyészetek (0 mg/L) méretéhez képest. Ehhez hasonlóan a *P. biglobosus* izolátumaink is érzékenynek tekinthetők, ugyanis 2 mg/L-es koncentráció esetén átlagosan 52,08%-os csökkenést tapasztaltunk.

A strobilurinok közé tartozó azoxistrobin esetén Mondal és mtsai. (2005) *Alternaria alternata* kórokozó tenyészeivel végeztek vizsgálatot *in vitro*. 100 µg/ml-es koncentráció esetén is kevesebb, mint 50%-os csökkenést tapasztaltak az izolátumok micéliumnövekedésében a

kontrollhoz képest (0 µg/ml). Ennek oka egyes megfigyelések szerint a növénypatogén gombák biológiai folyamataiban keresendők, melyek *in vivo* és *in vitro* különbözhetnek.

Az azoxistrobinnal végzett vizsgálatunk során a kontrollhoz képest a *P. lingam* izolátumok esetében átlagosan 43,84%-kal, míg a *P. biglobosus* esetében 42,4%-kal kisebb átmérőjű tenyészeteket mértünk, csupán fungisztatikus hatást figyeltünk meg a két kórokozó esetében. Eredményeink egybevágnak a korábbi megfigyelésekkel. Feltehetőleg az azoxistrobinnal végzett *in vitro* tesztek a *P. lingam* és a *P. biglobosus* esetében nem összevethetők a növényen belül kifejtett gombaölő hatással, így ennek ellenőrzésére *in vivo* kísérletek szükségesek.

A strobilurinok esetén Mondal és mtsai. (2005) megfigyelései alapján a különböző növénypatogén gombák ellenálló izolátumai akár több, mint 10 mg/L-es koncentrációban is képesek tolerálni az adott hatóanyagot. Ezek alapján Fraser és mtsai. (2016) által Albertában (Kanadában) tesztelt 117 *P. lingam* izolátumot érzékenynek találták a piraklostrobin hatóanyagra, mert 6,25 mg/L-es koncentráció esetében a kontroll tenyészetek (0 mg/L) méretéhez képest minden tenyészet méreténél legalább 50%-os csökkenést figyeltek meg a 10. napon. Eredményeiket a saját eredményeinkkel összevetve kijelenthető, hogy a hazai *P. lingam* izolátumok is érzékenyek a piraklostrobinra, hiszen vizsgálatunk során már a 2 mg/L-es koncentráció esetén átlagosan 72%-kal kisebb telepátmérőt mértünk a 10. napon. A *P. biglobosus* izolátumaink is érzékenyek voltak a piraklostrobinra, a kontroll tenyészetekhez képest átlagosan 79%-kal kisebb telepátmérőt mértünk a 2 mg/L-es koncentráció esetén a 10. napon.

A DMI fungicidok folyamatos alkalmazása más növénypatogén gombák populációihoz hasonlóan (Brent és Hollomon, 2007) a *P. lingam* esetében is könnyen fungicid-rezisztencia kialakulását eredményezheti (Van de Wouw és mtsai., 2017; Yang és mtsai., 2020; Fajemisin és mtsai., 2022a). Ebbe a csoportba tartoznak a triazolok is, melyeket a növénypatogén gombák elleni védekezésen kívül a regulátorozásban betöltött szerepe miatt gyakran alkalmaznak repcetermesztésben (Berry és Spink, 2009).

Eckert és mtsai. (2010) vizsgálatai alapján a tebukonazol hatóanyagra a *P. lingam* izolátumok érzékenyebbnek bizonyultak a *P. biglobosus* izolátumoknál. A hatóanyag a *P. lingam* izolátumok esetében a *P. biglobosus* izolátumokhoz képest alacsonyabb koncentrációban gátolta a micélium növekedését. A micélium növekedését a kontrollhoz (0 mg/L) képest átlagosan 50%-kal a *P. lingam* esetében 0,67 µg/ml-es koncentrációban, a *P. biglobosus* esetében csupán 1,45 µg/ml-es koncentrációban csökkentette. Ezzel szemben a mi vizsgálatunk során a 2 mg/L-es (=2 µg/ml) koncentrációban a *P. lingam* izolátumok micéliumnövekedése a kontrollhoz képest csupán 28,71%-kal, a *P. biglobosus* izolátumoké pedig csupán 22,5%-kal csökkent. A 10 mg/L-es koncentráció esetén a *P. lingam* izolátumok micéliumnövekedése a kontrollhoz képest

77,73%-kal, a *P. biglobosus* izolátumoké pedig 73,46%-kal csökkent. Így saját kísérletünk alapján az 50%-os gátlás eléréséhez 2 mg/L és 10 mg/L közötti koncentráció lenne szükséges. Így előzetes tesztünk alapján, a hazai *P. lingam* és *P. biglobosus* izolátumok kevésbé tűnnek érzékenynek a tebukonazol hatóanyagra, mint az Egyesült Királyságból származó izolátumok. Eckert és mtsai. (2010) vizsgálatuk során 2003-ban gyűjtött izolátumokat, míg mi 2021-ben gyűjtött izolátumokat használtunk fel. Az eltérést akár az is okozhatja, hogy a két vizsgálat között a gazdanövényeket sokszor kezelhették tebukonazol hatóanyagot tartalmazó készítményekkel, így a kórokozók azóta ellenállóbbá válhattak a hatóanyaggal szemben.

A tiszta hatóanyagok bevonásával végzett analízisünk fontos információkat biztosít a *P. lingam* és a *P. biglobosus* izolátumokról Magyarországon, amely nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a jövőben bekövetkező érzékenységbeli változásokat nyomon követhessük. Eredményeink alátámasztásához több izolátum bevonásával ugyanezen vizsgálatok elvégzésére lenne szükség, hogy biztosabb következtetéseket lehessen levonni a magyarországi *Plenodomus* populáció fungicid érzékenységének tekintetében. A fungicid-rezisztencia kialakulásának megakadályozását érintő stratégiák alapján különböző hatásmechanizmussal és hatáshellyel rendelkező fungicideket együttesen és/vagy váltogatva lenne érdemes továbbra is alkalmazni (Staub, 1991; Brent és Hollomon, 2007).

Konklúzió

A plenodómuszos betegség kórokozói feltehetően a jövőben is a repcetermesztés egyik legjelentősebb növénykórtani problémáját fogják jelenteni. Széleskörű monitoring, valamint számos vizsgálat lenne szükséges ahhoz, hogy a kórokozók által előidézhető jövőbeli óriási gazdasági veszteséget megelőzzük. Az őszi káposztarepce növényeken jelenleg mindkét kórokozó esetében csak a 'brassicae' szubklád populációi vannak jelen hazánkban. A globalizáció eredményeképp azonban fennáll a kockázata annak, hogy további szubkládok jelenjenek meg őszi káposztarepcén mind Magyarországon, mind a világ más pontjain. Azonban jelen eredményeink arra engednek következtetni, hogy a plenodómuszos betegséget okozó kórokozók jelentősége a közeljövőben nem fog számottevően változni hazánkban.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az őszi káposztarepce napjaink egyik legfontosabb szántóföldi kultúrnövénye. Jól ismert betegségei közé tartozik a *Plenodomus lingam* és a *Plenodomus biglobosus* által okozott feketelábúság, vagy másnéven szárrák. A két kórokozó gazdaságilag jelentős, súlyos termésveszteséget idézhet elő. A hazai szakirodalomban a betegséget korábban a *P. lingam*-nak tulajdonították, azonban eredményeink megerősítették a *P. biglobosus* jelenlétét és széleskörű elterjedését az országban.

2017 és 2021 között Magyarország 10 vármegyéjének 29 helyszínéről 502, a plenodómuszos betegség jellemző tüneteit mutató repcemintát gyűjtöttünk. A kórokozókat rutinszerűen izoláltuk és tenyésztettük PDA táptalajon. A gombák patogenitását megerősítettük. A kórokozók által leveleken és szárazon előidézett tüneteket, illetve a piknidiumaik és a konídiumaik morfológiáját jellemeztük, melyek rendkívül hasonlóak egymáshoz, emiatt klasszikus mikológiai módszerekkel a két kórokozó nem különíthető el egymástól. A tenyészbélyegek vizsgálatakor fajon belüli különbségeket is megfigyeltünk, az izolátumokat a tenyészbélyegek alapján csoportosítottuk.

A kórokozók megbízható fajsztintű azonosításához fajspecifikus primereket alkalmaztunk multiplex PCR során. Tudomásunk szerint a *P. biglobosus*-t először azonosítottuk Magyarországon őszi káposztarepcén. Megállapítottuk, hogy a vizsgált 308 izolátum közül 158 (51,3%) a *P. lingam*, 150 (48,7%) a *P. biglobosus* fajhoz tartozott. A kórokozók előfordulása és gyakorisága arra enged következtetni, hogy a *P. biglobosus* elterjedtebb Magyarországon, mint korábban gondoltuk.

A fajsztintű azonosítás mellett molekuláris vizsgálatokat is végeztünk. A *P. lingam* izolátumok esetében mindkét párosodási típus jelenlétét igazoltuk, így molekuláris vizsgálattal is alátámasztottuk, hogy a *P. lingam* esetében hazai körülmények között lehetséges az ivaros szaporodás. A *Plenodomus* izolátumok *AvrLm4* génjének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a vizsgálatba vont repce hibridek ellenállóképessége nem nyújt megfelelő védelmet a *P. lingam* *AvrLm4* génnel rendelkező törzsével szemben.

Az ITS1-5,8S-ITS2 szekvenciákon, a részleges LSU szekvenciákon, a részleges *tub2* gén szekvenciákon és a részleges *rpb2* régió szekvenciáin alapuló filogenetikai analízis eredményei alapján megállapítottunk, hogy a vizsgált *Plenodomus* izolátumok a *P. lingam* 'brassicae' és a *P. biglobosus* 'brassicae' szubkládhoz tartoznak. Emellett a multi-lókusz analízis fajon belül alacsony genetikai változékonyságot eredményezett. Az azonos fajhoz tartozó izolátumok genetikai hasonlóságát az *act1* génre vonatkozó eredményeink is alátámasztották. A *P. lingam* és

a *P. biglobosus* génjeiről és régióiról elsőként közöltünk magyarországi szekvencia adatokat. A globalizáció következményeképp fennáll a veszélye annak, hogy Magyarországon a repcén további szubkládok jelenjenek meg. Emellett azonban azt is feltételezni lehet, hogy a közeljövőben a plenodómuszos betegség kórokozójának jelentősége nem fog számottevően változni.

Az izolátumok fungicid érzékenységének vizsgálatára 5 hatóanyagot (boszkalid, fluopiram, azoxistrobin, piraklostrobin és tebukonazol) választottunk ki. Eredményeink arra utalnak, hogy a két faj egyes fungicidekre eltérően reagál, valamint az egyes izolátumok között is lehetnek olyan különbségek, amelyek előrevetíthetik a rezisztencia kialakulásának kockázatát a magyarországi *Plenodomus* populációkban.

Valószínűsíthető, hogy a plenodómuszos betegség kórokozójával a jövőben is számolniuk kell a termesztőknek, azonban eredményeink arra engednek következtetni, hogy a kórokozók jelentősége a közeljövőben nem fog számottevően változni hazánkban.

7. SUMMARY

Oilseed rape is one of the most important agricultural plants nowadays. Well-known diseases include blackleg or stem canker, caused by *Plenodomus lingam* and *Plenodomus biglobosus*. The two pathogens can cause economically significant, severe yield losses. In the Hungarian literature, the disease was previously attributed to *P. lingam*, but our results have confirmed the presence and widespread distribution of *P. biglobosus* in the country.

Between 2017 and 2021, 502 oilseed rape samples showing typical symptoms of blackleg were collected from 29 locations in 10 counties of Hungary. Pathogens were routinely isolated and cultured on potato dextrose agar medium. The pathogenicity of the fungi has been confirmed. The usual symptoms of the pathogens on infected leaves and stems, the morphology of pycnidia and conidia were observed. The symptoms and morphology of the two pathogens are too similar to be distinguished by classical mycological methods. We also observed some differences within species when examining fungal colonies on PDA. Isolates were grouped according to colony morphology.

Multiplex PCR with specific primers for *P. lingam* and *P. biglobosus* was used for reliable species-level identification of the pathogens. To our knowledge, *P. biglobosus* was first identified from oilseed rape in Hungary. A total of 158 out of 308 studied isolates were identified as *P. lingam* (51.3%) while *P. biglobosus* was detected in case of 150 isolates (48.7%). The prevalence and frequency of the pathogens suggest that *P. biglobosus* is more widespread in Hungary than previously thought.

In addition to species-level identification, other molecular tests were also carried out. Both mating types were detected in *P. lingam* isolates. It was confirmed that sexual reproduction is possible in *P. lingam* in Hungary. Analysis of the *AvrLm4* gene in *Plenodomus* isolates showed that the resistance of the examined oilseed rape hybrids does not provide adequate protection against the strain of *P. lingam* with *AvrLm4* gene.

Phylogenetic analysis based on ITS1-5.8S-ITS2 sequences, partial LSU sequences, partial *tub2* gene sequences and partial *rpb2* region sequences showed that the investigated *Plenodomus* isolates can be classified into the *P. lingam* ‘brassicae’ and *P. biglobosus* ‘brassicae’ subclades. In addition, multi-locus analysis revealed low genetic diversity within the species. The genetic similarity of isolates from the same species is supported by our results on the *act1* gene. The first sequence data on the genes and regions of *P. lingam* and *P. biglobosus* in Hungary are provided. Due to globalisation, there is a risk that additional subclades will emerge on oilseed rape in

Hungary, but in the meantime it can be concluded that the importance of blackleg pathogens will not change in the near future.

To test the fungicidal sensitivity of the isolates, 5 active ingredients (boscalid, fluopyram, azoxistrobin, piraklostrobin and tebuconazole) were selected. Our results suggest that species respond differently to certain fungicides and that there may also be differences between isolates, which could predict the risk of resistance in Hungarian *Plenodomus* populations.

It is likely that growers will still have to contend with the blackleg disease in the future, but our results suggest that the importance of the pathogens will not change significantly in the near future in our country.

8. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

1. ÁBRAHÁM R., ÉRSEK T., KUROLI G., NÉMETH L., REISINGER P. 2011. Olajos magvú növények védelme. *Növényvédelem* 138-147.
2. ALLENDER, C. J., KING, G. J. 2010. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology* 10 (54): 1-9.
3. AL-SHEHBAZ, I. A., BEILSTEIN, M. A., KELLOGG, E. A. 2006. Systematics and phylogeny of the *Brassicaceae* (*Cruciferae*): an overview. *Plant Systematics and Evolution* 259: 89-120.
4. ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410.
5. ANDERT, S., ZIESEMER, A., ZHANG, H. 2021. Farmers' perspectives of future management of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A case study from north-eastern Germany. *European Journal of Agronomy* 130: 126350.
6. ANSAN-MELAYAH, D., BALESSENT, M. H., DELOURME, R., PILET, M. L., TANGUY, X., RENARD, M., ROUXEL, T. 1998. Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breeding* 117 (4): 373-378.
7. APONYINÉ, G. I., KIS, GY., MAGYARNÉ, L. N. 2004. Fungicid és baktericid vizsgálati módszertan. FVM Növény- és Talajvédelmi Főosztálya, Budapest 53-55.
8. ARTHEY, T. 2020. Challenges and perspectives in global rapeseed production 1-47.
9. AUBERTOT, J. N., PINOCHET, X., DORÉ, T. 2004. The effects of sowing date and nitrogen availability during vegetative stages on *Leptosphaeria maculans* development on winter oilseed rape. *Crop Protection* 23 (7): 635-645.
10. AVENOT, H. F., MICHAILIDES, T. J. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29 (7): 643-651.
11. BADAWEY, H. M. A., HOPPE, H. H., KOCK, E. 1991. Differential reactions between the genus *Brassica* and aggressive single spore isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Journal of Phytopathology* 131 (2): 109-119.

12. BAGI B., NAGY CS., TÓTH A., PALKOVICS L., PETRÓCZY M. 2020. *Plenodomus biglobosus* on oilseed rape in Hungary. *Phytopathologia Mediterranea* 59 (2): 345-351.
13. BALESSENT, M. H., GALL, C., ROBIN, P., ROUXEL T. 1992. Intraspecific variation in soluble mycelial protein and esterase patterns of *Leptosphaeria maculans* French isolates. *Mycological Research* 96 (8): 677-684.
14. BALESSENT, M. H., ATTARD, A., ANSAN-MELAYAH, D., DELOURMÉ, R., RENARD, M., ROUXEL, T. 2001. Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 91 (1): 70-76.
15. BALESSENT, M. H., ATTARD, A., KUHN, M. L., ROUXEL, T. 2002. New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 92 (10): 1122-1133.
16. BALESSENT, M. H., JĘDRYCZKA, M., JAIN, L., MENDES-PEREIRA, E., BERTRANDY, J., ROUXEL, T. 1998. Conidia as substrate for internal transcribed spacer-based PCR identification of components of the *Leptosphaeria maculans* species complex. *Phytopathology* 88 (11): 1210-1217.
17. BALODIS, O., GAILE, Z. 2012. Oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) seed yield depending on several agro-ecological factors. *Renewable Energy and Energy Efficiency, Growing and processing technologies of energy crops* 39-44.
18. BARBETTI, M. J., KHANGURA, R. K. 1999. Managing blackleg in the disease-prone environment of Western Australia. *Proceedings of the 10th international rapeseed congress*. Canberra, Australia: GCIRC
19. BARNES, A. P., WREFORD, A., BUTTERWORTH, M. H., SEMENOV, M. A., MORAN, D., EVANS, N., FITT, B. D. L. 2010. Adaptation to increasing severity of phoma stem canker on winter oilseed rape in the UK under climate change. *Journal of Agricultural Science* 148 (6): 683-694.
20. BARTLETT, D. W., CLOUGH, J. M., GODWIN, J. R., HALL, A. A., HAMER, M., PARR-DOBZANSKI, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58 (7): 649-662.

21. BEČKA, D., ŠIMKA, J., PROKINOVÁ, E., CIHLÁŘ, P., MIKŠÍK, V., VAŠÁK, J., ZUKALOVÁ, H. 2011. Possibilities of improvement of winter rapeseed protection (*Brassica napus* L.) against Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: GCIRC: 13th International Rapeseed Congress – Abstract Book, Prague, International Consultative Research Group on Rapeseed 1274-1277.
22. BĚLONOŽNÍKOVÁ, K., HÝSKOVÁ, V., CHMELÍK, J., KAVAN, D. 2022. *Pythium oligandrum* in plant protection and growth promotion: Secretion of hydrolytic enzymes, elicitors and tryptamine as auxin precursor. *Microbiological Research* 258: 126976.
23. BENHAMOU, N., LE FLOCH, G., VALLANCE, J., GERBORE, J., GRIZARD, D., REY, P. 2012. *Pythium oligandrum*: An example of opportunistic success. *Microbiology* 158 (11): 2679-2694.
24. BERRY, P. M., SPINK, J. H. 2006. A physiological analysis of oilseed rape yields: past and future. *The Journal of Agricultural Science* 144 (5): 381-392.
25. BERRY, P. M., SPINK, J. 2009. Understanding the effect of a triazole with anti-gibberellin activity on the growth and yield of oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of Agricultural Science* 147 (3): 273-285.
26. BOEREMA, G. H. 1976. The *Phoma* species studied in culture by Dr. R. W. G. Dennis. *Transactions of the British Mycological Society* 67 (2): 289-319.
27. BOEREMA, G. H., DE GRUYTER, J., VAN KESTEREN, H. A. 1994. Contributions towards a monograph of *Phoma* (*Coelomycetes*) – III. 1. Section *Plenodomus*: Taxa often with a *Leptosphaeria* teleomorph. *Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 15 (4): 431-487.
28. BOKOR, A. 1972. Diseases of rape. *Journal of the Department of Agriculture, Western Australia, Series 4* 13 (2): 45-48.
29. BÓRAWSKI, P., BEŁDYCKA-BÓRAWSKA, A., SZYMAŃSKA, E. J., JANKOWSKI, K. J., DUBIS, B., DUNN, J. W. 2019. Development of renewable energy sources market and biofuels in The European Union. *Journal of Cleaner Production* 228: 467-484.
30. BOYD, L. A. 2006. Can the durability of resistance be predicted? *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86 (15): 2523-2526.

31. BRACHACZEK, A., KACZMAREK, J., JĘDRYCZKA, M. 2016. Monitoring blackleg (*Leptosphaeria* spp.) ascospore release timing and quantify enables optimal fungicide application to improved oilseed rape yield and seed quality. *European Journal of Plant Pathology* 145: 643-657.
32. BRACHACZEK, A., KACZMAREK, J., JĘDRYCZKA, M. 2021. Warm and wet autumns favour yield losses of oilseed rape caused by phoma stem canker. *Agronomy* 11 (6): 1171.
33. BRAZAUSKIENĖ, I., PILIPONYTĖ, A., PETRAITIENĖ, E., BRAZAUSKAS, G. 2011. Diversity of *Leptosphaeria maculans*/*L. biglobosa* species complex and epidemiology of phoma stem canker on oilseed rape in Lithuania. *Journal of Plant Pathology* 93 (3): 577-585.
34. BRENT, K. J., HOLLOMON, D. W. 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It be Managed? Brussels, Fungicide Resistance Action Committee, Crop Life International
35. BROWN, J. K. M., BEEBY, R., PENFIELD, S. 2019. Yield instability of winter oilseed rape modulated by early winter temperature. *Scientific Reports* 9 (6953): 1-9.
36. BRUN, H., CHÉVRE, A. M., FITT, B. D. L., POWERS, S., BESNARD, A. L., ERMEL, M., HUTEAU, V., MARQUER, B., EBER, F., RENARD, M., ANDRIVON, D. 2009. Quantitative resistance increases the durability of quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* *Brassica napus*. *Phytopathology* 185 (1): 285-299.
37. BRUN, H., LEVIVIER, S., EBER, F., RENARD, M., CHÉVRE, A.M. 1997. Electrophoretic analysis of natural populations of *Leptosphaeria maculans* directly from leaf lesions. *Plant Pathology* 46 (1): 147-154.
38. BRUN, H., LEVIVIER, S., SOMDA, I., RUER, D., RENARD, M., CHE'VRE, A. M. 2000. A field method for evaluating the potential durability of new resistance sources: application to the *Leptosphaeria maculans* - *Brassica napus* pathogen systems. *Phytopathology* 90 (9): 961-966.
39. BUTTERWORTH, M. H., SEMENOV, M. A., BARNES, A., MORAN, D., WEST, J. S., FITT, B. D. L. 2010. North-south divide; contrasting impacts of climate change on crop yields in Scotland and England. *Journal of the Royal Society Interface* 7: 123-130.

40. CALVERT, O. H., POUND, G. S., WALKER, J. C., STAHMANN, M. A., STAUFFER, J. F. 1949. Induced variability in *Phoma lingam*. *Journal of Agricultural Research* 78 (12): 571-588.
41. CAPOTE, N., PASTRANA, A. M., AQUADO, A., SÁNCHEZ-TORRES, P. 2012. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. *Plant Pathology* 151-202.
42. CARRÉ, P., POUZET, A. 2014. Rapeseed market, worldwide and in Europe. *OCL*. 21 (1): D102.
43. CHAMPOLIVIER, L., MERRIEN, A. 1996. Effects of water stress applied at different growth stages to *Brassica napus* L. var. *oleifera* on yield, yield components and seed quality. *European Journal of Agronomy* 5 (3-4): 153-160.
44. CHEN, G. Y., WU, C. P., LI, B., SU, H., ZHEN, S. Z., AN, Y. L. 2010. Detection of *Leptosphaeria maculans* from imported Canola seeds. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117 (4): 173-176.
45. CHEN, Q., JIANG, J. R., ZHANG, G. Z., CAI, L., CROUS, P. W. 2015. Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology* 82 (1): 137-217.
46. CHOLERTON, L. J. 2015. Biological control of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* and quantification of the microbes *in planta* using qPCR. PhD tézis. University of Nottingham, UK
47. COOLS, H. J., FRAAIJE, B. A. 2008. Are azole fungicides losing ground against septoria wheat disease? Resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 64 (7): 681-684.
48. COZIJNSEN, A. J., HOWLETT, J. 2003. Characterisation of the mating-type locus of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* 43: 351-357.
49. CROUS, P. W. 2005. Plant pathology is lost without taxonomy. *Outlooks on Pest Management* 16 (3): 119-123.
50. DAVIS, T. D., STEFFENS, G. L., SANKHLA, N. 1988. Triazole plant growth regulators. *Horticultural Reviews* 10: 63-105.

51. DAWIDZIUK, A., KACZMAREK, J., PODLESNA, A., KASPRZYK, I., JĘDRYCZKA, M. 2012. Influence of meteorological parameters on *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* spore release in central and eastern Poland. *Grana* 51 (3): 240-248.
52. DE GRUYTER, J., AVESKAMP, M. M., WOUDEBERG, J. H. C., VERKLEY, G. J. M., GROENEWALD, J. Z., CROUS, P. W. 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research* 113 (4): 508-519.
53. DE GRUYTER, J., WOUNDENBERG, J. H. C., AVESKAMP, M. M., VERKLEY, G. J. M., GROENEWALD, J. Z., CROUS, P. W. 2012. Redisposition of phoma-like anamorphs in *Pleosporales*. *Studies in Mycology* 75 (1): 1-36.
54. DELOURME, R., CHÉVRE, A. M., BRUN, H., ROUXEL, T., BALESSENT, M. H., DIAS, J. S., SALISBURY, P., RENARD, M., RIMER, S. R. 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114: 41-52.
55. DELOURME, R., PILET-NAYEL, M. L., ARCHIPIANO, M., HORVAIS, R., TANGUY, X., ROUXEL, T., BRUN, H., RENARD, M., BALESSENT, M. H. 2004. A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* 94 (6): 578-583.
56. DELWICHE, P. A. 1981. Genetic aspects of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance in rapeseed (*Brassica napus*). Madison, WI, USA: University of Wisconsin. PhD tézis
57. DILMAGHANI, A., BALESSENT, M. H., DIDIER, J. P., WU, C., DAVEY, J., BARBETTI, M. J., LI, H., MORENO-RICO, O., PHILLIPS, D., DESPEGHEL, J. P., VINCENOT, L., GOUT, L., ROUXEL, T. 2009. The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology* 58 (6): 1044-1058.
58. DIMOV, Z., MÖLLERS, C. 2010. Genetic variation for saturated fatty acid content in a collection of European winter oilseed rape material (*Brassica napus*). *Plant Breeding* 129 (1): 82-86.
59. DREHMEL, D., JAMES, T., VILGALYS, R. 2008. Molecular phylogeny and biodiversity of the Boletes. *Fungi* 1 (4): 17-23.

60. DU, R., HUANG, Y., ZHANG, J., YANG, L., WU M., LI, G.-Q. 2021. LAMP detection and identification of the blackleg pathogen *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae'. *Plant Disease* 105 (10): 3192-3200.
61. ECKERT, M. R., ROSSALL, S., SELLEY, A., FITT, B. D. L. 2010. Effects of fungicides on *in vitro* spore germination and mycelial growth of the phytopathogens *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* (phoma stem canker of oilseed rape). *Pest Management Science* 66 (4): 396-405.
62. EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) 2020. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Pythium oligandrum* strain M1. *EFSA Journal* 18 (11): 6296.
63. ELLNER, F. M. 2005. Results of long-term field studies into the effect of strobilurin containing fungicides on the production of mycotoxins in several winter wheat varieties. *Mycotoxin Research* 21 (2): 112-115.
64. EVANS, N., BAIERL, A., SEMENOV, M. A., GLADDERS, P., FITT, B. D. L. 2008. Range and severity of a plant disease increased by global warming. *Journal of the Royal Society Interface* 5 (22): 525-531.
65. FAJEMISIN, O., MAZÁKOVÁ, J., RYŠÁNEK, P. 2022a. Emergence of fungicide sensitivity in *Leptosphaeria maculans* isolates collected from the Czech Republic to DMI fungicides. *Agriculture* 12 (2): 237.
66. FAJEMISIN, O., MAZÁKOVÁ, J., RYŠÁNEK, P. 2022b. Evaluation of the sensitivity of *Leptosphaeria maculans* isolates causing phoma stem canker in oilseed rape in the Czech Republic to boscalid and dimoxystrobin fungicides. *Plant Protection Science* 1-10.
67. FENWICK, G. R. 1982. The assessment of a new protein source – Rapeseed. *Proceedings of the Nutrition Society* 41 (3): 277-288.
68. FERNANDO, W. G. D., CHEN, Y., GHANBARNIA, K. 2007. Breeding for blackleg resistance: the biology and epidemiology. *Advances in Botanical Research* 45: 271-311.
69. FITT, B. D. L., BRUN, H., BARBETTI, M. J., RIMMER, S. R. 2006a. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114 (1): 3-15.

70. FITT, B. D. L., EVANS, N., HOWLETT, B. J., COOKE, M. 2006b. Sustainable strategies for managing *Brassica napus* (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). Dordrecht. The Netherlands: Springer. *European Journal of Plant Pathology* 114 (1): 126.
71. FITT, B. D. L., HU, B. C., LI, Z. Q., LIU, S. Y. LANGE, R. M., KHARBANDA, P. D., BUTTERWORTH, M. H., WHITE, R. P. 2008. Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathology* 57 (4): 652-664.
72. FLINT-GARCIA, S. A., THORNSBERRY, J. M., BUCKLER, E. S. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54: 357-374.
73. FRAC Code List ©2022: Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). 1-17.
74. FRASER, M., HWANG, S.-F., AHMED, H. U., AKHAVAN, A., STAMMLER, G., BARTON, W., STRELKOV, S. E. 2016. Sensitivity of *Leptosphaeria maculans* to pyraclostrobin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Science* 97 (1): 83-90.
75. FU, F., ZHANG, X., LIU, F., PENG, G., YU, F., FERNANDO, D. 2020. Identification of resistance loci in Chinese and Canadian canola/rapeseed varieties against *Leptosphaeria maculans* based on genome-wide association studies. *BMC Genomics* 21 (501): 1-11.
76. GALL, C., BALESSENT, M. H., ROBIN, P., ROUXEL, T. 1994. Tetrad analysis of acid phosphatase, soluble protein patterns and mating type in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 84: 1299-1305.
77. GERBORE, J., BENHAMOU, N., VALLANCE, J., LE FLOCH, G., GRIZARD, D., REGNAULT-ROGER, C., REY, P. 2014. Biological control of plant pathogens: Advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 4847-4860.
78. GHANBARNIA, K., FERNANDO, W. G. D., CROW, G. 2011. Comparison of disease severity and incidence at different growth stages of naturally infected canola plants under field conditions by pycnidiospores of *Phoma lingam* as a main source of inoculum. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33 (3): 355-363.

79. GHANBARNIA, K., LYDIATE, D. J., RIMMER, S. R., LI, G., KUTCHER, H. R., LARKAN, N. J., MCVETTY, P. B. E., FERNANDO, W. G. D. 2012. Genetic mapping of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene corresponding to the *LepRI* resistance gene of *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 124 (3): 505-513.
80. GISI, U., SIEROTZKI, H., COOK, A., MCCAFFERY, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58 (9): 859-867.
81. GIULIANI, M. M., GAGLIARDI, A., NARDELLA, E., CARUCCI, F., ARNODIO, M. L., GATTA, G. 2019. The effect of strobilurin on ethylene production in flowers, yield and quality parameters of processing tomato grown under a moderate water stress condition in Mediterranean area. *Scientia Horticulturae* 249: 155-161.
82. GLADDERS, P., EVANS, N., MARCROFT, S., PINOCHET, X. 2006. Dissemination of information about strategies and changes in farming practices of the exploitation of resistance to *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker) in oilseed rape cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 114: 117-126.
83. GLADDERS, P., MUSA, T. M. 1980. Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape. *Plant Pathology* 29 (1): 28-37.
84. GOH, T. K. 1999. Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity* 2. 47-63.
85. GROSSMANN, K. 1990. Plant growth retardants as tools in physiological research. *Physiologia Plantarum* 78 (4): 640-648.
86. GUGEL, R. K., PETRIE, G. A. 1992. History, occurrence, impact and control of blackleg of rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14 (1): 36-45.
87. GULLINO, M. L., LEROUX, P., SMITH, C. M. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19 (1): 1-11.
88. GUO, X., FERNANDO, W. G. D., ENTZ, M. 2008. Dynamics of infection by *Leptosphaeria maculans* on canola (*Brassica napus*) as influenced by crop rotation and tillage. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41 (1): 57-66.

89. HALL, R., CHIGOGORA, J. L., PHILLIPS, L. G. 1996. Role of seedborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* in development of blackleg on oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18 (1): 35-42.
90. HALL, R., PETERS, R. D., ASSABGUI, R. A. 1993. Occurrence and impact of blackleg on oilseed rape in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* 15 (4): 305-313.
91. HAMMOND, K. M., LEWIS, B. G., MUSA, T. M. 1985. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* 34 (4): 557-565.
92. HAYWARD, A., MCLANDERS, J., CAMPBELL, E., EDWARDS, D., BATLEY, J. 2012. Genomic advances will herald new insights into the *Brassica. Leptosphaeria maculans* pathosystem. *Plant Biology* 14 (1): 1-10.
93. HENDERSON, M. P. 1918. The black-leg disease of cabbage caused by *Phoma lingam* (Tode) Desm. *Phytopathology* 8: 379-431.
94. HOWLETT, B. J. 2004. Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26 (3): 245-252.
95. HOWLETT, B. J., IDNURM, A., PEDRAS, M. S. C. 2001. *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of Brassicas. *Fungal Genetics and Biology* 33 (1): 1-14.
96. HÖRANDL, E. 2009. A combinational theory for maintenance of sex. *Heredity* 103 (6): 445-457.
97. HUANG, Y. J., FITT, B. D. L., HALL, A. M. 2003. Survival of A-group and B-group *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) ascospores and mycelium on oilseed rape stem debris. *Annals of Applied Biology* 143 (3): 369-399.
98. HUANG, Y. J., FITT, B. D. L., JĘDRYCZKA, M., DAKOWSKA, S., WEST, J. S., GLADDERS, P., STEED, J. M., LI, Z.-Q. 2005. Patterns of ascospore release in relation to phoma stem canker epidemiology in England (*Leptosphaeria maculans*) and Poland (*Leptosphaeria biglobosa*). *European Journal of Plant Pathology* 111: 263-277.
99. HUANG, Y. J., JESTIN, C., WELHAM, S. J., KING, G. J., MANZANARES-DAULEUX, M. J., FITT, B. D. L., DELOURME, R. 2016. Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics* 129: 169-180.

100. HUANG, Y. J., KARANDENI-DEWAGE, C. S., FITT, B. D. L. 2014. Importance of *Leptosphaeria biglobosa* as a cause of phoma stem canker on winter oilseed rape in the UK. *Aspects of Applied Biology* 127: 117-122.
101. HUMPHERSON-JONES, F. M. 1983. Pathogenicity studies on isolates of *Leptosphaeria maculans* from brassica seed production crops in south-east England. *Annals of Applied Biology* 103 (1): 37-44.
102. INOUE, K., TSURUMI, T., ISHII, H., PARK, P., IKEDA, K. 2012. Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 326 (1): 83-90.
103. JAKABNÉ KONDOR M., AUGUSZTA G., BÉKÉSI P. 1997. A *Phoma lingam* (Tode: Fr.) Desmaz. előfordulása Magyarországon, repce vetőmagon. *Növényvédelem* 33 (6): 287-288.
104. JAKOBSEN, G. V., JENSEN, B. B., KRUDSEN, K. E. B., CANIBE, N. 2015. Improving the nutritional value of rapeseed cake and wheat dried distillers grains with solubles by addition of enzymes during liquid fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 208: 198-213.
105. JAMIESON, P. D., MUNRO, R. L., BUTLER, R. C. 1999. Strobilurins increase production in high-yielding wheat crops. *Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand* 29: 97-100.
106. JĘDRYCZKA, M., LEWARTOWSKA, E., KACHLICKI, P., PLACHKA, E., SROBAROVA, A. 2000. Characterisation of the strains of *Leptosphaeria maculans* isolated from oilseed rape in the Czech Republic and Slovakia. *Integrated Control in Oilseed Crops* 23 (6): 11-19.
107. JESTIN, C., LODÉ, M., VALLÉE, P., DOMIN, C., FALENTIN, C., HORVAIS, R., COEDEL, S., MANZANARES-DAULEUX, M. J., DELOURME, R. 2011. Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* 27: 271-287.
108. JOHNSON, R. D., LEWIS, B. G. 1990. DNA polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37 (6): 417-424.
109. JOHNSON, R. D., LEWIS, B. G. 1994. Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* 43 (2): 269-277.

110. KACZMAREK, J., JĘDRYCZKA, M. 2011. Characterization of two coexisting pathogen populations of *Leptosphaeria* spp., the cause of stem canker of brassicas. *Acta Agrobotanica* 64 (2): 3-14.
111. KACZMAREK, J., JĘDRYCZKA, M., FITT, B. D. L., LUCAS, J. A., LATUNDE-DADA, A. O. 2009. Analyses of air samples for ascospores of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* by light microscopy and molecular techniques. *Journal of Applied Genetics* 50 (4): 411-419.
112. KAROLEWSKI, Z., WALCZAK, D., KOSIADA, T., LEWANDOWSKA, D. 2007. Occurrence of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in oilseed rape leaves with different symptoms of stem canker. *Phytopathologia polonica* 44: 43-50.
113. KEMA, G. H. J., GOHARI, A. M., AOUINI, L., GIBRIEL, H. A. Y., WARE, S. B., VAN DEN BOSCH, F., MANNING-SMITH, R., ALONSO-CHAVEZ, V., HELPS, J., M'BAREK, S. B., MEHRABI, R., DIAZ-TRUJILLO, C., ZAMANI, E., SCHOUTEN, H. J., VAN DER LEE, T. A. J., WAALWIJK, C., DE WAARD, M. A., DE WIT, P. J. G. M., VERSTAPPEN, E. C. P., THOMMA, B. P. H. J., MEIJER, H. J. G., SEIDL, M. F. 2018. Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nature Genetics* 50: 375-380.
114. KESZTHELYI S., KAZINCZI G. 2014. Az őszi káposztarepce védelme. *Növényvédelem* 50 (9): 409-435.
115. KHANGURA, R. K., BARBETTI, M. J. 2001. Prevalence of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on canola (*Brassica napus*) in Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41 (1): 71-80.
116. KIGHTLEY, S. P. J., KNIGHT, S. M., BINGHAM, I. J., LANG, B., PHILPOTT, H. L. 2012. The impact of changes to agronomic practice on farm yield trends in oilseed rape. *Aspects of Applied Biology* 117: 137-144.
117. KING, K. M., WEST, J. S. 2022. Detection of the *Phoma* pathogens *Plenodomus biglobosus* subclades 'brassicae' and 'canadensis' on wasabi, and 'canadensis' in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 162: 751-756.
118. KOCH, E., BADAWEY, M. A., HOPPE, H. H. 1989. Differences between aggressive and non-aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *Journal of Phytopathology* 124 (1): 52-62.

119. KOCH, E., SONG, K., OSBORN, T. C., WILLIAMS, P. H. 1991. Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4 (4): 341-349.
120. KOVÁCS, M. G. 2013. Gombák. In: Kristóf Z. (szerk.) 2013. Növények és gombák szerveződése. Eötvös Loránd Tudományegyetem. 95-96.
121. KUTCHER, H. R., BRANDT, S. A., SMITH, E. G., ULRICH, D., MALHI, S. S., JOHNSTON, A. M. 2013. Blackleg disease of canola mitigated by resistant cultivars and four-year crop rotations in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 35 (2): 209-221.
122. KUUSK, A. K., HAPSTADIUS, I., ZHOU, L., STEVENTON, L. A., GIESE, H., DIXELIUS, C. 2002. Presence of *Leptosphaeria maculans* group A and group B isolates in Sweden. *Journal of Phytopathology* 150 (6): 349-356.
123. LE FLOCH, G., REY, P., BENIZRI, E., BENHAMOU, N., TIRILLY, Y. 2003. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil* 257: 459-470.
124. LIN, L., ALLEMEKINDERS, H., DANSBY, A., CAMPBELL, L., DURANCE-TOD, S., BERGER, A., JONES, P. 2013. Evidence of health benefits of canola oil. *Nutrition Reviews* 71 (6): 370-385.
125. LINDHOUT, P. 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* 124: 217-226.
126. LIPKOVÁ, N., MEDO, J., ARTIMOVÁ, R., MAKOVÁ, J., PETROVÁ, J., AVOREKOVÁ, S., MICHALKO, J. 2021. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus* L.) and blackleg disease (*Leptosphaeria maculans*) suppression mediated by endophytic bacteria. *Agronomy* 11 (10): 1966.
127. LIU, S. Y., LIU, Z., FITT, B. D. L., EVANS, N., FOSTER, S. J., HUANG, Y. J., LATUNDE-DADA, A. O., LUCAS, J. A. 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. *Plant Pathology* 55 (3): 401-412.

128. LIU, Z., LATUNDE-DADA, A. O., HALL, A. M., FITT, B. D. L. 2014. Phoma stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae'. *European Journal of Plant Pathology* 140: 841-857.
129. MAGYAR D., BARASITS T., FISCHL G., FERNANDO, W. G. D. 2006. First report of the natural occurrence of the teleomorph of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape and airborne dispersal of ascospores in Hungary. *Journal of Phytopathology* 154 (7-8): 428-431.
130. MANIATIS, T., SAMBROOK, I., FRITSCH, E. F. 1983. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
131. MARCROFT, S. J., SPRAGUE, S. J., PYMER, S. J., SALISBURY, P. A., HOWLETT, B. J. 2003. Factors affecting production of inoculum of the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* in south-eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 43 (10): 1231-1236.
132. MARCROFT, S. J., SOSNOWSKI, M. R., SCOTT, E. S., RAMSEY, M. D., SALISBURY, P., HOWLETT, B. J. 2005. *Brassica napus* plants infected by *Leptosphaeria maculans* after the third to fifth leaf growth stage in south-eastern Australia do not develop blackleg stem canker. *European Journal of Plant Pathology* 112: 289-292.
133. MATTHÄUS, B., BRÜHL, L. 2003. Quality of cold-pressed edible rapeseed oil in Germany. *Molecular Nutrition Food Research* 47 (6): 367-447.
134. MATYSIAK, K., KACZMAREK, S. 2013. Effect of chlorocholine chloride and triazoles – tebuconazole and flusilazole on winter oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) in response to the application term and sowing density. *Journal of Plant Protection Research* 53 (1): 79-88.
135. MAZÁKOVÁ, J., URBAN, J., ZOUHAR, M. RYŠÁNEK, P. 2017. Analysis of *Leptosphaeria* species complex causing phoma leaf spot and stem canker of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the Czech Republic. *Crop and Pasture Science* 68 (3): 254-264.
136. MCDONALD, B. A., LINDE, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Phytopathology* 40: 349-379.
137. MCGEE, D. C., PETRIE, G. A. 1978. Variability of *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. *Phytopathology* 68: 625-630.

138. MENDES-PEREIRA, E., BALESSENT, M. H., HORTENSE, B., ROUXEL, T. 2003. Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans* – *L. biglobosa* species complex. *Mycological Research* 107 (11): 1287-1304.
139. MITROVIĆ, P. 1997. Paraziti kupusa (Cabbage pathogens). Mester tézis. University of Novi Sad, Faculty of Agriculture
140. MITROVIĆ, P., JEROMELA, A. M., TRKULJA, V., MILOVAC, Ž., TERZIC, S. 2016. The first occurrence of stem canker on oilseed rape caused by *Leptosphaeria biglobosa* in Serbia. *Ratarstvo i povrtarstvo* 53 (2): 53-60.
141. MONDAL, S. N., BHATIA, A., SHILTS, T., TIMMER, L. W. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. *Plant Disease* 89 (11): 1186-1194.
142. NASERI, B., DAVIDSON, J. A., SCOTT, E. S. 2008. Survival of *Leptosphaeria maculans* and associated mycobiota on oilseed rape stubble buried in soil. *Plant Pathology* 57 (2): 280-289.
143. NOLEPPA, S. 2017. Banning Neonicotinoids in the EU: An ex-post assessment of economic and environmental Costs. HFFA Research GmbH, Berlin, Germany, 7-11.
144. PARLEVLIET, J. E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124: 147-156.
145. PELUOLA, C., FERNANDO, W. G. D., HUVENAARS, C., KUTCHER, H. R., LAHLALI, R., PENG, G. 2013. Effect of flooding on the survival of *Leptosphaeria* spp. in canola stubble. *Plant Pathology* 62 (6): 1350-1356.
146. PENAUD, A., WALKER, A. S. 2015. Oilseed rape pathogens in France. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens* 389-399.
147. PENG, G., LIU, X., MCLAREN, D. L., MCGREGOR, L., YU, F. 2020. Seed treatment with the fungicide fluopyram limits cotyledon infection by *Leptosphaeria maculans* and reduces blackleg of canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* 42: 480-492.
148. PÉRÈS, A., POISSON, B. 1997. Phoma du colza: avancées en épidémiologie. *CETIOM – Oléoscope* 40: 37-40.

149. PETRIE, G. A., LEWIS, P. A. 1985. Sexual compatibility of isolates of the rapeseed blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* from Canada, Australia and England. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7 (3): 253-255.
150. PILET, M. L., DELOURME, R., FOISSET, N., RENARD, M. 1998. Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not, in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 96: 23-30.
151. PILET, M. L., DUPLAN, G., ARCHIPIANO, M., BARRET, P., BARON, C., HORVAIS, R., TANGUY, X., LUCAS, M., RENARD, M., DELOURME, R. 2001. Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Sciences* 41 (1): 197-205.
152. PILIPONYTE-DZIKIENE, A., KACZMAREK, J., PETRAITIENE, E., KASPRZYK, L., BRAZAUSKIENE, I., BRAZAUSKAS, G., JĘDRYCZKA, M. 2014. Microscopic and molecular detection of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* ascospore content in air samples. *Zemdirbyste-Agriculture* 101 (3): 303-312.
153. PINOCHET, X., MESTRIES, E., PENAUD, A., DELOURME, R., CHEVRE, A. M., RENARD, M., BRUN, H., BOUSSET, L., BALESSENT, M. H., ROUXEL, T., AUBERTOT, J. N. 2003. Towards a durable management of genetic resistance to *Leptosphaeria maculans*. OCL - Oilseeds and fats. *Crops and Lipids* 10 (3): 208-211.
154. PLUMMER, K. M., DUNSE, K., HOWLETT, B. J. 1994. Non-aggressive strains of the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, are present in Australia and can be distinguished from aggressive strains by molecular analysis. *Australian Journal of Botany* 42 (1): 1-8.
155. RADEMACHER, W. 2000. Growth Retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 51: 501-531.
156. RAYMER, P. L. 2002. Canola: an emerging oilseed crop. In: JANICK, J., WHIPKEY, A. (szerk.) Trends in New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, VA, USA. 122-126.
157. REHNER, S. A., SAMUELS, G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98 (6): 625-634.

158. RIEDIKER, S., OBRIST, H., VARGA, N., STADLER, R. H. 2002. Determination of chlormequat and mepiquat in pear, tomato, and wheat flour using on-line solid-phase extraction (Prospekt) coupled with liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 966 (1-2): 15-23.
159. RIMMER, S. R. 2006. Resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28 (1): 288-297.
160. RONDANINI, D. P., GOMEZ, N. V., AGOSTI, M. B., MIRALLES, D. J. 2012. Global trends of rapeseed grain yield stability and rapeseed-to-wheat yield ratio in the last four decades. *European Journal of Agronomy* 37 (1): 56-65.
161. ROUXEL, T., BALESSENT, M. H. 2005. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology* 6 (3): 225-241.
162. ROUXEL, T., MENDES-PEREIRA, E., BRUN, H., BALESSENT, M. H. 2004. Species complex of fungal phytopathogens: *Leptosphaeria maculans* – *L. biglobosa* case study. In: SHARMA, A. K., SHARMA, A. (szerk.) *Plant Genome: Biodiversity and Evolution*. 2. edition. Science Publisher, Enfield, NH. 33-75.
163. ROUXEL, T., WILLNER, E., COUDARD, L., BALESSENT, M. H. 2003. Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. *Euphytica* 133: 219-231.
164. SALAM, M. U., FITT, B. D. L., AUBERTOT, J.-N., DIGGLE, A. J., HUANG, Y. J., BARBETTI, M. J., GLADDERS, P., JĘDRYCZKA, M., KHANGURA, R. K., WRATTEN, N., FERNANDO, W. G. D., PENAUD, A., PINOCHET, X., SIVASITHAMPARAM, K. 2007. Two weather-based models for predicting the onset of seasonal release of ascospores of *Leptosphaeria maculans* or *L. biglobosa*. *Plant Pathology* 56 (3): 412-423.
165. SALAM, M. U., KHANGURA, R. K., DIGGLE, A. J., BARBETTI, M. J. 2003. Blackleg Sporacle: a model for predicting onset of pseudothecia maturity and seasonal ascospore showers in relation to blackleg of canola. *Phytopathology* 93 (9): 1073-1081.
166. SALEM, H. B., NEFZAOU, A. 2003. Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats. *Small Ruminant Research* 49 (3): 275-288.

167. SALISBURY, P. A., BALLINGER, D. J., WRATTEN, N., PLUMMER, K. M., HOWLETT, B. J. 1995. Blackleg disease on oilseed *Brassica* in Australia: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35 (5): 665-672.
168. SAMARAS, A., EFTHIMIOU, K., ROUMELIOTIS, E., KARAOGLANIDIS, G. S. 2018. Biocontrol potential and plant-growth-promoting effects of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI 600 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomato. *Acta Horticulturae* 1207: 139-146.
169. SANKHLA, N., DAVIS, T. D., UPADHYAYA, A., SANKHLA, D., WALSER, R. H., SMITH, B. N. 1985. Growth and metabolism of soybean as affected by paclobutrazol. *Plant and Cell Physiology* 26 (5): 913-921.
170. SCHNIPPENKOETTER, W., HOQUE, M., MAHER, R., VAN DE WOUW, A., HANDS, P., ROLLAND V., BARRETT, L., SPRAGUE, S. 2021, Comparison of non-subjective relative fungal biomass measurements to quantify the *Leptosphaeria maculans* – *Brassica napus* interaction. *Plant Methods* 17 (122): 1-16.
171. SHAH, U. A., KOTTA-LOIZOU I., FITT, B. D. L., COUTTS, R. H. A. 2020. Mycovirus-induced hypervirulence of *Leptosphaeria biglobosa* enhances systemic acquired resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 33 (1): 98-107.
172. SHALINI, K., KUMAR, N., DRABU, S., KUMAR, S. P. 2011. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 7: 668-677.
173. SHOEMAKER, R. A. 1984. Canadian and some extralimital *Leptosphaeria* species. *Canadian Journal of Botany* 62 (12): 2688-2729.
174. SHOEMAKER, R. A., BRUN, H. 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany* 79 (4): 412-419.
175. SIEROTZKI, H., SCALLIET, G. 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103 (9): 880-887.

176. SIVASITHAMPARAM, K., BARBETTI, M. J., LI, H. 2005. Recurring challenges from a necrotrophic fungal plant pathogen: a case study with *Leptosphaeria maculans* (causal agent of blackleg disease in brassicas) in Western Australia. *Annals of Botany* 96 (3): 363-377.
177. SLATER, R., ELLIS, S., GENAY, J.-P., HEIMBACH, U., HUART, G., SARAZIN, M., LONGHURST, C., MÜLLER, A., NAUEN, R., RISON, J.-L., ROBIN, F. 2011. Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): a coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest Management Science* 67 (6): 633-638.
178. SMITH, H. C., SUTTON, B. C. 1964. *Leptosphaeria maculans* the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Transactions of the British Mycological Society* 47 (2): 159-165.
179. SOMDA, I., HARKOUS, S., BRUN, H. 1997. Bipolar heterothallism in B-group isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* 46 (6): 890-896.
180. SOMDA, I., RENARD, M., BRUN, H. 1996. Morphology, pathogenicity and isozyme variation amongst French isolates of *Leptosphaeria maculans* recovered from *Brassica juncea* cv. Picra. *Plant Pathology* 45 (6): 1090-1098.
181. SOMDA, I., RENARD, M., BRUN, H. 1998. Seedling and adult plant reactions of *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant lines towards A- and B-group isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Annals of Applied Biology* 132 (2): 187-196.
182. SONG, P. L., JĘDRYCZKA, M., IRZYKOWSKI, W., YAN, M. J., HUANGFU, H. Y., HAO, L. F., BAO, Y. Y., LI, Z. Q. 2016. Efficient detection of *Leptosphaeria maculans* from infected seed lots of oilseed rape. *Journal of Phytopathology* 164 (11-12): 1097-1104.
183. SPITZER, T., MATUŠINSKY, P., KLEMOVÁ, Z., KAZDA, J. 2012. Effect of fungicide application date against *Sclerotinia sclerotiorum* on yield and greening of winter rape. *Plant Protection Science* 48 (3): 105-109.
184. SPRAGUE, S. J., MARCROFT, S. J., HAYDEN, H. L., HOWLETT, B. J. 2006. Major gene resistance to blackleg in *Brassica napus* overcome within three years of commercial production in southeastern Australia. *Plant Disease* 90 (2): 190-198.
185. SPRAGUE, S. J., WATT, M., KIRKEGAARD, J. A., HOWLETT, B. J. 2007. Pathways of infection of *Brassica napus* roots by *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*. 176 (1): 211-222.

186. STAUB, T. 1991. Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29: 421-442.
187. STEVENS, M., MCGRANN, G., CLARK, B. 2008. Turnip yellows virus (syn *Beet western yellow virus*): An emerging threat to European oilseed rape production? *HGCA Research Review* 69: 1-36.
188. SZLÁVIK S., BARASITS T., FERNANDO, W. G. D. 2006. First report of pathogenicity group-3 of *Leptosphaeria maculans* on winter rape in Hungary. *Plant Disease* 90 (5): 684.
189. TAMURA, K., STECHER, G., KUMAR, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38. 3022-3027.
190. THAMSIRIROJ, T., MURPHY, D. J. 2010. Can rape seed biodiesel meet the European Union sustainability criteria for biofuels? *Energy Fuels* 24 (3): 1720-1730.
191. TOSCANO-UNDERWOOD, C., HUANG, Y. J., FITT, B. D. L., HALL, A. M. 2003. Effects of temperature on maturation of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* on oilseed rape esterase debris. *Plant Pathology* 52 (6): 726-736.
192. TRAVADON, R., BOUSSET, L., SAINT-JEAN, S., BRUN, H., SACHE, I. 2007. Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* 56 (4): 595-603.
193. TURNER, J., BACKMAN, P. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease Research* 75 (4): 347-353.
194. VAN DE WOUW, A. P., COZIJNSEN, A. J., HANE, J. K., BRUNNER, P. C., MCDONALD, B. A., OLIVER, R. P., HOWLETT, B. J. 2010. Evolution of linked avirulence effectors in *Leptosphaeria maculans* is affected by genomic environment and exposure to resistance genes in host plants. *PloS Pathogens* 6 (11): e1001180.
195. VAN DE WOUW, A. P., ELLIOTT, V. L., CHANG, S., LÓPEZ-RUIZ, F. J., MARCROFT, S. J., IDNURM, A. 2017. Identification of isolates of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans* with resistance to the triazole fungicide fluquinconazole using a novel *in planta* assay. *PLoS One* 12 (11): e0188106.
196. VAN DE WOUW, A. P., HOWLETT, B. J. 2012. Estimating frequencies of virulent isolates in field populations of a plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*, using high-throughput pyrosequencing. *Journal of Applied Microbiology* 113 (5): 1145-1153.

197. VAN DE WOUW, A. P., HOWLETT, B. J. 2020. Advances in understanding the *Leptosphaeria maculans* - *Brassica* pathosystem and the impact on disease management. *Canadian Journal of Plant Pathology* 42 (2): 149-163.
198. VAN DE WOUW, A. P., HOWLETT, B. J., IDNURM, A. 2018a. Changes in allele frequencies of avirulence genes in the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, over two decades in Australia. *Crop and Pasture Science* 69 (1): 20-29.
199. VAN DE WOUW, A. P., IDNURM, A., MARCROFT, S. 2018b. Fungicide resistance in Australian *Leptosphaeria maculans* populations. 20th Australian Research Assembly on Brassicas, Perth 191-196.
200. VAN DE WOUW, A. P., MARCROFT, S. J., HOWLETT, B. J. 2016. Blackleg disease of canola in Australia. *Crop and Pasture Science* 67 (4): 273-283.
201. VAN DE WOUW, A. P., MARCROFT, S. J., WARE, A., LINDBECK, K., KHANGURA, R., HOWLETT, B. J. 2014. Breakdown of resistance to the fungal disease, blackleg, is averted in commercial canola (*Brassica napus*) crops in Australia. *Field Crops Research* 166: 144-151.
202. VAN DE WOUW, A. P., SCANLAN, J. L., MARCROFT, S. J., SMITH, A. J., SHEEDY, E. M., PERNDT, N. W., HARRISON, C. E., FORSYTH, L. M., IDNURM, A. 2021. Fungicide sensitivity and resistance in the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, across canola growing regions in Australia. *Crop & Pasture Science* 72 (12): 994-1007.
203. VAN DE WOUW, A. P., THOMAS, V. L., COZIJNSEN, A. J., MARCROFT, S. J., SALISBURY, P. A., HOWLETT, B. J. 2008. Identification of *Leptosphaeria biglobosa* 'canadensis' on *Brassica juncea* stubble from northern New South Wales, Australia. *Australiasian Plant Disease Notes* 3: 124-128.
204. VARGA ZS. 2014. A repce fómás betegsége. *Agrofórum* 25 (7): 40-45.
205. VILGALYS, R., HESTER, M. 1990. Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species. *Journal of Bacteriology* 4238-4246.
206. VINCELLI, P. 2002. QoI (strobilurin) fungicides: Benefits and risks. *The Plant Health Instructor*

207. VINCENOT, L., BALESSENT, M. H., LI, H., BARBETTI, M. J., SIVASITHAMPARAM, K., GOUT, L., ROUXEL, T. 2008. Occurrence of a new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* in Western Australia. *Phytopathology* 98 (3): 321-329.
208. VOIGT, K., COZIJNSEN, A. J., KROYMANN, J., PÖGGELER, S., HOWLETT, B. J. 2005. Phylogenetic relationships between members of the crucifer pathogenic *Leptosphaeria maculans* species complex as shown by mating type (MAT1-2), actin, and β -tubulin sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37 (2): 541-557.
209. VOIGT, K., WÖSTEMEYER, J. 2000. Reliable amplification of actin genes facilitates deep-level phylogeny. *Microbiological Research* 155 (3): 179-19.
210. WANG, Y., AKHAVAN, A., HWANG, S. F., STRELKOV, S. E. 2020. Decreased sensitivity of *Leptosphaeria maculans* to pyraclostrobin in Alberta, Canada. *Plant Disease* 104: 2462-2468.
211. WEST, J. S., EVANS, N., LEECH, P. K., FITT, B. D. L., WELHAM, S. J., JĘDRYCZKA, M., PENAUD, A. 2000. Predicting leaf infection by *Leptosphaeria maculans* on winter oilseed rape. *Integrated Control in Oilseed Crops IOBC/wprs Bulletin* 23 (6): 23-27.
212. WEST, J. S., BALESSENT, M. H., ROUXEL, T., NARCY, J. P., HUANG, Y. J., ROUX, J., STEED, J. M., FITT, B. D. L., SCHMIT, J. 2002. Colonization of winter oilseed rape tissues by A/Tox⁺ and B/Tox⁰ *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. *Plant Pathology* 51 (3): 311-321.
213. WEST, J. S., KHARBANDA, P. D., BARBETTI, M. J., FITT, B. D. L. 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* 50 (1): 10-27.
214. WEYMANN, W., BÖTTCHER, U., SIELING, K., KAGE, H. 2015. Effects of weather conditions during different growth phases on yield formation of winter oilseed rape. *Field Crops Research* 173 (1): 41-48.
215. WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., GELFLAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. J. 1989. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. San Diego, CA. 315-322.

216. WIJAYAWARDENE, N. N., CROUS, P. W., KIRK, P. M., HAWKSWORTH, D. L., BOONMEE, S., BRAUN, U., DAI, D.-Q., D'SOUZA, M. J., DIEDERICH, P., DISSANAYAKE, A., DOILOM, M., HONGSANAN, S., JONES, E. B. G., GROENEWALD, J. Z., JAYAWARDENA, R., LAWREY, J. D., LIU, J.-K., LÜCKING, R., MADRID, H., MANAMGODA, D. S., MUGGIA, L., NELSEN, M. P., PHOOKAMSAK, R., SUETRONG, S., TANAKA, K., THAMBUGALA, K. M., WANASINGHE, D. N., WIKEE, S., ZHANG, Y., APTROOT, A., ARIYAWANSA, H. A., BAHKALI, A. H., BHAT, D. J., GUEIDAN, C., CHOMNUNTI, P., DE HOOG, G. S., KNUDSEN, K., LI, W.-J., MCKENZIE, E. H. C., MILLER, A. N., PHILLIPS, A. J. L., PIATEK, M., RAJA, H. A., SHIVAS, R. S., SLIPPERS, B., TAYLOR, J. E., TIAN, Q., WANG, Y., WOUDEMBERG, J. H. C., CAI, L., JAKLITSCH, W. M., HYDE, K. D. 2014. Naming and outline of *Dothideomycetes* – 2014 including proposals for the protection or suppression of generic names. *Fungal Diversity* 69: 1-55.
217. WILLIAMS, R. H., FITT, B. D. L. 1999. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape. *Plant Pathology* 48 (2): 161-175.
218. WINGFIELD, M. J., DE BEER, Z. W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B. D., GROENEWALD, J. Z., LOMBARD, L., CROUS, P. W. 2012. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13 (6): 604-613.
219. WOUDEMBERG, J. H. C., AVESKAMP, M. M., DE GRUYTER, J., SPIERS, A. G., CROUS, P. W. 2009. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia* 22 (7): 56-62.
220. YANG, Y., MARCROFT, S. J., FORSYTH, L. M., ZHAOU, J., ZIQIN, L., VAN DE WOUW, A. P., IDNURM, A. 2020. Sterol demethylation inhibitor fungicide resistance in *Leptosphaeria maculans* is caused by modifications in the regulatory region of ERG11. *Plant Disease* 104 (5): 1280-1290.
221. ZAMANI-NOOR, N., KNÜFER, J. 2018. Effects of host plant resistance and fungicide application on phoma stem canker, growth parameters and yield of winter oilseed rape. *Crop Protection* 112: 313-321.

222. ZAMANMIRABADI, A., HEMMATI, R., DOLATABADIAN, A., BATLEY, J. 2022. Current progress in studying blackleg disease (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) of canola in Iran: Where do we stand now? *Plant Pathology* 71 (2): 239-250.
223. ZHANG, X., FERNANDO, W. G. D. 2017. Insights into fighting against blackleg disease of *Brassica napus* in Canada. *Crop Pasture Science* 69 (1): 40-47.
224. ZHANG, X., PENG, G., PARKS, P., HU, B., LI, Q., JIANG, L., NIU, Y., HUANG, S., FERNANDO, W. G. D. 2017. Identifying seedling and adult plant resistance of Chinese *Brassica napus* germplasm to *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* 66 (5): 752-762.
225. ZHAO, J., CAO, L., ZHANG, C., ZHONG, L., LU, J., LU, Z. 2014. Differential proteomics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and its genome-shuffled mutant for improving surfactin production. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (11): 19847-19869.
226. ZHENG, X., KOOPMANN, B., ULBER, B., VON TIEDEMANN, A. 2020. A global survey on diseases and pests in oilseed rape – current challenges and innovative strategies of control. *Frontiers in Agronomy* 2: 590908.
227. ZHOU, Y., FITT, B. D. L., WELHAM, S. J., GLADDERS, P., SANFORD, C. E., WEST, J. S. 1999. Effects of severity and timing of stem canker (*Leptosphaeria maculans*) symptoms on yield of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. *European Journal of Plant Pathology* 105: 715-728.
228. ZOU, Z., ZHANG, X., PARKS, P., DU TOIT, L. J., VAN DE WOUW, A. P., FERNANDO, W. G. D. 2019. A new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* identified from *Brassica rapa*. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (7): 1668.

Internetes hivatkozások:

- Internet1:
Grain Central. Rapeseed Oil Consumption Globally – lekérdezés ideje: 2022. 02. 28.
<https://www.graincentral.com/cropping/oilseeds/rapeseed-oil-consumption-growing-globally/>
- Internet2:
European Biomass Industry Association – lekérdezés ideje: 2022. 03. 09.
<http://www.eubia.org/cms/wiki-biomass/biofuels/biodiesel/>

- Internet3:
<https://www.mycobank.org/>– lekérdezés ideje: 2022. 09. 16.
- Internet4:
https://agro.bayer.co.hu/termek/novenyvedelmi_termek/csavazo_szerek/?id=82–
lekérdezés ideje: 2022. 09. 02.
- Internet5:
<https://novenyvedoszer.nebih.gov.hu/Engedelykereso/> – lekérdezés ideje: 2022. 10. 02.
- Internet6:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>– lekérdezés ideje: 2021. 09. 05.
- Internet7:
<https://www.fao.org/3/a1125e/a1125e05.pdf> – lekérdezés ideje: 2021. 10. 07.
- Internet8:
https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation10/Fluopyram.pdf – lekérdezés ideje: 2021. 10. 07.
- Internet9:
<https://www.fao.org/3/ca2760en/ca2760en.pdf> – lekérdezés ideje: 2021. 09. 17.
- Internet10:
https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation04/Pyraclostrobinaf.pdf – lekérdezés ideje: 2021. 10. 07.
- Internet11:
https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation94/tebucona.pdf – lekérdezés ideje: 2021. 10. 07.

M2. Ábrajegyzék

1. ábra 2017 és 2021 között gyűjtött minták származási helye.....	30
2. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> és a <i>Plenodomus biglobosus</i> ITS régiójának egy része és az LmacF, LbigF, LmacR primerek elhelyezkedése.....	33
3. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> mating type fehérjéjét kódoló szekvenciái a MAT1-1 és a MAT1-2 típus esetén, valamint az LmMAT1-1F, LmMAT1-2F, LMATR primerek elhelyezkedése	34
4. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> AvrLm4 fehérjéjét kódoló szekvenciája és az AvrLm4F, AvrLm4R primerek elhelyezkedése	34
5. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> és a <i>Plenodomus biglobosus</i> 18S-28S régiójának egy része és a PN3, PN10 primerek elhelyezkedése	35
6. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> és a <i>Plenodomus biglobosus</i> LSU régiójának egy része és az LROR, LR7 primerek elhelyezkedése	35
7. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> és a <i>Plenodomus biglobosus</i> β -tubulin-2 fehérjéjét kódoló szekvenciáinak egy része és a Btub2Fd, Btub4Rd primerek elhelyezkedése	36
8. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> és a <i>Plenodomus biglobosus</i> rpb2 fehérjéjét kódoló szekvenciájának egy része és az RPB2F, RPB2R primerek elhelyezkedése	37
9. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> és a <i>Plenodomus biglobosus</i> aktin fehérjéjét kódoló szekvenciájának egy része és az Aktin17, Aktin18 primerek elhelyezkedése	37
10. ábra Fertőzött repcelevelek (A) és szárok (B) inkubálása nedves kamrában (Fotók: Bagi) ..	39
11. ábra Tömeges piktídiumképződés és sporuláció repcelevélen (A) (Fotó: Jáki) és száron (B) (Fotó: Bagi)	39
12. ábra Az izolátumok fenntartása ferde agaron (A) és agarlemezeken (B) (Fotók: Bagi).....	40
13. ábra Repce növények nevelése az üvegházban (Fotó: Kecskeméti).....	41
14. ábra Mérgezett agarlemezek készítése: táptalaj kimérése lombikokba (A), törzsoldat hozzáadagolása (B, C), táptalaj kiöntése Petri-csészékbe (D) (Fotók: Petróczy)	47
15. ábra A <i>Plenodomus lingam</i> és a <i>Plenodomus biglobosus</i> izolátumok súlyozott aránya mintavételi pontonként.....	49
16. ábra A <i>Plenodomus</i> izolátumok faji megoszlása 2017 és 2021 között	50
17. ábra <i>Plenodomus</i> -faj által okozott tünet levélen (A) és száron (B) (Fotók: Bagi).....	51
18. ábra <i>Plenodomus</i> sp. piktídiumai sztereomikroszkóp alatt (A), valamint citoplaszt mikroszkóp alatt (B) (Fotók: Petróczy és Bagi).....	51
19. ábra <i>Plenodomus</i> -fajok konídiumai: <i>P. lingam</i> - L63-as izolátum (A), <i>P. biglobosus</i> - L99-es izolátum (B) (Fotók: Jáki)	52
20. ábra <i>Plenodomus lingam</i> 28 napos tenyészteti PDA táptalajon (Fotók: Bagi és Csik).....	55

21. ábra <i>Plenodomus biglobosus</i> 28 napos tenyészetei PDA táptalajon (Fotók: Bagi és Jáki)....	57
22. ábra Az L39-es <i>Plenodomus biglobosus</i> által okozott nekrotikus lézió és piknídiumok az inokulált repce levélen 10 napos inkubálás után (Fotó: Bagi)	58
23. ábra A Gyirmótról (Győr) származó <i>P. lingam</i> (L200, L201, L204) és <i>P. biglobosus</i> (L202, L203, L205, L206, L207) izolátumok fajsztintú azonosítása az ITS régiók és az 5,8S rDNS gén alapján	58
24. ábra Saját és a nemzetközi adatbázisból származó <i>P. lingam</i> izolátumok 289 bp hosszúságú, valamint a <i>P. biglobosus</i> izolátumok 327 bp hosszúságú részleges ITS1 régió, 5,8S rDNS gén, valamint részleges ITS2 régió szekvenciáinak felhasználásával a Neighbor-Joining statisztikai becslés alapján készített filogenetikai törzsfá	59
25. ábra Nagylózsról és Kétpóról származó <i>P. lingam</i> izolátumok párosodási típusainak meghatározása PCR-rel	60
26. ábra Felsőánáról származó <i>P. lingam</i> izolátumok párosodási típusainak meghatározása PCR-rel.....	60
27. ábra <i>P. lingam</i> izolátumok <i>AvrLm4</i> génjének vizsgálata PCR-rel	61
28. ábra A 18S-28S szakasz vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált <i>P. lingam</i> (L7, L11, L26, L30, L34) és <i>P. biglobosus</i> (L37, L55, L59, L71, L112, L128) izolátumok esetén	62
29. ábra Az LSU régió egy részének vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált <i>P. lingam</i> (L108, L110, L166, L183, L197, L198, L201, L214, L217) és <i>P. biglobosus</i> (L59, L105, L144, L150, L174, L206) izolátumok esetén.....	62
30. ábra A <i>tub2</i> gén szakaszának vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált <i>P. lingam</i> (L61, L63, L108) és <i>P. biglobosus</i> (L59, L112) izolátumok esetén.....	63
31. ábra Az <i>rpb2</i> régió egy szakaszának vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált <i>P. lingam</i> (L7, L11, L26, L34, L40) és <i>P. biglobosus</i> (L37) izolátumok esetén	63
32. ábra Az <i>act1</i> gén egy szakaszának vizsgálata PCR-rel a filogenetikai analízishez felhasznált <i>P. lingam</i> (L63) és <i>P. biglobosus</i> (L71, L74, L105) izolátumok esetén	64
33. ábra Az általunk vizsgált 26 <i>P. lingam</i> és a 17 <i>P. biglobosus</i> izolátum, valamint az NCBI adatbázisból származó izolátumok ITS1-5,8S-ITS2 szekvenciáinak felhasználásával a Neighbor-Joining statisztikai becslés alapján készített filogenetikai törzsfá	65
34. ábra A 26 <i>P. lingam</i> és a 17 <i>P. biglobosus tub2</i> gén egy szakaszából, az ITS1-5,8S-ITS2 régióból, az LSU régió egy szakaszából, az <i>rpb2</i> gén egy szakaszából, valamint a referencia izolátumok szekvenciáiból a Neighbor-Joining statisztikai becslés alapján készített filogenetikai törzsfá	67

35. ábra Az általunk vizsgált 26 <i>P. lingam</i> és a 17 <i>P. biglobosus</i> izolátum, valamint az NCBI adatbázisból származó izolátumok <i>act1</i> génszakaszának felhasználásával a Neighbor-Joining statisztikai becslés alapján készített filogenetikai törzsfá	69
36. ábra A boszkalid hatékonysága a <i>Plenodomus</i> izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon	70
37. ábra A <i>Plenodomus</i> izolátumok növekedése izopropanol, illetve boszkalid tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik).....	71
38. ábra A fluopiram hatékonysága a <i>Plenodomus</i> izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon	72
39. ábra A <i>Plenodomus</i> izolátumok növekedése metanol, illetve fluopiram tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik).....	73
40. ábra Az azoxistrobin hatékonysága a <i>Plenodomus</i> izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon	74
41. ábra A <i>Plenodomus</i> izolátumok növekedése metanol, illetve azoxistrobin tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik).....	74
42. ábra A piraklostrobin hatékonysága a <i>Plenodomus</i> izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon	75
43. ábra A <i>Plenodomus</i> izolátumok növekedése izopropanol, illetve piraklostrobin tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik).....	76
44. ábra A tebukonazol hatékonysága a <i>Plenodomus</i> izolátumok micéliumának növekedésére a 10. napon	77
45. ábra A <i>Plenodomus</i> izolátumok növekedése izopropanol, illetve tebukonazol tartalmú mérgezett agarlemezeken a leoltást követő 8. napon (Fotók: Bagi és Csik).....	77

M3. Táblázatjegyzék

1. táblázat A gyűjtött növényi részek száma évenkénti bontásban.....	30
2. táblázat Az izolátumok adatai: név, származása (hibrid, növényi rész, gyűjtés időpontja és helyszíne)	31
3. táblázat A PCR-ek paraméterei a vizsgált szakaszok szerint.....	42
4. táblázat A filogenetikai analízis során felhasznált saját izolátumainkhoz tartozó génszakaszok szekvenciáinak génbanki azonosító kódjai.....	44
5. táblázat A hatóanyagok feloldódása oldószerben, a vizsgált elegyek koncentrációi, valamint az adott koncentrációhoz szükséges törzsoldat összetevői	47
6. táblázat A 2017 és 2021 közötti gyűjtési helyszínek és az adott fajhoz tartozó izolátumok darabszáma	50
7. táblázat <i>Plenodomus</i> izolátumok konídiumainak átlagos mérete és a tenyészetek átlagos növekedése PDA táptalajon	53
8. táblázat <i>AvrLm4</i> gén előfordulása különböző gazdanövényekről származó <i>P. lingam</i> izolátumok genetikai állományában.....	61

M4. melléklet – Az izolátumok fajszerű meghatározásának, valamint az izolátumokkal végzett molekuláris vizsgálatok eredményei

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L1	<i>P. lingam</i>	x		x					
L2	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L3	<i>P. lingam</i>	x	x						
L4	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L5	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L6	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L7	<i>P. lingam</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
L8	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L9	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L10	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L11	<i>P. lingam</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
L12	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L13	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L14	<i>P. biglobosus</i>	x							
L15	<i>P. lingam</i>	x							
L16	<i>P. lingam</i>	x							
L17	<i>P. biglobosus</i>	x							
L18	<i>P. lingam</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L19	<i>P. biglobosus</i>	x							
L20	<i>P. biglobosus</i>	x							
L21	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L22	<i>P. biglobosus</i>	x							
L23	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L24	<i>P. lingam</i>	x							
L25	<i>P. lingam</i>	x							
L26	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L27	<i>P. lingam</i>	x							
L28	<i>P. lingam</i>	x							
L29	<i>P. lingam</i>	x							
L30	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L31	<i>P. lingam</i>	x							
L32	<i>P. lingam</i>	x							
L33	<i>P. lingam</i>	x							
L34	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L35	<i>P. lingam</i>	x							
L36	<i>P. lingam</i>	x							
L37	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L38	<i>P. biglobosus</i>	x							
L39	<i>P. biglobosus</i>	x							
L40	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L41	<i>P. biglobosus</i>	x							
L42	<i>P. biglobosus</i>	x							
L43	<i>P. biglobosus</i>	x							
L44	<i>P. biglobosus</i>	x							
L45	<i>P. lingam</i>	x							
L46	<i>P. lingam</i>	x							
L47	<i>P. lingam</i>	x							
L48	<i>P. lingam</i>	x							
L49	<i>P. lingam</i>	x							
L50	<i>P. lingam</i>	x							
L51	<i>P. lingam</i>	x							
L52	<i>P. lingam</i>	x							
L53	<i>P. lingam</i>	x							
L54	<i>P. lingam</i>	x							
L55	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L56	<i>P. biglobosus</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L57	<i>P. biglobosus</i>	x							
L58	<i>P. biglobosus</i>	x							
L59	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L60	<i>P. biglobosus</i>	x							
L61	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L62	<i>P. biglobosus</i>	x							
L63	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L64	<i>P. biglobosus</i>	x							
L65	<i>P. biglobosus</i>	x							
L66	<i>P. biglobosus</i>	x							
L67	<i>P. biglobosus</i>	x							
L68	<i>P. biglobosus</i>	x							
L69	<i>P. biglobosus</i>	x							
L70	<i>P. biglobosus</i>	x							
L71	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L72	<i>P. biglobosus</i>	x							
L73	<i>P. biglobosus</i>	x							
L74	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L75	<i>P. lingam</i>	x	x						

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L76	<i>P. lingam</i>	x							
L77	<i>P. lingam</i>	x							
L78	<i>P. lingam</i>	x							
L79	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L80	<i>P. lingam</i>	x	x	x					
L81	<i>P. biglobosus</i>	x		x					
L82	<i>P. biglobosus</i>	x		x					
L83	<i>P. biglobosus</i>	x							
L84	<i>P. lingam</i>	x	x						
L85	<i>P. lingam</i>	x	x						
L86	<i>P. lingam</i>	x							
L87	<i>P. lingam</i>	x							
L88	<i>P. lingam</i>	x	x						
L89	<i>P. lingam</i>	x	x						
L90	<i>P. lingam</i>	x							
L91	<i>P. lingam</i>	x							
L92	<i>P. lingam</i>	x							
L93	<i>P. lingam</i>	x	x						
L94	<i>P. lingam</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L95	<i>P. lingam</i>	x							
L96	<i>P. lingam</i>	x							
L97	<i>P. biglobosus</i>	x		x					
L98	<i>P. lingam</i>	x							
L99	<i>P. biglobosus</i>	x							
L100	<i>P. biglobosus</i>	x							
L101	<i>P. lingam</i>	x							
L102	<i>P. biglobosus</i>	x							
L103	<i>P. biglobosus</i>	x							
L104	<i>P. biglobosus</i>	x		x					
L105	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L106	<i>P. lingam</i>	x							
L107	<i>P. lingam</i>	x							
L108	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L109	<i>P. lingam</i>	x							
L110	<i>P. lingam</i>	x		x	x	x	x	x	x
L111	<i>P. biglobosus</i>	x							
L112	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L113	<i>P. biglobosus</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L114	<i>P. biglobosus</i>	x							
L115	<i>P. biglobosus</i>	x							
L116	<i>P. biglobosus</i>	x							
L117	<i>P. biglobosus</i>	x							
L118	<i>P. lingam</i>	x		x					
L119	<i>P. biglobosus</i>	x							
L120	<i>P. biglobosus</i>	x							
L121	<i>P. biglobosus</i>	x							
L122	<i>P. biglobosus</i>	x							
L123	<i>P. biglobosus</i>	x							
L124	<i>P. biglobosus</i>	x							
L125	<i>P. biglobosus</i>	x							
L126	<i>P. biglobosus</i>	x							
L127	<i>P. biglobosus</i>	x							
L128	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L129	<i>P. biglobosus</i>	x							
L130	<i>P. biglobosus</i>	x							
L131	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L132	<i>P. lingam</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L133	<i>P. biglobosus</i>	x							
L134	<i>P. biglobosus</i>	x							
L135	<i>P. biglobosus</i>	x							
L136	<i>P. biglobosus</i>	x		x					
L137	<i>P. biglobosus</i>	x							
L138	<i>P. biglobosus</i>	x							
L139	<i>P. biglobosus</i>	x							
L140	<i>P. biglobosus</i>	x							
L141	<i>P. biglobosus</i>	x							
L142	<i>P. biglobosus</i>	x							
L143	<i>P. biglobosus</i>	x							
L144	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L145	<i>P. biglobosus</i>	x							
L146	<i>P. biglobosus</i>	x							
L147	<i>P. biglobosus</i>	x							
L148	<i>P. biglobosus</i>	x							
L149	<i>P. biglobosus</i>	x							
L150	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L151	<i>P. biglobosus</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L152	<i>P. biglobosus</i>	x							
L153	<i>P. biglobosus</i>	x							
L154	<i>P. biglobosus</i>	x							
L155	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L156	<i>P. biglobosus</i>	x							
L157	<i>P. biglobosus</i>	x							
L158	<i>P. biglobosus</i>	x							
L159	<i>P. biglobosus</i>	x							
L160	<i>P. lingam</i>	x							
L161	<i>P. biglobosus</i>	x							
L162	<i>P. biglobosus</i>	x							
L163	<i>P. biglobosus</i>	x							
L164	<i>P. biglobosus</i>	x							
L165	<i>P. biglobosus</i>	x							
L166	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L167	<i>P. lingam</i>	x							
L168	<i>P. biglobosus</i>	x							
L169	<i>P. biglobosus</i>	x							
L170	<i>P. biglobosus</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L171	<i>P. biglobosus</i>	x							
L172	<i>P. biglobosus</i>	x							
L173	<i>P. biglobosus</i>	x							
L174	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L175	<i>P. biglobosus</i>	x							
L176	<i>P. biglobosus</i>	x							
L177	<i>P. biglobosus</i>	x							
L178	<i>P. biglobosus</i>	x							
L179	<i>P. biglobosus</i>	x							
L180	<i>P. biglobosus</i>	x							
L181	<i>P. biglobosus</i>	x							
L182	<i>P. biglobosus</i>	x							
L183	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L184	<i>P. biglobosus</i>	x							
L185	<i>P. biglobosus</i>	x							
L186	<i>P. biglobosus</i>	x							
L187	<i>P. biglobosus</i>	x							
L188	<i>P. biglobosus</i>	x							
L189	<i>P. biglobosus</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L190	<i>P. biglobosus</i>	x							
L191	<i>P. biglobosus</i>	x							
L192	<i>P. biglobosus</i>	x							
L193	<i>P. biglobosus</i>	x							
L194	<i>P. biglobosus</i>	x							
L195	<i>P. biglobosus</i>	x							
L196	<i>P. biglobosus</i>	x							
L197	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L198	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L199	<i>P. lingam</i>	x							
L200	<i>P. lingam</i>	x							
L201	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L202	<i>P. biglobosus</i>	x							
L203	<i>P. biglobosus</i>	x							
L204	<i>P. lingam</i>	x							
L205	<i>P. biglobosus</i>	x							
L206	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L207	<i>P. biglobosus</i>	x							
L208	<i>P. lingam</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L209	<i>P. lingam</i>	x							
L210	<i>P. lingam</i>	x							
L211	<i>P. lingam</i>	x							
L212	<i>P. lingam</i>	x							
L213	<i>P. lingam</i>	x							
L214	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L215	<i>P. lingam</i>	x							
L216	<i>P. lingam</i>	x							
L217	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L218	<i>P. lingam</i>	x							
L219	<i>P. lingam</i>	x							
L220	<i>P. lingam</i>	x							
L221	<i>P. lingam</i>	x							
L222	<i>P. lingam</i>	x							
L223	<i>P. lingam</i>	x							
L224	<i>P. lingam</i>	x							
L225	<i>P. lingam</i>	x							
L226	<i>P. lingam</i>	x							
L227	<i>P. lingam</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L228	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L229	<i>P. lingam</i>	x							
L230	<i>P. lingam</i>	x							
L231	<i>P. lingam</i>	x							
L232	<i>P. lingam</i>	x							
L233	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L234	<i>P. lingam</i>	x							
L235	<i>P. lingam</i>	x							
L236	<i>P. lingam</i>	x							
L237	<i>P. lingam</i>	x							
L238	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L239	<i>P. lingam</i>	x							
L240	<i>P. lingam</i>	x							
L241	<i>P. lingam</i>	x							
L242	<i>P. lingam</i>	x							
L243	<i>P. lingam</i>	x							
L244	<i>P. lingam</i>	x							
L245	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L246	<i>P. lingam</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L247	<i>P. lingam</i>	x							
L248	<i>P. lingam</i>	x							
L249	<i>P. lingam</i>	x							
L250	<i>P. lingam</i>	x							
L251	<i>P. lingam</i>	x							
L252	<i>P. lingam</i>	x							
L253	<i>P. lingam</i>	x							
L254	<i>P. lingam</i>	x							
L255	<i>P. lingam</i>	x							
L256	<i>P. lingam</i>	x							
L257	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L258	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L259	<i>P. lingam</i>	x							
L260	<i>P. lingam</i>	x							
L261	<i>P. lingam</i>	x							
L262	<i>P. lingam</i>	x							
L263	<i>P. lingam</i>	x							
L264	<i>P. lingam</i>	x							
L265	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L266	<i>P. lingam</i>	x							
L267	<i>P. lingam</i>	x							
L268	<i>P. lingam</i>	x							
L269	<i>P. lingam</i>	x							
L270	<i>P. lingam</i>	x							
L271	<i>P. lingam</i>	x							
L272	<i>P. lingam</i>	x							
L273	<i>P. lingam</i>	x							
L274	<i>P. lingam</i>	x							
L275	<i>P. lingam</i>	x							
L276	<i>P. lingam</i>	x							
L277	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L278	<i>P. lingam</i>	x							
L279	<i>P. lingam</i>	x							
L280	<i>P. lingam</i>	x							
L281	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L282	<i>P. lingam</i>	x							
L283	<i>P. lingam</i>	x			x	x	x	x	x
L284	<i>P. lingam</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L285	<i>P. biglobosus</i>	x							
L286	<i>P. biglobosus</i>	x							
L287	<i>P. biglobosus</i>	x							
L288	<i>P. biglobosus</i>	x							
L289	<i>P. biglobosus</i>	x							
L290	<i>P. biglobosus</i>	x							
L291	<i>P. biglobosus</i>	x							
L292	<i>P. biglobosus</i>	x							
L293	<i>P. biglobosus</i>	x							
L294	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L295	<i>P. biglobosus</i>	x							
L296	<i>P. biglobosus</i>	x							
L297	<i>P. biglobosus</i>	x							
L298	<i>P. biglobosus</i>	x							
L299	<i>P. biglobosus</i>	x							
L300	<i>P. biglobosus</i>	x							
L301	<i>P. biglobosus</i>	x							
L302	<i>P. biglobosus</i>	x							
L303	<i>P. biglobosus</i>	x							

Izolátum neve	Kórokozó	Molekuláris vizsgálatok							
		ITS	MAT	<i>AvrLm4</i>	18S-28S	LSU	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>	<i>act1</i>
L304	<i>P. biglobosus</i>	x							
L305	<i>P. biglobosus</i>	x							
L306	<i>P. biglobosus</i>	x			x	x	x	x	x
L307	<i>P. biglobosus</i>	x							
L308	<i>P. biglobosus</i>	x							

M5. melléklet - A 3.2.2. fejezetben lévő ábrákhoz felhasznált NCBI adatbázisból származó szekvenciák

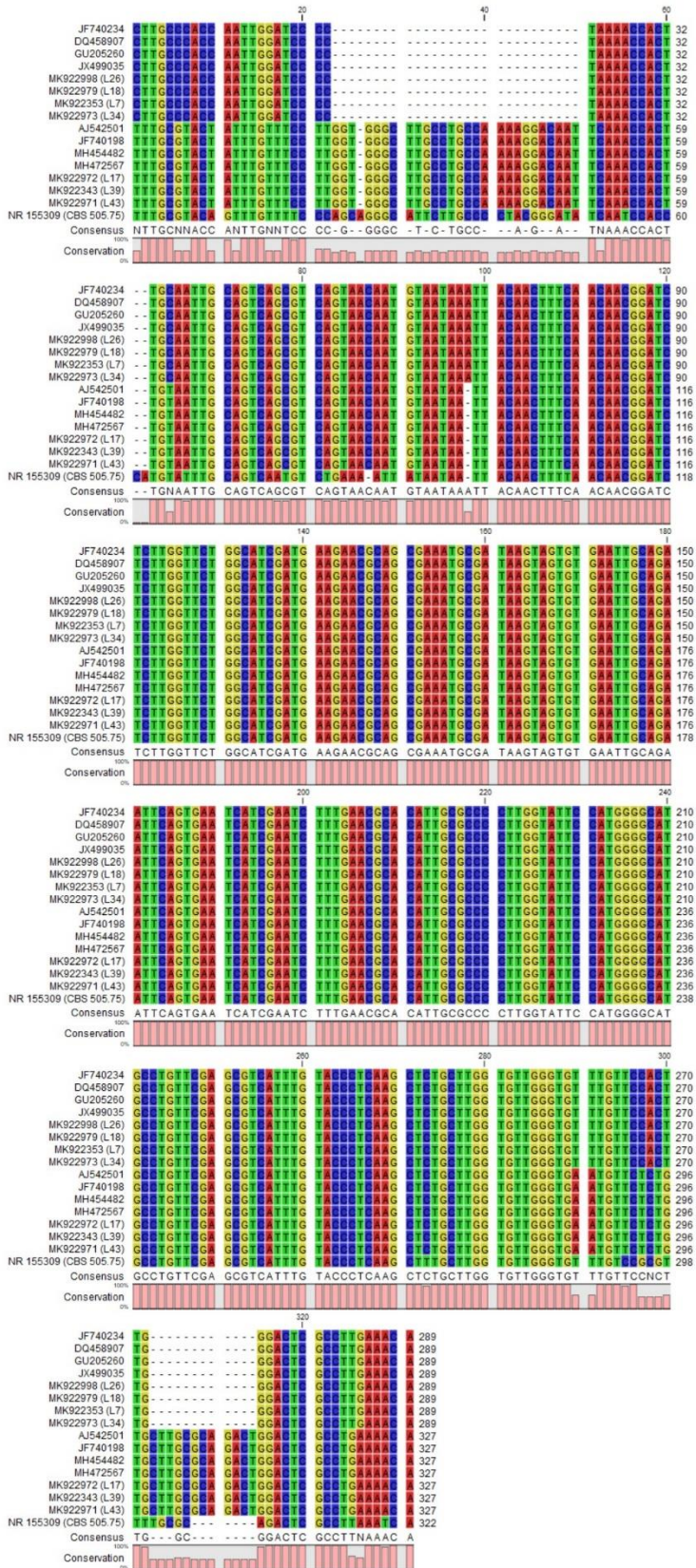
Ábra száma	Vizsgált szakasz	Kórokozó	Génbanki azonosító
2. ábra	ITS régió rövid szakasza	<i>P. lingam</i>	JF740234
		<i>P. biglobosus</i>	DQ133890
3. ábra	MAT1-1 párosodási típus	<i>P. lingam</i>	AY174048
	MAT1-2 párosodási típus	<i>P. lingam</i>	AY174049
4. ábra	<i>AvrLm4</i> gén	<i>P. lingam</i>	FP929135
5. ábra	ITS régió teljes szakasza	<i>P. lingam</i>	KY050740
		<i>P. biglobosus</i>	KT389541
6. ábra	LSU régió	<i>P. lingam</i>	JF740306
		<i>P. biglobosus</i>	MH874106
7. ábra	<i>tub2</i> gén	<i>P. lingam</i>	KT389841
		<i>P. biglobosus</i>	KT389840
8. ábra	<i>rpb2</i> régió	<i>P. lingam</i>	KT389669
		<i>P. biglobosus</i>	MT683512
9. ábra	<i>act1</i> gén	<i>P. lingam</i>	AY748971
		<i>P. biglobosus</i>	AY748949

M6. melléklet - A *P. lingam* és a *P. biglobosus* izolátumok darabszáma a mintagyűjtés időpontja és helyszíne alapján csoportosítva, valamint az egyes mintagyűjtési pontokon begyűjtött növényi részek darabszáma

Mintagyűjtés időpontja	Mintagyűjtés helyszíne	Gyűjtött levelek (db)	Levelekről származó izolátum (db)		Gyűjtött szárazak (db)	Szárazokról származó izolátum (db)	
			PL	PB		PL	PB
2017. 06. 23.	Nagylózs	-			10	3	0
2017. 07. 04.	Nagylózs	-			16	10	0
2018. 04. 07.	Kétpó	29	5	5	-		
2018. 04. 13.	Vadosfa	25	6	0	-		
2018. 04. 13.	Osló	32	3	0	-		
2018. 04. 13.	Bősárcány	36	3	0	-		
2018. 06. 27.	Szalánta	-			18	2	5
2018. 06. 28.	Tordas	-			22	10	2
2019. 03. 30.	Kuncsorba	17	0	6	-		
2019. 03. 30.	Törökszentmiklós	15	1	0	-		
2019. 04. 22.	Dombóvár	5	1	1	-		
2019. 04. 20.	Baranyaszentgyörgy	-			15	0	2
2019. 07. 19.	Harkány	-			7	0	9
2019. 07. 19.	Felsőnána	-			14	18	3
2019. 09. 19.	Martonvásár	16	7	7	-		
2020. 02. 23.	Baranyajenő	27	2	16	-		
2020. 07. 01.	Felsőnána	-			18	2	10
2020. 07. 02.	Jászboldogháza	-			9	0	14
2021. 01. 31.	Kiskunlacháza	7	3	12	-		
2021. 04. 25.	Meződ	24	1	27	-		
2021. 04. 25.	Palé	9	3	0	-		
2021. 05. 05.	Gyirmót	11	3	5	-		
2021. 05. 08.	Esztergom	12	18	0	-		
2021. 05. 16.	Sántos	16	12	0	-		
2021. 05. 17.	Gyomaendrőd	16	15	0	-		

2021. 05. 11.	Püski	14	11	1	-		
2021. 05. 30.	Igal	15	9	0	-		
2021. 05. 30.	Tamási	13	7	0	-		
2021. 05. 28.	Kiszombor	13	3	1	-		
2021. 07. 12.	Gyékényes	-			21	0	24

M7. melléklet Saját és a nemzetközi adatbázisból származó *Plenodomus lingam* izolátumok 289 bp hosszúságú, valamint a *Plenodomus biglobosus* izolátumok 327 bp hosszúságú részleges ITS1 régió, 5,8S rDNS gén, valamint részleges ITS2 régió szekvenciáinak illesztése



M8. melléklet – A *P. lingam* párosodási típusáért felelős génszakasz szekvenciáinak génbanki azonosító kódjai a vizsgált izolátumok esetén

MAT1-1 párosodási típus		MAT1-2 párosodási típus	
Izolátum	Génbanki azonosító	Izolátum	Génbanki azonosító
L3	OQ623474	L2	OQ623491
L4	OQ623475	L5	OQ623492
L6	OQ623476	L9	OQ623493
L7	OQ623477	L10	OQ623494
L8	OQ623478	L11	OQ623495
L12	OQ623479	L21	OQ623496
L13	OQ623480		
L16	OQ623481		
L23	OQ623482		
L75	OQ623483		
L79	OQ623484		
L80	OQ623485		
L84	OQ623486		
L85	OQ623487		
L88	OQ623488		
L89	OQ623489		
L93	OQ623490		

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőimnek: Dr. Petróczy Mariettának és Dr. Palkovics Lászlónak, akik szakmai útmutatásukkal és munkájukkal segítettek a kutatásom során. Köszönöm, hogy a nehézségek ellenére mindvégig támogattak, valamint, hogy biztosították a kutatás feltételeit.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Nagy Csabának, a KWS Magyarország Kft. területi képviselőjének, aki ötleteivel megalapozta a kutatás kezdetét.

Köszönöm továbbá a Növénykórtani Tanszék valamennyi munkatársának a labormunka és az adatok elemzése során nyújtott segítséget.

A mintagyűjtések kapcsán külön köszönet illeti Bedő Veronikát, Csik Ádám Jánost, Czibulyás Piroskát, Jáki Viktort, Károly Lászlót, Lados Károlyt, Nagy Csabát, Oláh Richárdot és Simon Renátát.

Köszönöm dr. Ladányi Mártának az adatok statisztikai kiértékelésében nyújtott segítségét.

Köszönöm hallgatóinknak, Csik Ádám Jánosnak és Jáki Viktornak, hogy a témából készítették el a diplomamunkájukat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, hogy mindvégig támogattak a tanulmányaim során.

A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatta a Felsőoktatási Intézmény Kiválósági Program (NKFIH-1159-6/2019) és a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (TKP2020-IKA-12) keretein belül.